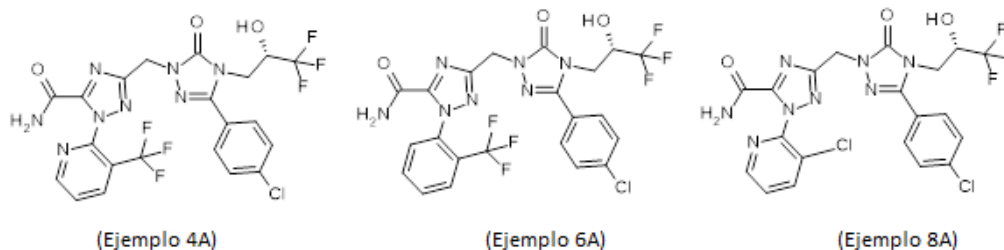


PROFÁRMACOS DE DERIVADOS DE TRIAZOL SUSTITUIDO Y SUS USOS

La presente invención se refiere a profármacos de 3-({3-(4-clorofenil)-5-oxo-4-[(2S)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxiopropil]-4,5-dihidro-1H-1,2,4-triazol-1-il}metil)-1-[3-(trifluorometil)piridin-2-il]-1H-1,2,4-triazol-5-carboxamida, 3-({3-(4-clorofenil)-5-oxo-4-[(2S)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxiopropil]-4,5-dihidro-1H-1,2,4-triazol-1-il}metil)-1-[2-(trifluorometil)fenil]-1H-1,2,4-triazol-5-carboxamida y 3-({3-(4-clorofenil)-5-oxo-4-[(2S)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxiopropil]-4,5-dihidro-1H-1,2,4-triazol-1-il}metil)-1-(3-cloropiridin-2-il)-1H-1,2,4-triazol-5-carboxamida, a procesos para la preparación de dichos compuestos, a composiciones farmacéuticas que contienen dichos compuestos, y al uso de dichos compuestos o composiciones para el tratamiento y/o prevención de enfermedades, en particular para el tratamiento y/o prevención de enfermedades renales y cardiovasculares.

Los profármacos son derivados de un ingrediente activo que se somete *in vivo* a una biotransformación enzimática y/o química en una o más etapas antes de liberarse el ingrediente activo real. Un residuo de profármaco se usa comúnmente para mejorar el perfil de propiedades del ingrediente activo subyacente [P. Ettmayer et ál., *J. Med. Chem.* **47**, 2393 (2004)]. Para lograr un perfil óptimo de efectos es necesario al respecto diseñar el residuo de profármaco así como el mecanismo de liberación deseado para ajustarse muy precisamente al ingrediente activo individual, la indicación, el sitio de acción y la vía de administración. Una gran cantidad de medicamentos se administra como profármacos que muestran una biodisponibilidad mejorada por comparación con el ingrediente activo subyacente, por ejemplo que se logra mejorando el perfil físico-químico, específicamente la solubilidad, las propiedades de absorción activa y pasiva o la distribución específica del tejido. Un ejemplo que se puede mencionar de la bibliografía de amplio espectro sobre profármacos es: H. Bundgaard (Ed.), *Design of Prodrugs: Bioreversible derivatives for various functional groups and chemical entities*, Elsevier Science Publishers B.V., 1985.

3-({3-(4-clorofenil)-5-oxo-4-[(2S)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxiopropil]-4,5-dihidro-1H-1,2,4-triazol-1-il}metil)-1-[3-(trifluorometil)piridin-2-il]-1H-1,2,4-triazol-5-carboxamida (Ejemplo 4A), 3-({3-(4-clorofenil)-5-oxo-4-[(2S)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxiopropil]-4,5-dihidro-1H-1,2,4-triazol-1-il}metil)-1-[2-(trifluorometil)fenil]-1H-1,2,4-triazol-5-carboxamida (Ejemplo 6A) y 3-({3-(4-clorofenil)-5-oxo-4-[(2S)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxiopropil]-4,5-dihidro-1H-1,2,4-triazol-1-il}metil)-1-(3-cloropiridin-2-il)-1H-1,2,4-triazol-5-carboxamida (Ejemplo 8A) son antagonistas altamente potentes y selectivos del receptor V1a, como se describe en WO 2017/191102-A1 (ejemplos 1 y 2) y WO 2017/191107-A1 (ejemplo 1).



Vasopresina es una neurohormona que básicamente regula la homeostasis del agua y el tono vascular. Se produce en neuronas endócrinas especializadas en el *Nucleus supraopticus* y *N. paraventricularis* en la pared del tercer ventrículo (hipotálamo) y es transportada desde allí a través de los procesos neurales hacia los lóbulos posteriores de la hipófisis (neurohipófisis). Allí la hormona es liberada en el torrente sanguíneo en respuesta a diferentes estímulos fisiológicos y patofisiológicos. Una regulación neurohormonal alterada se manifiesta esencialmente en una elevación del tono simpático y una activación inapropiada del sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS). Mientras la inhibición de estos componentes por bloqueadores del receptor beta por un lado y los inhibidores ACE o bloqueadores del receptor de angiotensina por el otro es ahora una parte inherente del tratamiento farmacológico de las enfermedades cardíacas, la elevación inapropiada de la secreción de vasopresina actualmente no se puede tratar adecuadamente.

La vasopresina ejerce su acción principalmente uniéndose a tres receptores, que se clasifican como receptores V1a, V1b y V2, y que pertenecen a la familia de los receptores acoplados a la proteína G. Los receptores V2 se ubican en el epitelio tubular distal y el epitelio de los túbulos recolectores del riñón. Su activación hace que estos epitelios sean permeables al agua. Este fenómeno se debe a la incorporación de acuaporinas (canales especiales de agua) en la membrana luminal de las células epiteliales. Por consiguiente, la inhibición farmacológica de la acción de la vasopresina sobre el receptor V2 resulta en una mayor excreción de orina. Por lo tanto, los fármacos con actividad antagonista de V2 parecen ser particularmente adecuados para el tratamiento de todas las enfermedades asociadas con una sobrecarga del cuerpo con agua.

Los receptores V1b (también denominados receptores V3) son detectables principalmente en el sistema nervioso central. Junto con la hormona liberadora de corticotropina (CRH), la vasopresina regula la secreción basal e inducida por estrés de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) mediante el receptor V1b.

Los receptores V1a se ubican principalmente en células de músculo liso vascular (VSMC) pero también en cardiomiocitos, fibroblastos y células renales especializadas como células mesangiales glomerulares o células de la mácula densa que controlan la liberación de renina [Wasilewski MA, Myers VD, Recchia FA, Feldman AM, Tilley DG, *Cell Signal.*, 28(3), 224-233, (2016)]. La activación del receptor VSMC V1a por vasopresina provoca la liberación de calcio intracelular y

- vasoconstricción acorde. Entonces, la estimulación de los receptores VSMC V1a provoca resistencia vascular aumentada y mejor poscarga cardíaca. El gasto cardíaco se ve perjudicado por la vasoconstricción mediada por V1a. El aumento en la poscarga y la estimulación directa de los receptores V1a en cardiomiocitos puede llevar a hipertrofia cardíaca y remodelación incluida fibrosis. Los ratones con sobreexpresión específica cardíaca del receptor V1a desarrollan hiperretrofia cardíaca que lleva a dilatación y disfunción del ventrículo izquierdo, lo que sugiere un rol esencial para el receptor V1a en el desarrollo de insuficiencia cardíaca [Li X, Chan TO, Myers V, Chowdhury I, Zhang XQ, Song J, Zhang J, Andrel J, Funakoshi H, Robbins J, Koch WJ, Hyslop T, Cheung JY, Feldman AM, *Circulation.*; 124, 572-581 (2011)].
- El receptor V1a también se expresa en la vasculatura medular y cortical renal donde media la vasoconstricción de vasos renales y afecta el flujo sanguíneo renal global. Entonces, la activación del receptor V1a puede reducir el flujo sanguíneo medular que induce otros procesos patológicos como hipoxia tisular, oxígeno reducido y suministro de energía acorde para procesos de transporte así como daños directos de las células mesangiales y de la mácula densa. Se ha demostrado que la activación del receptor V1a mesangial media la señalización de TGF β y provoca un aumento en la producción de colágeno IV. Mientras esta señalización contribuye a la acumulación de matriz extracelular y remodelación en el riñón, se cree que ocurren sendas de señalización similares en células cardíacas especialmente después de un infarto del miocardio, que enfatiza el rol principal del receptor V1a en el desarrollo de procesos hipertróficos y fibróticos como respuesta a niveles de vasopresina patofisiológicos elevados [Wasilewski MA, Myers VD, Recchia FA, Feldman AM, Tilley DG. *Señalización del receptor de arginina vasopresina y resultados funcionales en insuficiencia cardíaca. Cell Signal.*, 28(3), 224-233 (2016)].
- Dado que los receptores V1a se expresan principalmente en VSMC y por tanto participan en la función vascular, es posible un enlace con enfermedades vasculares como enfermedad arterial periférica (PAD) que incluye claudicación e isquemia aguda de las extremidades así como disfunción microvascular coronaria (CMD).
- Aparte de esto, los receptores V1a también se expresan en plaquetas humanas y el hígado. El significado de receptores V1a de plaquetas no se entiende totalmente aunque la vasopresina induce la agregación de plaquetas humanas mediante el receptor V1a a altas concentraciones *ex vivo*. Entonces, la inhibición de agregación plaquetaria inducida por vasopresina por antagonistas del receptor V1a es un ensayo farmacológico *ex vivo* útil que usa tejido humano que expresa de forma endógena el receptor V1a [Thibonnier M, Roberts JM, *J Clin Invest.*; 76:1857-1864, (1985)].
- La vasopresina estimula la gluconeogénesis y glicogenólisis mediante activación del receptor V1a hepático. Estudios animales han demostrado que la vasopresina perjudica la tolerancia a la glucosa que podría iniciarse por un antagonista del receptor V1a proporcionando así un enlace del receptor de vasopresina V1a con diabetes mellitus. [Taveau C, Chollet C, Waeckel L, Desposito D, Bichet

DG, Arthus MF, Magnan C, Philippe E, Paradis V, Fougelle F, Hainault I, Enhorning S, Velho G, Roussel R, Bankir L, Melander O, Bouby N. Vasopressin and hydration play a major role in the development of glucose intolerance and hepatic steatosis in obese rats. *Diabetologia*, 58(5), 1081-1090, (2015)]. Se demostró que la vasopresina contribuye al desarrollo de albuminuria y nefropatía inducida por diabetes en modelos animales que es coherente con los descubrimientos epidemiológicos en humanos.

Se descubrió recientemente que la vasopresina también parece cumplir na función causal en el desarrollo de la preeclampsia. La infusión crónica de vasopresina durante el embarazo en ratones es suficiente para inducir todos los fenotipos fetales y maternos principales asociados con preeclampsia humana, que incluye hipertensión específica del embarazo [Santillan MK, Santillan DA, Scroggins SM, Min JY, Sandgren JA, Pearson NA, Leslie KK, Hunter SK, Zamba GK, Gibson-Corley KN, Grobe JL. Vasopresina en preeclampsia: un modelo de ratón clínicamente relevante y biomarcador de embarazo humano muy temprano y novedoso *Hipertension*. 64(4), 852-859, (2014)].

Los niveles de vasopresina pueden estar elevados en mujeres con dismenorrea (trastorno ginecológico caracterizado por dolor pélvico de calambres cíclicos) durante la menstruación, que parece aumentar la contracción del músculo liso miometrial. Se descubrió recientemente que un antagonista del receptor V1a de vasopresina selectivo (relcovaptan/SR-49059) puede reducir las contracciones intrauterinas provocadas por la vasopresina.

Por estas razones, los agentes que inhiben la acción de la vasopresina sobre el receptor V1a parecen ser adecuados para el tratamiento de varias enfermedades cardíacas. En particular, los agentes que inhiben la acción de vasopresina selectivamente en el receptor V1a ofrecen un perfil especialmente ideal para el tratamiento de pacientes de otra manera normovolémicos, es decir, aquellos que no son elegibles para descongestión por, por ejemplo, altas dosis de diuréticos de bucle o antagonistas de V2, y donde la acuareisis inducida mediante inhibición de V2 puede ser no deseada.

Determinados derivados de 4-fenil-1,2,4-triazol-3-ilo se han descrito en WO 2005/063754-A1 y WO 2005/105779-A1 por actuar como antagonistas del receptor V1a de vasopresina que son útiles para el tratamiento de trastornos ginecológicos, particularmente trastornos menstruales tales como dismenorrea.

En WO 2011/104322-A1, un grupo particular de 1,2,4-triazol-3-onas unidas por bis-arilo, incluyendo 5-fenil-1,2,4-triazol-3-ilo y derivados de 1-fenil-1,2,3-triazol-4-ilo de este, se han descrito como antagonistas de los receptores V2 y/o V1a de vasopresina útiles para el tratamiento y/o prevención de enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, los compuestos descritos no muestran selectividad suficiente hacia el receptor V1a y en su mayoría muestran actividad combinada en ambos receptores de vasopresina V1a y V2. Con todo, como se describe anteriormente, una alta afinidad así como una alta selectividad para el receptor V1a es una condición previa deseada para el tratamiento de afecciones y enfermedades donde no se desea una descongestión y puede llevar a una homeostasis

de fluido corporal desregulado que incluye reducción de osmolalidad en plasma sanguíneo en individuos de otra manera normovolémicos.

En WO 2016/071212-A1 determinados derivados de 5-(hidroxialquil)-1-fenil-1,2,4-triazol han sido descritos, que actúan como antagonistas potentes de receptores de vasopresina V1a y V2 y, además, muestran una potencia acuárética considerablemente potenciada in vivo después de la aplicación oral. Los compuestos se describen como útiles para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades cardiovasculares y renales. Con todo, como se describe anteriormente, una alta afinidad así como una alta selectividad para el receptor V1a es una condición previa deseada para el tratamiento de afecciones y enfermedades donde no se desea una descongestión y puede llevar a una homeostasis de fluido corporal desregulado que incluye reducción de osmolalidad en plasma sanguíneo en individuos de otra manera normovolémicos.

En WO 2017/191107-A1 y WO 2017/191102-A1 se describen determinados derivados de 5-(carboxamida)-1-fenil-1,2,4-triazol así como en WO 2017/191114-A1 se describen derivados específicos de 5-(hidroxialquil)-1-heteroaril-1,2,4-triazol, que representan antagonistas altamente selectivos y potentes del receptor V1a y son particularmente útiles para el tratamiento y/o prevención de enfermedades cardiovasculares y renales en sujetos que no sufren de sobrecarga de fluidos y por lo tanto no deberían des congestionarse.

Otros derivados novedosos de 1,2,4-triazol 5-(carboxamida)-sustituidos, 5-(fluoroalquil)-sustituidos y 3-(hidroxialquil)-sustituidos han sido descritos como antagonistas de receptores de vasopresina V2 y/o V1a en WO 2017/191105-A1, WO 2017/191112-A1, WO 2017/191115-A1 y WO 2018/073144-A1.

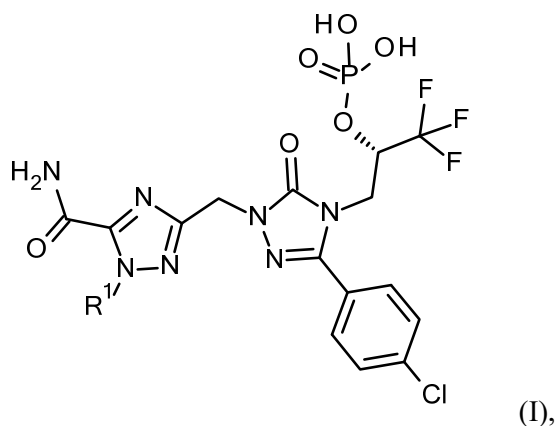
Un perfil de actividad con una alta selectividad para el receptor V1a tiene un bajo potencial para provocar efectos secundarios fuera del objetivo no deseados y también ayudaría a reducir la cantidad de sustancia que será necesaria para lograr y mantener el efecto terapéutico deseado, limitando así la posibilidad de efectos laterales no aceptables y/o interacciones fármaco-fármaco no deseadas durante el tratamiento de pacientes que ya podrían estar en alto riesgo, tales como, por ejemplo, en enfermedades cardíacas o renales agudas o crónicas.

Un problema técnico a ser resuelto de acuerdo con la presente invención por lo tanto puede ser la identificación y suministro de nuevos compuestos que actúen como potentes antagonistas del receptor V1A de vasopresina. Otro objeto de la invención es identificar y proporcionar nuevos compuestos con una alta afinidad y selectividad vis-à-vis el receptor de vasopresina V1a. Los compuestos pretenden evitar inducir acuarexis mediante inhibición de V2. Además se pretende que los compuestos tengan un perfil terapéutico similar o mejorado en comparación con los compuestos conocidos de la técnica previa, por ejemplo con respecto a sus propiedades in vivo, por ejemplo sus características farmacocinéticas y farmacodinámicas y/o su perfil metabólico y/o su relación dosis-actividad.

Sin embargo, los compuestos del Ejemplo 4A, Ejemplo 6A y Ejemplo 8A que son antagonistas altamente potentes y selectivos del receptor de V1a, tienen una solubilidad limitada en agua y medio fisiológico, haciendo difícil por ejemplo la administración intravenosa de los compuestos del Ejemplo 4A, Ejemplo 6A y Ejemplo 8A. Además, la biodisponibilidad de los compuestos después de la administración oral de los compuestos debería mejorar. Por lo tanto era otro objeto de la presente invención identificar derivados o profármacos de los compuestos del Ejemplo 4A, Ejemplo 6A y Ejemplo 8A que tienen una solubilidad mejorada en el medio mencionado y, al mismo tiempo, permiten la liberación controlada de los compuestos del Ejemplo 4A, Ejemplo 6A y Ejemplo 8A en el cuerpo del paciente después de la administración y/o que tienen una buena biodisponibilidad después de la administración oral.

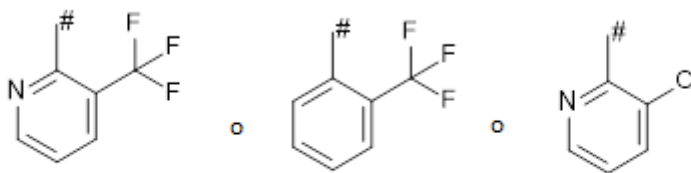
Sorprendentemente, se ha descubierto ahora que determinados profármacos de los compuestos del Ejemplo 4A, Ejemplo 6A y Ejemplo 8A tienen este perfil específico y hace que los compuestos de la invención sean útiles para el tratamiento y/o prevención de enfermedades, que están asociadas con la activación del receptor de V1a. Los compuestos de la presente invención sean particularmente útiles para el tratamiento y/o prevención de enfermedades renales y cardiovasculares en sujetos que no sufren sobrecarga de fluidos y que por lo tanto no deberían descongestionarse.

La invención proporciona los compuestos de la fórmula general (I)



donde

20 R^1 representa un grupo de la fórmula



donde

representa el punto de unión con el anillo 1,2,4-triazolilo,

y sales farmacéuticamente aceptables de estos, sus solvatos y solvatos de las sales de estos.

Los términos como se mencionan en el presente texto tienen los significados a continuación:

El término “que comprende” cuando se usa en la memoria descriptiva incluye “que consiste en”.

- 5 En las fórmulas del grupo que representa R^1 , el punto final de la línea marcada por # no representa un átomo de carbono o un grupo CH_2 , pero es parte del enlace con el átomo con que R^1 está unido.

Es posible que los compuestos de la fórmula general (I) existan como variantes isotópicas. La invención además incluye una o más variantes isotópicas de los compuestos de la fórmula general (I), particularmente compuestos que contienen deuterio de la fórmula general (I).

- 10 El término “variante isotópica” de un compuesto o un reactivo se define como un compuesto que muestra una proporción poco natural de uno o más de los isótopos que constituyen dicho compuesto.

El término “variante isotópica del compuesto de la fórmula general (I)” se define como un compuesto de la fórmula general (I) que muestra una proporción poco natural de uno o más de los isótopos que constituyen dicho compuesto.

- 15 La expresión “proporción poco natural” significa una proporción de dicho isótopo que es mayor que su abundancia natural. Las abundancias naturales de isótopos a ser aplicadas en este contexto se describen en “Isotopic Compositions of the Elements 1997”, Pure Appl. Chem., 70(1), 217-235, 1998.

- 20 Ejemplos de dichos isótopos incluyen isótopos estables y radioactivos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, azufre, flúor, cloro, bromo y yodo, tales como ^2H (deuterio), ^3H (tritio), ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{17}O , ^{18}O , ^{32}P , ^{33}P , ^{33}S , ^{34}S , ^{35}S , ^{36}S , ^{18}F , ^{36}Cl , ^{82}Br , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{129}I y ^{131}I , respectivamente.

- Con respecto al tratamiento y/o prevención de los trastornos especificados en la presente las una o más variantes isotópicas de los compuestos de fórmula general (I) contienen preferentemente deuterio (“compuestos que contienen deuterio de la fórmula general (I)”). Las variantes isotópicas de los compuestos de la fórmula general (I) donde se incorporan uno o más isótopos radioactivos, tales como ^3H o ^{14}C , son útiles por ejemplo en los estudios de distribución de tejido de sustrato y/o fármaco. Estos isótopos se prefieren particularmente por la facilidad de su incorporación y detectabilidad. Los isótopos que emiten positrones tales como ^{18}F o ^{11}C se pueden incorporar en un compuesto de fórmula general (I). Estas variantes isotópicas de los compuestos de fórmula general (I) son útiles para aplicaciones de imaginología in vivo. Los compuestos que contienen deuterio y que contienen ^{13}C de la fórmula general (I) se pueden usar en análisis de espectrometría de masas (H. J. Leis et ál., Curr. Org. Chem., 1998, 2, 131) en el contexto de estudios preclínicos o clínicos.
- 25
- 30

Las variantes isotópicas de los compuestos de la fórmula general (I) pueden prepararse generalmente por métodos conocidos por los expertos en la técnica, tales como los descritos en los esquemas y/o ejemplos allí, sustituyendo un reactivo por una variante isotópica de dicho reactivo, preferentemente por un reactivo que contiene deuterio. Dependiendo de los sitios deseados de deuteración, en algunos casos el deuterio de D₂O se puede incorporar directamente en los compuestos o en reactivos que son útiles para sintetizar dichos compuestos (Esaki et ál., *Tetrahedron*, 2006, 62, 10954; Esaki et ál., *Chem. Eur. J.*, 2007, 13, 4052). El gas de deuterio también es un reactivo útil para incorporar deuterio en moléculas. La deuteración catalítica de enlaces olefínicos (H. J. Leis et ál., *Curr. Org. Chem.*, 1998, 2, 131; J. R. Morandi et ál., *J. Org. Chem.*, 1969, 34 (6), 1889) y enlaces acetilénicos (N. H. Khan, *J. Am. Chem. Soc.*, 1952, 74 (12), 3018; S. Chandrasekhar et ál., *Tetrahedron Letters*, 2011, 52, 3865) es una vía directa para la incorporación de deuterio. Los catalizadores metálicos (es decir Pd, Pt, y Rh) en presencia de gas de deuterio se pueden usar para intercambiar directamente deuterio por hidrógeno en grupos funcionales que contienen hidrocarburos (J. G. Atkinson et ál., patente estadounidense 3966781). Una variedad de reactivos deuterados y bloques de construcción sintética están comercialmente disponibles de compañías tales como por ejemplo C/D/N Isotopes, Quebec, Canadá; Cambridge Isotope Laboratories Inc., Andover, MA, EUA; y CombiPhos Catalysts, Inc., Princeton, NJ, EUA. Se proporciona más información acerca del estado de la técnica con respecto al intercambio de deuterio-hidrógeno por ejemplo en Hanzlik et ál., *J. Org. Chem.* 55, 3992-3997, 1990; R. P. Hanzlik et ál., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 160, 844, 1989; P. J. Reider et ál., *J. Org. Chem.* 52, 3326-3334, 1987; M. Jarman et ál., *Carcinogenesis* 16(4), 683-688, 1995; J. Atzrodt et ál., *Angew. Chem., Int. Ed.* 2007, 46, 7744; K. Matoishi et ál., *Chem. Commun.* 2000, 1519-1520; K. Kassahun et ál., WO2012/112363.

El término “compuesto que contiene deuterio de la fórmula general (I)” se define como un compuesto de la fórmula general (I), donde uno o más átomos de hidrógeno se remplazan por uno o más átomos de deuterio y donde la abundancia de deuterio en cada posición deuterada del compuesto de la fórmula general (I) es mayor que la abundancia natural de deuterio, que es de alrededor de 0,015%. Particularmente, en un compuesto que contiene deuterio de la fórmula general (I) la abundancia de deuterio en cada posición deuterada del compuesto de la fórmula general (I) es mayor que 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% o 80%, preferentemente mayor que 90%, 95%, 96% o 97%, aun más preferentemente mayor que 98% o 99% en dichas posiciones. Se entiende que la abundancia de deuterio en cada posición deuterada es independiente de la abundancia de deuterio en otras posiciones deuteradas.

La incorporación selectiva de uno o más átomos de deuterio en un compuesto de fórmula general (I) puede alterar las propiedades físico-químicas (tales como por ejemplo acidez [C. L. Perrin, et ál., *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, 129, 4490; A. Streitwieser et ál., *J. Am. Chem. Soc.*, 1963, 85, 2759;], basicidad [C. L. Perrin et ál., *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, 127, 9641; C. L. Perrin, et ál., *J. Am. Chem.*

Soc., 2003, 125, 15008; C. L. Perrin in *Advances in Physical Organic Chemistry*, 44, 144], lipofilicidad [B. Testa et ál., *Int. J. Pharm.*, 1984, 19(3), 271]) y/o el perfil metabólico de la molécula y puede resultar en cambios en la relación del compuesto original con metabolitos o en las cantidades de metabolitos formados. Dichos cambios pueden resultar en determinadas ventajas terapéuticas y por tanto se pueden preferir en algunas circunstancias. Fueron reportadas las relaciones reducidas de metabolismo y cambio metabólico, donde la relación de of metabolitos cambia (A. E. Mutlib et ál., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2000, 169, 102; D. J. Kushner et ál., *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 1999, 77, 79). Estos cambios en la exposición al fármaco original y metabolitos pueden tener consecuencias importantes con respecto a la farmacodinámica, tolerabilidad y eficacia de un compuesto que contiene deuterio de la fórmula general (I). En algunos casos la sustitución de deuterio reduce o elimina la formación de un metabolito no deseado o tóxico y potencia la formación de un metabolito deseado (por ejemplo nevirapina: A. M. Sharma et ál., *Chem. Res. Toxicol.*, 2013, 26, 410; Efavirenz: A. E. Mutlib et ál., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2000, 169, 102). En otros casos el efecto principal de la deuteración es reducir el índice de la depuración sistémica. Como resultado, la semivida biológica del compuesto aumenta. Los beneficios clínicos potenciales incluirían la capacidad de mantener exposición sistémica similar con niveles máximos reducidos y niveles de depresión elevados. Esto puede resultar en efectos secundarios menores y eficacia potenciada, dependiendo de la relación farmacocinética/farmacodinámica particular del compuesto. ML-337 (C. J. Wenthur et ál., *J. Med. Chem.*, 2013, 56, 5208) y Odanacatib (K. Kassahun et ál., WO2012/112363) son ejemplos para este efecto del deuterio. Se han reportado aun otros casos en los cuales los índices reducidos de metabolismo resultan en un aumento de la exposición del fármaco sin cambiar el índice de depuración sistémica (por ejemplo Rofecoxib: F. Schneider et ál., *Arzneim. Forsch. / Drug. Res.*, 2006, 56, 295; Telaprevir: F. Maltais et ál., *J. Med. Chem.*, 2009, 52, 7993). Los fármacos deuterados que muestran este efecto pueden tener requisitos de dosificación reducidos (por ejemplo menor cantidad de dosis o menor dosificación para alcanzar el efecto deseado) y/o pueden producir menores cargas de metabolito.

Un compuesto de la fórmula general (I) puede tener múltiples sitios potenciales de ataque para metabolismo. Para optimizar los efectos antes descritos sobre propiedades fisico-químicas y perfil metabólico, se pueden seleccionar compuestos que contienen deuterio de la fórmula general (I) con determinado patrón de uno o más intercambios de deuterio-hidrógeno. Particularmente, los átomos de deuterio de compuestos que contienen deuterio de la fórmula general (I) se unen con un átomo de carbono y/o se ubican en esas posiciones del compuesto de la fórmula general (I), que son sitios de ataque para metabolizar enzimas tales como por ejemplo citocromo P₄₅₀.

Cuando se utilice la forma plural para compuestos, sales, polimorfos, hidratos, solvatos y similares, esto también significa un único compuesto, sal, polimorfo, isómero, hidrato, solvato o similar.

Un “compuesto estable” o “estructura estable”, se refiere a un compuesto que es lo suficientemente potente para sobrevivir el aislamiento a un nivel útil de pureza de una mezcla de reacción y su formulación en un agente terapéutico eficaz.

Los profármacos son derivados de un ingrediente activo. Los términos “ingrediente activo subyacente”, “fármaco correspondiente subyacente” y “fármaco correspondiente” se usan como sinónimos en la presente invención.

Los compuestos de la presente invención opcionalmente contienen un centro asimétrico, dependiendo de la ubicación y naturaleza de los diferentes sustituyentes deseados. Es posible que un átomo de carbono simétrico esté presente en la configuración (R) o (S) que puede resultar en mezclas racémicas. En determinados casos, es posible que la asimetría también esté presente debido a rotación limitada alrededor de un enlace dado, por ejemplo, el enlace central unido a dos anillos aromáticos sustituidos de los compuestos especificados. Los compuestos preferidos son aquellos que producen la actividad biológica más deseable. Los isómeros y estereoisómeros separados, puros o parcialmente purificados o mezclas racémicas de los compuestos de la presente invención también se incluyen en el alcance de la presente invención. La purificación y la separación de dichos materiales se pueden lograr por técnicas estándar conocidas en la técnica.

Los isómeros ópticos se pueden obtener mediante resolución de las mezclas racémicas de acuerdo con procesos convencionales por ejemplo, por la formación de sales diastereoméricas usando un ácido o base ópticamente activa o formación de diastereómeros covalentes. Ejemplos de ácidos apropiados son ácido tartárico, diacetiltartárico, ditoluoltartárico y canforsulfónico. Las mezclas diastereoméricas pueden ser separadas en sus diastereómeros individuales en función de sus diferencias físicas y/o químicas mediante métodos que son del conocimiento en la técnica, por ejemplo, por cromatografía o cristalización fraccionada. Las bases o ácidos ópticamente activos luego se liberan de las sales diastereoméricas separadas. Un proceso diferente para la separación de isómeros ópticos implica el uso de cromatografía quiral (por ejemplo columnas de HPLC usando una fase quiral) con o sin derivatización convencional óptimamente elegida para maximizar la separación de los enantiómeros. Las columnas de HPLC adecuadas usando una fase quiral están comercialmente disponibles tales como las fabricadas por Daicel, *por ejemplo*, Chiracel OD and Chiracel OJ, por ejemplo, entre muchos otros, que se pueden seleccionar de forma rutinaria. Las separaciones enzimáticas con o sin derivatización, también son útiles. Los compuestos ópticamente activos de la presente invención asimismo se pueden obtener por síntesis quiral usando materiales de partida ópticamente activos. Para distinguir diferentes tipos de isómeros entre sí se hace referencia a las normas IUPAC sección E (Pure Appl Chem 45, 11-30, 1976).

La presente invención incluye todos los estereoisómeros posibles de los compuestos de la presente invención como estereoisómeros simples o como cualquier mezcla de dichos estereoisómeros, por ejemplo, isómeros (R)- o (S)-, en cualquier proporción. El aislamiento de un solo estereoisómero,

por ejemplo, un solo enantiómero o un solo diastereómero, de un compuesto de la presente invención se alcanza por medio de cualquier método del estado de técnica, tal como cromatografía, especialmente cromatografía quiral, por ejemplo.

En el contexto de la presente invención, el término "enantioméricamente puro" se entiende como que el compuesto en cuestión con respecto a la configuración absoluta del centro quiral está presente en un exceso enantiomérico de más de 95%, preferentemente más de 97%. El exceso enantiomérico, ee, se calcula evaluando el cromatograma correspondiente HPLC en una fase quiral usando la fórmula a continuación:

$$ee = [E^A (\text{área}\%) - E^B (\text{área}\%)] \times 100\% / [E^A (\text{área}\%) + E^B (\text{área}\%)]$$

10 (E^A: enantiómero principal, E^B: enantiómero menor)

La presente invención también cubre formas útiles de los compuestos de la presente invención, tales como metabolitos, hidratos, solvatos, sales, en particular sales farmacéuticamente aceptables y/o co-precipitados.

Los compuestos de la presente invención pueden existir como un hidrato o como un solvato donde los compuestos de la presente invención contienen solventes polares, en particular agua, metanol o etanol por ejemplo, como elemento estructural de la estructura cristalina de los compuestos. Es posible que la cantidad de solventes polares, en particular agua, exista en una relación estequiométrica o no estequiométrica. En el caso de solvatos estequiométricos, *por ejemplo* un hidrato, hemi-, (semi-), mono-, sesqui-, di-, tri-, tetra-, penta- *etc.* son posibles solvatos o hidratos, respectivamente. La presente invención incluye todos dichos hidratos o solvatos. Los hidratos, en particular hemihidratos (semihidratos) son solvatos preferidos en el contexto de la presente invención.

Además, es posible que los compuestos de la presente invención existan en forma libre, por ejemplo, como una base libre, o como un ácido libre, o como un zwitterion o existan en la forma de una sal. Dicha sal puede ser cualquier sal, sal de adición orgánica o inorgánica, particularmente cualquier sal de adición inorgánica u orgánica farmacéuticamente aceptable, que se usa habitualmente en farmacia, o que se usa por ejemplo, para aislar o purificar los compuestos de la presente invención.

El término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a sales de adición inorgánicas u orgánicas de un compuesto de la presente invención. Por ejemplo, véase S. M. Berge, *et ál.* "Pharmaceutical Salts," J. Pharm. Sci. 1977, 66, 1-19.

Una sal farmacéuticamente aceptable adecuada de un compuesto de la presente invención que es suficientemente ácido, es una sal de metal alcalino, por ejemplo una sal de sodio, sal de potasio o sal de litio, una sal de metal alcalinotérreo, por ejemplo una sal de calcio, sal de magnesio o sal de estroncio, o una sal de aluminio o una sal de zinc, o una sal de amonio derivada de amoníaco o de una amina orgánica primaria, secundaria o terciaria con 1 a 20 átomos de carbono, tales como etilamina, dietilamina, trietilamina, etildiisopropilamina, monoetanolamina, dietanolamina,

trietanolamina, dicitclohexilamina, dimetilaminoetanol, dietilaminoetanol, tris(hidroximetil)aminometano, procaína, dibencilamina, *N*-metilmorfolino, arginina, lisina, 1,2-etilendiamina, *N*-metilpiperidina, *N*-metil-glucamina, *N,N*-dimetil-glucamina, *N*-etil-glucamina, 1,6-hexanodiamina, glucosamina, sarcosina, serinol, 2-amino-1,3-propanodiol, 3-amino-1,2-propanodiol, 4-amino-1,2,3-butanotriol, o una sal con un ion de amonio cuaternario con 1 a 20 átomos de carbono, tales como tetrametilamonio, tetraetilamonio, tetra(*n*-propil)amonio, tetra(*n*-butil)amonio, *N*-bencil-*N,N,N*-trimetilamonio, colina o benzalconio. Se prefiere una sal de sodio, sal de potasio, sal de litio, sal de calcio o sal de magnesio, se prefiere más una sal de potasio.

Las sales de metal alcalino y alcalinotérreo de compuestos ácidos de la presente invención se preparan haciendo reaccionar los compuestos de la presente invención con la base apropiada mediante una variedad de métodos conocidos.

La presente invención incluye todas las sales posibles de los compuestos de la presente invención como sales simples o como cualquier mezcla de dichas sales, en cualquier proporción.

En el presente texto, en particular la Sección Experimental, para la síntesis de intermedios y de ejemplos de la presente invención, cuando un compuesto se menciona como una forma salina con la base o el ácido correspondiente, la exacta composición estequiométrica de dicha forma salina, como se obtiene por la preparación y/o proceso de purificación correspondientes, es en la mayoría de los casos desconocida.

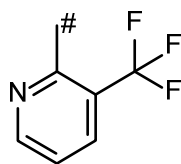
Salvo que se especifique lo contrario, los sufijos de nombres químicos o fórmulas estructurales con relación a sales, tales como "sal de sodio", "sal de potasio", o " $x \text{ Na}^+$ ", " $x \text{ K}^+$ ", por ejemplo, se refieren a una forma salina, cuya estequiometría no se especifica.

Esto se aplica de forma análoga a casos en los cuales se obtuvieron intermedios de síntesis o compuestos de ejemplos o sales de estos por los procesos de preparación y/o purificación descritos, como solvatos, tales como hidratos, con (si se define) composición estequiométrica desconocida.

Además, la presente invención incluye todas las formas cristalinas posibles o polimorfos de los compuestos de la presente invención como polimorfo simple o como mezcla de más de un polimorfo, en cualquier proporción.

Se prefieren compuestos de la fórmula general (I) donde

R^1 representa un grupo de la fórmula

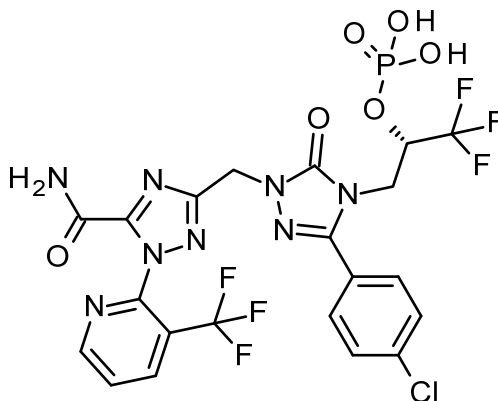


30

donde

representa el punto de unión con el anillo 1,2,4-triazolilo.

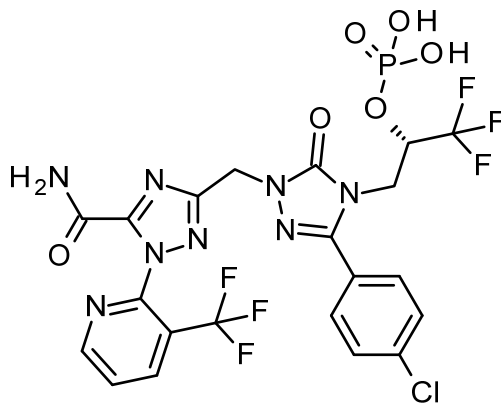
También se prefiere (2S)-3-[1-({5-Carbamoil-1-[3-(trifluorometil)piridin-2-il]-1H-1,2,4-triazol-3-il}metil)-3-(4-clorofenil)-5-oxo-1,5-dihidro-4H-1,2,4-triazol-4-il]-1,1,1-trifluoropropan-2-il dihidrógeno fosfato con la fórmula a continuación



5

o sales farmacéuticamente aceptables de estos, sus solvatos y solvatos de las sales de estos.

También se prefiere (2S)-3-[1-({5-Carbamoil-1-[3-(trifluorometil)piridin-2-il]-1H-1,2,4-triazol-3-il}metil)-3-(4-clorofenil)-5-oxo-1,5-dihidro-4H-1,2,4-triazol-4-il]-1,1,1-trifluoropropan-2-il dihidrógeno fosfato con la fórmula a continuación

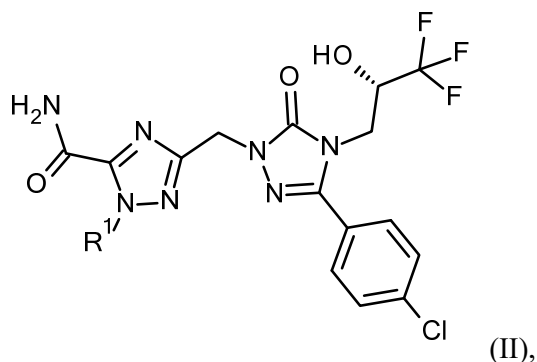


10

La presente invención cubre los compuestos de la fórmula general (I) que se describe en la Sección Ejemplos de este texto.

La invención proporciona además un proceso para preparar los compuestos de la fórmula general (I) o las sales farmacéuticamente aceptables de estos, sus solvatos o solvatos de las sales de estos, donde

15 [A] los compuestos de la fórmula



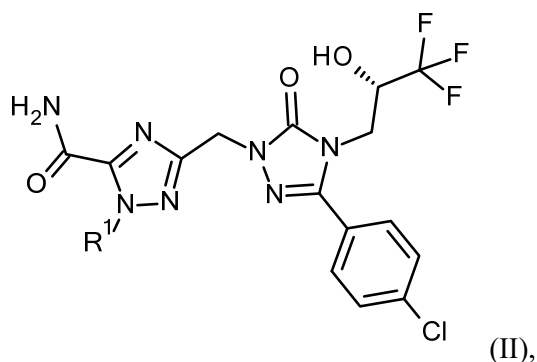
donde

R¹ tiene el significado como se define para los compuestos de la fórmula general (I) anteriormente,

- 5 se hacen reaccionar en el primer paso con oxicloruro de fósforo y en el segundo paso se hidrolizan para dar compuestos de la fórmula general (I),

o

[B] los compuestos de la fórmula



- 10 donde

R¹ tiene el significado como se define para los compuestos de la fórmula general (I) anteriormente,

se hacen reaccionar en el primer paso con tetrabencil difosfato y en el segundo paso los grupos bencilo se retiran en condiciones de reducción para dar compuestos de la fórmula general (I),

- 15 opcionalmente le sigue, cuando fuera apropiado, convertir los compuestos de la fórmula general (I) en sus correspondientes sales farmacéuticamente aceptables de estos, sus solvatos o los solvatos de las sales de estos por tratamiento con los solventes y/o bases correspondientes.

- El primer paso en la reacción [A] se realiza generalmente haciendo reaccionar un compuesto de la fórmula (II) con oxicloruro de fósforo en un solvente inerte en la presencia de una base,
- 20 opcionalmente en presencia de un aditivo, preferentemente en un intervalo de temperaturas de -10°C a +50°C, más preferentemente de 0°C a +30°C. Las reacciones se pueden realizar a presión

atmosférica, elevado o reducida (por ejemplo de 0,5 a 5 bar); en general, las reacciones se realizan a presión atmosférica.

Los solventes inertes son por ejemplo, hidrocarburos halogenados tales como diclorometano o triclorometano, éter tal como dietil éter o metil terc-butil éter, hidrocarburos tales como benceno o tolueno, u otros solventes tales como dioxano, dimetilformamida o tetrahidrofurano. Además, es posible usar mezclas de los solventes. Se prefiere tetrahidrofurano.

Bases adecuadas son, por ejemplo, bases orgánicas tales como trietilaminas, por ejemplo, trietilamina o diisopropilamina, o piridina. Se prefiere trietilamina.

Aditivos adecuados son, por ejemplo, 4-N,N-dimetilaminopiridina.

El segundo paso en la reacción [A] se realiza generalmente agregando una base o agua, preferentemente en un intervalo de temperaturas de -10°C a +50°C, más preferentemente de 0°C a +30°C. Las reacciones se pueden realizar a presión atmosférica, elevado o reducida (por ejemplo de 0,5 a 5 bar); en general, las reacciones se realizan a presión atmosférica.

Bases adecuadas son, por ejemplo, soluciones de hidróxidos de metal alcalino tales como hidróxido de sodio acuoso, hidróxido de litio acuoso o hidróxido de potasio acuoso, o hidrogenocarbonatos de metal alcalino acuoso tales como hidrogenocarbonato de sodio acuoso o hidrogenocarbonato de potasio acuoso, o carbonatos de metal alcalino acuoso tales como carbonato de sodio acuoso o carbonato de potasio acuoso. Se prefiere solución de hidrogenocarbonato de sodio acuoso.

El primer paso en la reacción [B] se realiza generalmente haciendo reaccionar un compuesto de la fórmula (II) con tetrabencil difosfato en un solvente inerte en la presencia de una base, preferentemente en un intervalo de temperaturas de -10°C a +50°C, más preferentemente de 0°C a +30°C. Las reacciones se pueden realizar a presión atmosférica, elevado o reducida (por ejemplo de 0,5 a 5 bar); en general, las reacciones se realizan a presión atmosférica.

Los solventes inertes son por ejemplo, hidrocarburos halogenados tales como diclorometano o triclorometano, éter tal como dietil éter o metil terc-butil éter, u otros solventes tales como dioxano, dimetilformamida o tetrahidrofurano. Además, es posible usar mezclas de los solventes. Se prefiere tetrahidrofurano.

Bases adecuadas son, por ejemplo, terc-butóxido de potasio o terc-butóxido de sodio, hidruro de sodio, N-butillitio, diisopropilamida de litio, bis(trimetilsilil)sodio amida o bis(trimetilsilil)-litio amida, se prefiere bis(trimetilsilil)litio amida.

El segundo paso en la reacción [B] se realiza generalmente con un agente de reducción en un solvente inerte, preferentemente en un intervalo de temperaturas de -10°C a +50°C, más preferentemente de 0°C a +30°C. Las reacciones se pueden realizar a presión atmosférica, elevado o reducida (por ejemplo de 0,5 a 5 bar); en general, las reacciones se realizan a presión atmosférica.

Los solventes inertes son por ejemplo, etanol o mezclas de dioxano y agua o tetrahidrofurano y agua. Se prefiere etanol.

Los agentes de reducción son por ejemplo, paladio sobre carbono e hidrógeno, dihidrógeno de paladio, dicloruro de estaño, tricloruro de titanio o formiato de amonio. Se prefiere paladio sobre carbono e hidrógeno.

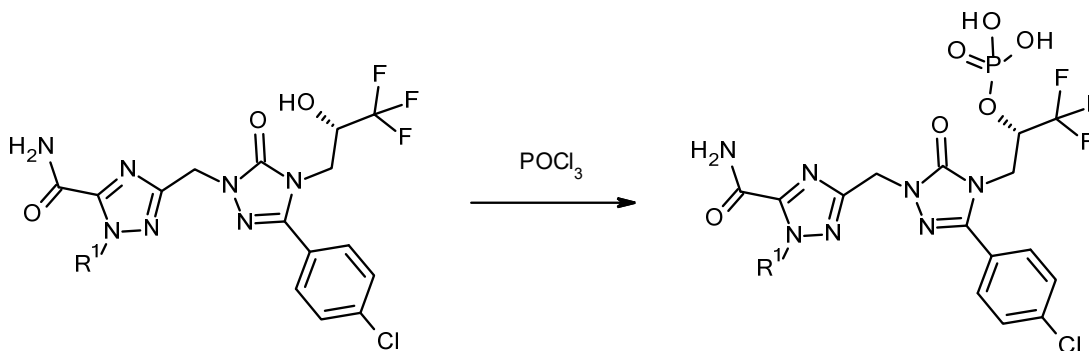
Los compuestos de la fórmula (II) están comercialmente disponibles, son conocidos en la bibliografía, o se pueden preparar a partir de materiales de partida fácilmente disponibles por adaptación de métodos estándar descritos en la bibliografía. Los procedimientos detallados y las referencias de la bibliografía para preparar los materiales de partida también se pueden encontrar en la Parte Experimental en la sección en la preparación de los materiales de partida e intermedios.

La Presente invención cubre métodos para preparar compuestos de la presente invención de la fórmula general (I), dichos métodos comprenden los pasos como se describe en la Sección Experimental en la presente.

Los esquemas y procedimientos descritos a continuación ilustran vías sintéticas para los compuestos de la fórmula general (I) de la invención y no pretenden ser taxativos.

La preparación de los compuestos de la invención se puede ilustrar por medio del siguiente esquema sintético:

Esquema 1



Los compuestos de la fórmula general (I) de la presente invención se pueden convertir en cualquier sal, preferentemente sales farmacéuticamente aceptables, como se describe en la presente, por cualquier método que sea conocido por el experto en la técnica. De manera similar, cualquier sal de un compuesto de la fórmula general (I) de la presente invención se puede convertir en el compuesto libre, por cualquier método que sea conocido por el experto en la técnica.

Los compuestos de la presente invención tienen propiedades farmacológicas valiosas y se pueden usar para la prevención y/o tratamiento de varias enfermedades y estados inducidos por enfermedades en humanos y otros mamíferos. Los compuestos de la fórmula general (I) de la presente invención demuestra un espectro farmacológico de acción y perfil farmacocinético valiosos. Se descubrió de

forma sorprendente que los compuestos de la presente invención inhiben de forma eficaz el receptor de vasopresina V1a y por lo tanto es posible que dichos compuestos se usen para el tratamiento y/o prevención de enfermedades, preferentemente enfermedades renales y cardiovasculares en humanos y animales.

- 5 En el contexto de la presente invención, el término “tratamiento” o “tratar” incluye inhibir, demorar, aliviar, mitigar, detener, reducir, o provocar la regresión de una enfermedad, trastorno, afección o estado, el desarrollo y/o evolución de estos y/o los síntomas de estos. El término “prevención” o “prevenir” incluye reducir el riesgo de tener, contraer o experimentar una enfermedad, trastorno, afección o estado, el desarrollo y/o evolución de estos y/o los síntomas de estos. El término
- 10 prevención incluye profilaxis. El tratamiento o prevención de una enfermedad, trastorno, afección o estado puede ser parcial o completo.

A lo largo de este documento, para mayor simplicidad, se prefiere el uso de lenguaje singular y no plural, pero generalmente se pretende incluir el plural si no se declara lo contrario. Por ejemplo, la expresión “Un método para tratar una enfermedad en un paciente, que comprende administrarle a un

15 paciente una cantidad eficaz de un compuesto de la fórmula general (I)” pretende incluir el tratamiento simultáneo de más de una enfermedad así como la administración de más de un compuesto de la fórmula general (I).

Los compuestos de la presente invención son antagonistas altamente potentes y en particular selectivos del receptor de vasopresina V1a. Los compuestos de la invención por lo tanto se espera

20 que sean altamente valiosos como agentes terapéuticos para el tratamiento y/o prevención de enfermedades, en particular para el tratamiento y/o prevención de enfermedades renales y cardiovasculares.

Tal como se usa en la presente, el término “antagonista del receptor de vasopresina V1a” se refiere a un compuesto que funciona inhibiendo (parcial o completamente) o bloqueando el receptor de

25 vasopresina V1a, así evitando la activación del receptor por vasopresina.

En una modalidad, los fármacos correspondientes subyacentes de los compuestos descritos en la presente son activos en el receptor V1a. En otra modalidad los fármacos correspondientes subyacentes de los compuestos descritos en la presente muestran inhibición del receptor V1a de acuerdo con el estudio en B-4 con una $IC_{50} < 100$ nM. En otra modalidad los fármacos

30 correspondientes subyacentes de los compuestos descritos en la presente muestran inhibición del receptor V1a de acuerdo con el estudio en B-4 con una $IC_{50} < 20$ nM. En otra modalidad los fármacos correspondientes subyacentes de los compuestos descritos en la presente muestran inhibición del receptor V1a de acuerdo con el estudio en B-4 con una $IC_{50} < 10$ nM. En otra modalidad los fármacos correspondientes subyacentes de los compuestos descritos en la presente muestran inhibición del

35 receptor V1a de acuerdo con el estudio en B-4 con una $IC_{50} < 5$ nM.

- En una modalidad adicional, los fármacos correspondientes subyacentes de los compuestos descritos en la presente son selectivamente activos en el receptor V1a, y son menos activos, sustancialmente menos activos, y/o inactivos en otros receptores de vasopresina, tales como los subtipos V1b y/o V2. En otra modalidad, los **fármacos correspondientes subyacentes** de los compuestos descritos en la presente son al menos 10 veces selectivos para el receptor V1a en comparación con el receptor V2 como se determina de acuerdo con el estudio en B-4. En otra modalidad, los **fármacos correspondientes subyacentes** de los compuestos descritos en la presente son al menos 15 veces selectivos para el receptor V1a en comparación con el receptor V2 como se determina de acuerdo con el estudio en B-4. En otra modalidad, los **fármacos correspondientes subyacentes** de los compuestos descritos en la presente son al menos 20 veces selectivos para el receptor V1a en comparación con el receptor V2 como se determina de acuerdo con el estudio en B-4. En otra modalidad, los **fármacos correspondientes subyacentes** de los compuestos descritos en la presente son al menos 30 veces selectivos para el receptor V1a en comparación con el receptor V2 como se determina de acuerdo con el estudio en B-4.
- Los compuestos de acuerdo con la invención son adecuados para el tratamiento y/o prevención de enfermedades renales, en particular de enfermedades renales agudas y crónicas, enfermedades renales diabéticas y de insuficiencia renal aguda y crónica. Los términos “enfermedad renal” o “enfermedad del riñón” describen una clase de afecciones donde los riñones fallan al filtrar y retirar los desperdicios de la sangre. Hay dos formas principales de enfermedad renal: enfermedad renal aguda (lesión renal aguda, AKI) y enfermedad renal crónica (CKD). Los compuestos de acuerdo con la invención además se pueden usar para el tratamiento y/o prevención de secuelas de lesión renal aguda que surgen de múltiples lesiones tales como lesión por reperfusión-isquemia, administración por radiocontraste, cirugía de bypass cardiopulmonar, choque y sepsis. En el sentido de la presente invención, el término falla renal o insuficiencia renal comprende manifestaciones agudas y crónicas de insuficiencia renal, así como enfermedades renales subyacentes o relacionadas tales como hipoperfusión renal, hipotensión intradialítica, uropatía obstructiva, glomerulopatías, nefropatía IgA, glomerulonefritis, glomerulonefritis aguda, glomeruloesclerosis, enfermedades tubulointersticiales, enfermedades nefropáticas tales como enfermedad renal primaria y congénita, nefritis, síndrome de Alport, inflamación renal, enfermedades renales inmunológicas tales como rechazo al trasplante renal, enfermedades renales inducidas por complejo inmunitario, nefropatía inducida por sustancias tóxicas, nefropatía inducida por medio de contraste; glomerulonefritis de cambio mínimo (lipóide); glomerulonefritis membranosa; glomerulosclerosis segmentaria focal (FSGS); síndrome urémico hemolítico (HUS), amiloidosis, síndrome de Goodpasture, granulomatosis de Wegener, Púrpura Schönlein-Henoch, nefropatía diabética y no diabética, pielonefritis, quistes renales, nefroesclerosis, nefroesclerosis hipertensiva y síndrome nefrótico, que se pueden caracterizar de forma diagnóstica, por ejemplo, por creatinina reducida anormalmente y/o excreción de agua, concentraciones de urea, nitrógeno, potasio y/o creatinina en sangre aumentadas anormalmente, actividad alterada de enzimas

- renales tales como, por ejemplo, glutamil sintetasa, osmolalidad alterada en la orina o volumen de orina, microalbuminuria elevada, macroalbuminuria, lesiones de glomérulos y arteriolas, dilatación tubular, hiperfosfataemia y/o la necesidad de diálisis. La presente invención también comprende el uso de los compuestos de acuerdo con la invención para el tratamiento y/o prevención de secuelas
- 5 de insuficiencia renal, por ejemplo, edema pulmonar, insuficiencia cardíaca, uremia, anemia, alteraciones de electrolitos (*por ejemplo* hiperpotasemia, Hiponatremia) y alteraciones en el metabolismo de carbohidratos y huesos. Los compuestos de acuerdo con la invención también son adecuados para el tratamiento y/o prevención de enfermedad renal poliquística (PCKD) y del síndrome de secreción inadecuada de ADH (SIADH).
- 10 Enfermedades cardiovasculares en este contexto que se pueden tratar y/o prevenir con los compuestos de la invención incluyen, de modo no taxativo, las siguientes: insuficiencia cardíaca aguda y crónica que incluye falla cardíaca crónica empeorada (u hospitalización por insuficiencia cardíaca) y que incluye insuficiencia cardíaca congestiva, hipertensión arterial, hipertensión resistente, hipertensión pulmonar arterial, enfermedad cardíaca coronaria, angina pectoris estable e
- 15 inestable, arritmias atriales y ventriculares, alteraciones del ritmo atrial y ventricular y arritmias de conducción, por ejemplo bloques atrioventriculares de grado I-III (AVB I-III), de taquiarritmia supraventricular, fibrilación atrial, palpitación atrial, fibrilación ventricular, palpitación ventricular, taquiarritmia ventricular, taquicardia torsade-de-pointes, extrasístole atrial y ventricular, extrasístole de unión AV, síndrome del seno enfermo, síncope, taquicardia de reentrada del nodo AV y síndrome
- 20 Wolff-Parkinson-White, síndrome coronario agudo (ACS), enfermedades cardíacas autoinmunes (pericarditis, endocarditis, valvulitis, aortitis, cardiomiopatías), choque tal como choque cardiogénico, choque séptico y choque anafiláctico, aneurismas, cardiomiopatía de Boxer (contracción ventricular prematura), otras enfermedades tromboembólicas e isquemias tales como alteraciones de perfusión periférica, lesión por reperfusión, trombosis arterial y venosa, insuficiencia
- 25 del miocardio, disfunción endotelial, daño micro y macrovascular (vasculitis) y para prevenir restenosis tal como terapias post trombosis, angioplastia transluminal percutánea (PTA), angioplastia coronaria transluminal percutánea (PTCA), trasplante cardíaco y operaciones de bypass, arteriosclerosis, alteraciones del metabolismo de lípidos, hipolipoproteínemias, dislipidemias, hipertrigliceridemias, hiperlipidemias e hiperlipidemias combinadas, hipercolesterolaemias,
- 30 abetalipoproteinemia, sitosterolemia, xantomatosis, enfermedad de Tangier, adipositas, obesidad, síndrome metabólico, ataques transitorios e isquémicos, apoplejía, enfermedades cardiovasculares inflamatorias, enfermedades vasculares periféricas y cardíacas, trastornos de circulación periférica, espasmos de arterias coronarias y arterias periféricas, y edema tal como, por ejemplo, edema pulmonar, edema cerebral, edema renal y edema relacionado con insuficiencia cardíaca.
- 35 En el sentido de la presente invención, el término insuficiencia cardíaca también incluye formas de enfermedad más específicas o relacionadas tales como insuficiencia cardíaca derecha, insuficiencia

cardiaca izquierda, insuficiencia global, cardiomiopatía isquémica, cardiomiopatía dilatativa, defectos cardiacos congénitos, defectos de la válvula cardiaca, insuficiencia cardiaca con defectos de la válvula cardiaca, estenosis de la válvula mitral, insuficiencia de la válvula mitral, estenosis de la válvula aórtica, insuficiencia de la válvula aórtica, estenosis tricúspide, insuficiencia tricúspide, 5 estenosis de la válvula pulmonar, insuficiencia de la válvula pulmonar, defectos de la válvula cardiaca combinada, inflamación del músculo cardiaco (miocarditis), miocarditis crónica, miocarditis aguda, miocarditis viral, insuficiencia cardiaca diabética, cardiomiopatía de alcohol y tóxica, enfermedades de almacenamiento cardiaco, insuficiencia cardiaca con fracción de eyección conservada (HFpEF o insuficiencia cardiaca diastólica), e insuficiencia cardiaca con fracción de 10 eyección reducida (HFrEF o insuficiencia cardiaca sistólica).

Los compuestos de la presente invención se pueden usar particularmente para el tratamiento y/o prevención del síndrome cardiorenal (CRS) y sus diferentes subtipos. El término comprende determinados trastornos del corazón y los riñones por medio de los cuales disfunción aguda o crónica en un órgano pueden inducir disfunción aguda o crónica en el otro.

15 Además, los compuestos de acuerdo con la invención se pueden usar para el tratamiento y/o prevención de enfermedad arterial periférica (PAD) que incluye claudicación e incluye isquemia de extremidad crítica así como disfunción microvascular coronaria (CMD) que incluye CMD tipo 1-4, fenómeno primario y secundario de Raynaud, alteraciones en la microcirculación, claudicación, neuropatías periféricas y autonómicas, microangiopatías diabéticas, retinopatía diabética, úlceras en 20 extremidad diabética, gangrena, síndrome de CREST, trastornos eritematosos, enfermedades reumáticas y para promover la cicatrización.

Además, los compuestos de la invención son adecuados para tratar enfermedades urológicas y enfermedades del sistema urogenital masculino y femenino tales como, por ejemplo, síndrome prostático benigno (BPS), hiperplasia prostática benigna (BPH), agrandamiento prostático benigno 25 (BPE), obstrucción de la salida de la vejiga (BOO), síndromes del tracto urinario inferior (LUTS), vejiga hiperactiva neurogénica (OAB), cistitis intersticial (IC), incontinencia urinaria (UI) tales como por ejemplo, incontinencia mixta, imperiosa, por estrés y excesiva (MUI, UUI, SUI, OUI), dolores pélvicos, disfunción eréctil, dismenorrea y endometriosis.

Los compuestos de acuerdo con la invención también se pueden usar para el tratamiento y/o 30 prevención de enfermedades inflamatorias, enfermedades asmáticas, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS), lesión pulmonar aguda (ALI), deficiencia de alfa-1-antitripsina (AATD), fibrosis pulmonar, enfisema pulmonar (*por ejemplo* enfisema pulmonar inducido por tabaco) y fibrosis quística (CF). Además, los compuestos de la invención se pueden usar para el tratamiento y/o prevención de hipertensión arterial pulmonar 35 (PAH) y otras formas de hipertensión pulmonar (PH), que incluye hipertensión pulmonar asociada con enfermedad ventricular izquierda, infección por VIH, anemia de células falciformes,

tromboembolismo (CTEPH), sarcoidosis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) o fibrosis pulmonar.

Además, los compuestos de acuerdo con la invención se pueden usar para el tratamiento y/o prevención de cirrosis hepática, ascitis, diabetes mellitus y complicaciones diabéticas tales como, por ejemplo, neuropatía y nefropatía.

Además, los compuestos de la invención se pueden usar para el tratamiento y/o prevención de trastornos nerviosos centrales tales como estados de ansiedad, depresión, glaucoma, cáncer tal como en particular tumores pulmonares, y desregulación del ritmo circadiano tal como jet lag y trabajo por turnos.

Además, los compuestos de acuerdo con la invención se pueden usar para el tratamiento y/o prevención de afecciones de dolor, enfermedad de los adrenales tales como, feocromocitoma y apoplejía adrenal, enfermedades del intestino tales como, por ejemplo, enfermedad de Crohn y diarrea, trastornos menstruales tales como, por ejemplo, dismenorrea, endometriosis, parto prematuro y tocolisis.

Debido a su perfil de selectividad y actividad se cree que los compuestos de la presente invención son particularmente adecuados para el tratamiento y/o prevención de enfermedades renales agudas y crónicas que incluyen nefropatía diabética, insuficiencia cardíaca crónica y aguda, preeclampsia, enfermedad arterial periférica (PAD), disfunción microvascular coronaria (CMD), síndrome de Raynaud y dismenorrea.

Las enfermedades mencionadas anteriormente han sido caracterizadas en humanos pero también existen con una etiología comparable en otros mamíferos, y se pueden tratar en estos con los compuestos y métodos de la presente invención.

Entonces, la presente invención se refiere al uso de los compuestos de acuerdo con la invención para el tratamiento y/o prevención de enfermedades, especialmente las enfermedades antes mencionadas.

La presente invención se refiere además al uso de los compuestos de acuerdo con la invención para preparar una composición farmacéutica para el tratamiento y/o prevención de enfermedades, especialmente las enfermedades antes mencionadas.

La presente invención se refiere además al uso de los compuestos de acuerdo con la invención a un método para el tratamiento y/o prevención de enfermedades, especialmente las enfermedades antes mencionadas.

La presente invención también se refiere a un método para el tratamiento y/o prevención de enfermedades, especialmente las enfermedades antes mencionadas, usando una cantidad eficaz de al menos uno de los compuestos de acuerdo con la invención.

De acuerdo con otro aspecto, la presente invención cubre combinaciones farmacéuticas, en particular medicamentos, que comprenden al menos un compuesto de la fórmula general (I) de la presente invención y al menos otro ingrediente activo, en particular para el tratamiento y/o prevención de enfermedades, especialmente las enfermedades antes mencionadas.

5 Particularmente, la presente invención cubre una combinación farmacéutica que comprende:

- uno o más primeros ingredientes activos, en particular compuestos de fórmula general (I) como se define anteriormente, y
- uno o más ingredientes activos adicionales, en particular para el tratamiento y/o prevención de enfermedades, especialmente de las enfermedades antes mencionadas.

10 El término “combinación” en la presente invención se usa como lo conocen los expertos en la técnica, siendo posible que dicha combinación sea una combinación fija, una combinación no fija o un kit de partes.

Una “combinación fija” en la presente invención se usa como lo conocen los expertos en la técnica y se define como una combinación donde, por ejemplo, un primer ingrediente activo, tal como uno
15 o más compuestos de la fórmula general (I) de la presente invención, y un ingrediente activo adicional se presentan juntos en una dosificación unitaria o en una sola entidad. Un ejemplo de una “combinación fija” es una composición fija donde un primer ingrediente activo y otro ingrediente activo adicional están presentes mezclados para la administración simultánea, tal como en una formulación. Otro ejemplo de una “combinación fija” es una combinación farmacéutica donde un
20 primer ingrediente activo y otro ingrediente activo adicional están presentes en una unidad sin mezclarse.

Una combinación no fija o “kit de partes” en la presente invención se usa como lo conocen los expertos en la técnica y se define como una combinación donde un primer ingrediente activo y otro ingrediente activo están presentes en más de una unidad. Un ejemplo de una combinación no fija o
25 kit de partes es una combinación donde el primer ingrediente activo y el otro ingrediente activo están presentes por separado. Es posible que los componentes de la combinación no fija o kit de partes se administren por separado, como secuencia, simultáneamente, al mismo tiempo o de manera escalonada cronológicamente.

Los compuestos de la presente invención se pueden administrar como el agente farmacéutico solo o
30 en combinación con uno o más ingredientes farmacéuticamente activos donde la combinación causa efectos adversos no aceptables. La presente invención también cubre dichas combinaciones farmacéuticas. Por ejemplo, los compuestos de la presente invención se pueden combinar con agentes conocidos para el tratamiento y/o prevención de enfermedades, especialmente de las enfermedades antes mencionadas.

En particular los compuestos de la presente invención se pueden usar en combinación fija o separada con

- agentes antitrombóticos, por ejemplo y preferentemente del grupo de los inhibidores de agregación plaquetaria, anticoagulantes y sustancias profibrinolíticos;
- 5 • agentes reductores de la presión arterial, por ejemplo y preferentemente del grupo de antagonistas de calcio, antagonistas de angiotensina AII, inhibidores de ACE, inhibidores de NEP, inhibidores de vasopectidasa, antagonistas de endotelina, inhibidores de renina, bloqueadores alfa, bloqueadores beta, antagonistas de del receptor de mineralocorticoides y diuréticos;
- 10 • agentes antidiabéticos (agentes hipoglicémicos o antihiperlipémicos), tales como por ejemplo y preferentemente insulina y derivados, sulfonilureas, biguanidas, tiazolidindionas, acarbosa, inhibidores de DPP4, análogos de GLP-1, o inhibidores de SGLT (gliflozins);
- nitratos orgánicos y donantes NO, por ejemplo nitroprusiato de sodio, nitroglicerina, isosorbida mononitrato, isosorbida dinitrato, molsidomina o SIN-1, y NO por inhalación;
- 15 • compuestos que inhiben la degradación de monofosfato de guanosina cíclico (cGMP), por ejemplo inhibidores de fosfodiesterasas (PDE) 1, 2, 5 y/o 9, en particular inhibidores de PDE-5 tales como sildenafil, vardenafil, tadalafil, udenafil, dasantafil, avanafil, mirodenafil, lodenafil, CTP-499 o PF-00489791;
- agentes inotrópicos positivos, tales como por ejemplo glucósidos cardiacos (digoxin) y agonistas beta-adrenérgicos y dopaminérgicos tales como isoproterenol, adrenalina, noradrenalina, dopamina o dobutamina;
- 20 • péptidos natriuréticos, tales como por ejemplo péptido natriurético atrial (ANP, anaritida), péptido natriurético de tipo B o péptido natriurético cerebral (BNP, nesiritida), péptido natriurético de tipo C (CNP) o urodilatina;
- sensibilizadores del calcio, tales como por ejemplo y preferentemente levosimendán;
- 25 • Los activadores hemo- y No-independientes de guanilato ciclasa soluble (sGC), por ejemplo y preferentemente los compuestos descritos en WO 01/19355, WO 01/19776, WO 01/19778, WO 01/19780, WO 02/070462 y WO 02/070510;
- Los estimulantes No-independientes pero hemo-dependientes de guanilato ciclasa soluble (sGC), por ejemplo y preferentemente los compuestos descritos en 00/06568, WO 00/06569, WO 02/42301, WO 03/095451, WO 2011/147809, WO 2012/004258, WO 2012/028647 y WO 30 2012/059549;
- agentes que estimulan la síntesis de cGMP, por ejemplo y preferentemente moduladores sGC, por ejemplo y preferentemente riociguat, cinaciguat, vericiguat o BAY 1101042;

- inhibidores de elastasa de neutrófilo humana (HNE), tales como por ejemplo sivelestat o DX-890 (reltran);
- compuestos que inhiben la cascada de transducción de señal, en particular inhibidores de tirosina y/o serina/treonina cinasa, tales como por ejemplo nintedanib, dasatinib, nilotinib, bosutinib, regorafenib, sorafenib, sunitinib, cediranib, axitinib, telatinib, imatinib, brivanib, pazopanib, vatalanib, gefitinib, erlotinib, lapatinib, canertinib, lestaurtinib, pelitinib, semaxanib o tandutinib;
- compuestos que influyen en el metabolismo energético del corazón, tales como por ejemplo y preferentemente etomoxir, dicloroacetato, ranolazina o trimetazidina, o agonistas del receptor de adenosina A1 parcial o completo tales como GS-9667 (antes conocido como CVT-3619), capadenoson y neladenoson bialanato (BAY 1067197);
- compuestos que influyen en la frecuencia cardiaca, tales como por ejemplo y preferentemente ivabradina;
- activadores de miosina cardiaca, tales como por ejemplo y preferentemente omecamtiv mecarbil (CK-1827452);
- fármacos antiinflamatorios tales como fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID) que incluyen ácido acetilsalicílico (aspirina), ibuprofeno y naproxeno, glucocorticoides tales como por ejemplo y preferentemente prednisona, prednisolona, metilprednisolona, triamcinolona, dexametasona, beclometasona, betametasona, flunisolida, budesonida o fluticasona, o derivados del ácido 5-aminosalicílico, antagonistas de leucotrieno, inhibidores de TNF-alfa y antagonistas del receptor de quimiocina tales como inhibidores de CCR1, 2 y/o 5;
- agentes que alteran el metabolismo de la grasa, por ejemplo y preferentemente del grupo de agonistas del receptor tiroideo, inhibidores de la síntesis de colesterol, tales como por ejemplo y preferentemente inhibidores de la síntesis de HMG-CoA-reductasa o escualeno, inhibidores de ACAT, inhibidores de CETP, inhibidores de MTP, agonistas PPAR-alfa, PPAR-gamma y/o PPAR-delta, inhibidores de la absorción de colesterol, inhibidores de lipasa, adsorbentes de ácido biliar polimérico, inhibidores de la reabsorción del ácido biliar y antagonistas de lipoproteína(a).

Se prefiere que se entienda que los agentes antitrombóticos son compuestos del grupo de inhibidores de agregación plaquetaria, anticoagulantes y sustancias profibrinolíticas.

En una modalidad preferida de la invención, los compuestos de acuerdo con la invención se administran en combinación con un inhibidor de agregación plaquetaria, por ejemplo y preferentemente aspirina, clopidogrel, ticlopidina o dipiridamol.

En una modalidad preferida de la invención, los compuestos de acuerdo con la invención se administran en combinación con un inhibidor de trombina, por ejemplo y preferentemente ximelagatran, dabigatran, melagatran, bivalirudina o enoxaparina.

En una modalidad preferida de la invención, los compuestos de acuerdo con la invención se administran en combinación con un antagonista de GPIIb/IIIa, por ejemplo y preferentemente tirofiban o abciximab.

5 En una modalidad preferida de la invención, los compuestos de acuerdo con la invención se administran en combinación con un inhibidor del factor Xa, por ejemplo y preferentemente rivaroxaban, apixaban, otamixaban, fidexaban, razaxaban, fondaparinux, idraparinux, DU-176b, PMD-3112, YM-150, KFA-1982, EMD-503982, MCM-17, MLN-1021, DX 9065a, DPC 906, JTV 803, SSR-126512 o SSR-128428.

10 En una modalidad preferida de la invención, los compuestos de acuerdo con la invención se administran en combinación con heparina o un derivado de heparina de bajo peso molecular (LMW).

En una modalidad preferida de la invención, los compuestos de acuerdo con la invención se administran en combinación con un antagonista de vitamina K, por ejemplo y preferentemente coumarina.

15 Los agentes reductores de la presión arterial son preferentemente compuestos del grupo de antagonistas de calcio, antagonistas de angiotensina AII, inhibidores de ACE, inhibidores de NEP, inhibidores de vasopectidasa, antagonistas de endotelina, inhibidores de renina, bloqueadores alfa, bloqueadores beta, antagonistas de del receptor de mineralocorticoides y diuréticos.

20 En una modalidad preferida de la invención, los compuestos de acuerdo con la invención se administran en combinación con un antagonista de calcio, por ejemplo y preferentemente nifedipina, amlodipina, verapamil o diltiazem.

En una modalidad preferida de la invención, los compuestos de acuerdo con la invención se administran en combinación con un bloqueador del receptor alfa-1, por ejemplo y preferentemente prazosina o tamsulosina.

25 En una modalidad preferida de la invención, los compuestos de acuerdo con la invención se administran en combinación con un bloqueador beta, por ejemplo y preferentemente propranolol, atenolol, timolol, pindolol, alprenolol, oxprenolol, penbutolol, bupranolol, metipranolol, nadolol, mepindolol, carazolol, sotalol, metoprolol, betaxolol, celiprolol, bisoprolol, carteolol, esmolol, labetalol, carvedilol, adaprolol, landiolol, nebivolol, epanolol o bucindolol.

30 En una modalidad preferida de la invención, los compuestos de acuerdo con la invención se administran en combinación con un antagonista del receptor de angiotensina AII, por ejemplo y preferentemente losartán, candesartán, valsartán, telmisartán, irbesartán, olmesartán, eprosartán, embursartán o azilsartán.

En una modalidad preferida de la invención, los compuestos de acuerdo con la invención se administran en combinación con un inhibidor de vasopeptidasa o inhibidor de endopeptidasa neutra (NEP), tal como por ejemplo y preferentemente sacubitril, omapatrilat o AVE-7688.

5 En una modalidad preferida de la invención, los compuestos de acuerdo con la invención se administran en combinación con un antagonista del receptor de angiotensina doble AII/inhibidor de NEP (ARNI), por ejemplo y preferentemente LCZ696.

En una modalidad preferida de la invención, los compuestos de acuerdo con la invención se administran en combinación con un inhibidor de ACE, por ejemplo y preferentemente enalapril, captopril, lisinopril, ramipril, delapril, fosinopril, quinopril, perindopril, benazepril otrandopril.

10 En una modalidad preferida de la invención, los compuestos de acuerdo con la invención se administran en combinación con un antagonista de endotelina, por ejemplo y preferentemente bosentan, darusentan, ambrisentan, tezosentan, sitaxsentan, avosentan, macitentan o atrasentan.

En una modalidad preferida de la invención, los compuestos de acuerdo con la invención se administran en combinación con un inhibidor de renina, por ejemplo y preferentemente aliskiren,
15 SPP-600 o SPP-800.

En una modalidad preferida de la invención, los compuestos de acuerdo con la invención se administran en combinación con un antagonista del receptor de mineralocorticoides, por ejemplo y preferentemente finerenona, espironolactona, canrenona, canrenoato de potasio, eplerenona, esaxerenona (CS-3150), o apararenona (MT-3995), CS-3150, o MT-3995.

20 En una modalidad preferida de la invención los compuestos de acuerdo con la invención se administran en combinación con un diurético tal como por ejemplo y preferentemente furosemida, bumetanida, piretanida, torsemida, bendroflumetiazida, clorotiazida, hidroclorotiazida, xipamida, indapamida, hidroflumetiazida, meticlotiazida, politiazida, triclorometiazida, clorotalidona, metolazona, quinetazona, acetazolamida, diclorofenamida, metazolamida, glicerina, isosorbida, manitol,
25 amilorida o triamtereno.

Los agentes que alteran el metabolismo de la grasa se entiende son preferentemente compuestos del grupo de inhibidores de CETP, agonistas del receptor tiroideo, inhibidores de la síntesis de colesterol tales como inhibidores de la síntesis de HMG-CoA-reductasa o escualeno, inhibidores de ACAT, inhibidores de MTP, agonistas PPAR-alfa, PPAR-gamma y/o PPAR-delta, inhibidores de la
30 absorción de colesterol, adsorbentes del ácido biliar polimérico, inhibidores de la reabsorción del ácido biliar, inhibidores de lipasa y antagonistas de lipoproteína(a).

En una modalidad preferida de la invención, los compuestos de acuerdo con la invención se administran en combinación con un inhibidor de CETP, por ejemplo y preferentemente dalcetrapib, anacetrapib, BAY 60-5521 o vacuna CETP (Avant).

En una modalidad preferida de la invención, los compuestos de acuerdo con la invención se administran en combinación con un agonista del receptor tiroideo, por ejemplo y preferentemente D-tiroxina, 3,5,3'-triiodotironina (T3), CGS 23425 o axitirom (CGS 26214).

5 En una modalidad preferida de la invención, los compuestos de acuerdo con la invención se administran en combinación con un inhibidor de HMG-CoA-reductasa de la clase de estatinas, por ejemplo y preferentemente lovastatina, simvastatina, pravastatina, fluvastatina, atorvastatina, rosuvastatina o pitavastatina.

10 En una modalidad preferida de la invención, los compuestos de acuerdo con la invención se administran en combinación con un inhibidor para la síntesis de escualeno, por ejemplo y preferentemente BMS-188494 o TAK-475.

En una modalidad preferida de la invención, los compuestos de acuerdo con la invención se administran en combinación con un inhibidor de ACAT, por ejemplo y preferentemente avasimiba, melinamida, pactimiba, eflucimiba o SMP-797.

15 En una modalidad preferida de la invención, los compuestos de acuerdo con la invención se administran en combinación con un inhibidor de MTP, por ejemplo y preferentemente implitapida, R-103757, BMS-201038 o JTT-130.

En una modalidad preferida de la invención, los compuestos de acuerdo con la invención se administran en combinación con un agonista de PPAR-gamma, por ejemplo y preferentemente pioglitazona o rosiglitazona.

20 En una modalidad preferida de la invención, los compuestos de acuerdo con la invención se administran en combinación con un agonista de PPAR-delta, por ejemplo y preferentemente GW 501516 o BAY 68-5042.

25 En una modalidad preferida de la invención, los compuestos de acuerdo con la invención se administran en combinación con un inhibidor para la absorción de colesterol, por ejemplo y preferentemente ezetimiba, tiquesida o pamaquesida.

En una modalidad preferida de la invención, los compuestos de acuerdo con la invención se administran en combinación con un inhibidor de lipasa, por ejemplo y preferentemente orlistat.

30 En una modalidad preferida de la invención, los compuestos de acuerdo con la invención se administran en combinación con un adsorbente del ácido biliar polimérico, por ejemplo y preferentemente colestiramina, colestipol, colesolvam, CholestaGel o colestimida.

En una modalidad preferida de la invención, los compuestos de acuerdo con la invención se administran en combinación con un inhibidor de la reabsorción de ácido biliar, por ejemplo y preferentemente inhibidores ASBT (= IBAT) tales como AZD-7806, S-8921, AK-105, BARI-1741, SC-435 o SC-635.

En una modalidad preferida de la invención, los compuestos de acuerdo con la invención se administran en combinación con un antagonista de lipoproteína(a), por ejemplo y preferentemente gemcabeno calcio (CI-1027) o ácido nicotínico.

- 5 En una modalidad preferida de la invención, los compuestos de acuerdo con la invención se administran en combinación con un antagonista TGFbeta, a modo de ejemplo y se prefiere pirfenidona o fresolimumab.

En una modalidad preferida de la invención, los compuestos de acuerdo con la invención se administran en combinación con inhibidores de HIF-PH, a modo de ejemplo y se prefiere molidustat o roxadustat.

- 10 En una modalidad preferida de la invención, los compuestos de acuerdo con la invención se administran en combinación con un antagonista CCR2, a modo de ejemplo y se prefiere CCX-140.

En una modalidad preferida de la invención, los compuestos de acuerdo con la invención se administran en combinación con un antagonista TNFalfa, a modo de ejemplo y se prefiere adalimumab.

- 15 En una modalidad preferida de la invención, los compuestos de acuerdo con la invención se administran en combinación con un inhibidor de galectina-3, a modo de ejemplo y se prefiere GCS-100.

En una modalidad preferida de la invención, los compuestos de acuerdo con la invención se administran en combinación con un agonista BMP-7, a modo de ejemplo y se prefiere THR-184.

- 20 En una modalidad preferida de la invención, los compuestos de acuerdo con la invención se administran en combinación con un modulador p53, a modo de ejemplo y se prefiere QPI-1002.

En una modalidad preferida de la invención, los compuestos de acuerdo con la invención se administran en combinación con un inhibidor de NOX1/4, a modo de ejemplo y se prefiere GKT-137831.

- 25 En una modalidad preferida de la invención, los compuestos de acuerdo con la invención se administran en combinación con un medicamento que afecta el metabolismo de vitamina D, a modo de ejemplo y se prefiere colecalciferol o paracalcitol.

- 30 En una modalidad preferida de la invención, los compuestos de acuerdo con la invención se administran en combinación con un agente citostático, a modo de ejemplo y se prefiere ciclofosfamida.

En una modalidad preferida de la invención, los compuestos de acuerdo con la invención se administran en combinación con un agente inmunosupresor, a modo de ejemplo y se prefiere ciclosporina.

En una modalidad preferida de la invención, los compuestos de acuerdo con la invención se administran en combinación con un aglutinante de fosfato, a modo de ejemplo y se prefiere sevelamer o carbonato de lantano.

5 En una modalidad preferida de la invención, los compuestos de acuerdo con la invención se administran en combinación con un calcimimético para terapia de hiperparatiroidismo.

En una modalidad preferida de la invención, los compuestos de acuerdo con la invención se administran en combinación con agentes para terapia para falta de hierro, a modo de ejemplo y se prefieren productos de hierro.

10 En una modalidad preferida de la invención, los compuestos de acuerdo con la invención se administran en combinación con agentes para la terapia de hiperuricemia, a modo de ejemplo y se prefiere alopurinol o rasburicasa.

En una modalidad preferida de la invención, los compuestos de acuerdo con la invención se administran en combinación con hormona de glicoproteína para la terapia de anemia, a modo de ejemplo y se prefiere eritropoyetina.

15 En una modalidad preferida de la invención, los compuestos de acuerdo con la invención se administran en combinación con productos biológicos para terapia inmunitaria, a modo de ejemplo y se prefiere abatacept, rituximab, eculizumab o belimumab.

20 En una modalidad preferida de la invención, los compuestos de acuerdo con la invención se administran en combinación con inhibidores de Jak, a modo de ejemplo y se prefiere ruxolitinib, tofacitinib, baricitinib, CYT387, GSK2586184, lestaurtinib, pacritinib (SB1518) o TG101348.

En una modalidad preferida de la invención, los compuestos de acuerdo con la invención se administran en combinación con análogos de prostaciclina para terapia de microtrombos.

25 En una modalidad preferida de la invención, los compuestos de acuerdo con la invención se administran en combinación con una terapia alcalina, a modo de ejemplo y se prefiere bicarbonato de sodio.

En una modalidad preferida de la invención, los compuestos de acuerdo con la invención se administran en combinación con un inhibidor de mTOR, a modo de ejemplo y se prefiere everolimus o rapamicina.

30 En una modalidad preferida de la invención, los compuestos de acuerdo con la invención se administran en combinación con un inhibidor de NHE3, a modo de ejemplo y se prefiere AZD1722.

En una modalidad preferida de la invención, los compuestos de acuerdo con la invención se administran en combinación con un modulador eNOS, a modo de ejemplo y se prefiere sapropterina.

En una modalidad preferida de la invención, los compuestos de acuerdo con la invención se administran en combinación con un inhibidor de CTGF, a modo de ejemplo y se prefiere FG-3019.

En una modalidad preferida de la invención, los compuestos de acuerdo con la invención se administran en combinación con antidiabéticos (agentes hipoglicémicos o antihiperghlicémicos), tales como por ejemplo y preferentemente insulina y derivados, sulfonilureas tales como tolbutamida, carbutamida, acetohexamida, clorpropamida, glipizida, gliclazida, glibenclamida, gliburida, glibornurida, gliquidona, glisoxepida, gliclopiramida, glimepirida, JB253 y JB558, meglitinidas tales como repaglinida y nateglinida, biguanidas tales como metformina y buformina, tiazolidindionas tales como rosiglitazona y pioglitazona, inhibidores de alfa-glucosidasa tales como miglitol, acarbosa y voglibosa, inhibidores de DPP4 tales como vildagliptina, sitagliptina, saxagliptina, linagliptina, alogliptina, septagliptina y teneligliptina, análogos de GLP-1 tales como exenatida (también exendina-4, liraglutida, lixisenatida y taspoglutida, o inhibidores de SGLT (gliflozinas) tales como canagliflozina, dapagliflozina y empagliflozin.

En una modalidad particularmente preferida, los compuestos de acuerdo con la invención se administran en combinación con uno o más de los agentes terapéuticos adicionales seleccionados del grupo que consiste en diuréticos, antagonistas de angiotensina AII, inhibidores de ACE, bloqueantes del receptor beta, antagonistas del receptor de mineralocorticoides, antidiabéticos, nitratos orgánicos y donantes NO, activadores y estimulantes de la guanilato ciclasa soluble (sGC), y agentes inotrópicos positivos.

En otra modalidad particularmente preferida, los compuestos de acuerdo con la invención se administran en combinación con uno o más de los agentes terapéuticos adicionales seleccionados del grupo que consiste en diuréticos, antagonistas de angiotensina AII, inhibidores de ACE, bloqueantes del receptor beta, antagonistas del receptor de mineralocorticoides, antidiabéticos, nitratos orgánicos y donantes NO, activadores y estimulantes de la guanilato ciclasa soluble (sGC), agentes inotrópicos positivos, agentes antiinflamatorios, agentes inmunosupresores, aglutinantes de fosfato y/o compuestos que modulan el metabolismo de la vitamina D.

Entonces, en una modalidad adicional, la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden al menos uno de los compuestos de acuerdo con la invención, y uno o más agentes terapéuticos adicionales para el tratamiento y/o prevención de enfermedades, especialmente de las enfermedades antes mencionadas.

Además, los compuestos de la presente invención se pueden usar como tal o en composiciones, en investigaciones y diagnósticos o como estándares de referencia analítica y similares, que son conocidos en la técnica.

Cuando los compuestos de la presente invención se administran como productos farmacéuticos a humanos y otros mamíferos, se puede administrar solos o como una composición farmacéutica que

contiene, por ejemplo, 0,1 a 99,5 % (más preferentemente, 0,5% a 90%) de ingrediente activo junto con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

Entonces, en otro aspecto, la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden al menos uno de los compuestos de acuerdo con la invención, convencionalmente juntos
5 con uno o más de los excipientes inertes, no tóxicos, farmacéuticamente aceptables, y al uso de estos para el tratamiento y/o prevención de enfermedades, especialmente de las enfermedades antes mencionadas.

Es posible que los compuestos de acuerdo con la invención puedan tener actividad sistémica y/o local. Con este fin, se pueden administrar de forma adecuada, como tal, por ejemplo, mediante vía
10 oral, parenteral, pulmonar, nasal, sublingual, lingual, bucal, rectal, vaginal, dérmica, transdérmica, conjuntival, ótica o como implante o stent.

Para estas vías de administración, es posible que los compuestos de acuerdo con la invención se puedan administrar en formas de administración adecuadas.

Para administración oral, es posible formular los compuestos de acuerdo con la invención en formas
15 de dosificación conocidas en la técnica que suministran los compuestos de la invención rápidamente y/o de forma modificada, tal como, por ejemplo, comprimidos (comprimidos revestidos o no revestidos, por ejemplo con revestimiento de liberación controlada o entérico que se disuelven con una demora o son insolubles), comprimidos de desintegración oral, películas/oblas, películas/líofilizados, cápsulas (por ejemplo cápsulas de gelatina dura o blanda), comprimidos
20 revestidos con azúcar, gránulos, píldoras, polvos, emulsiones, suspensiones, aerosoles o soluciones. Es posible incorporar los compuestos de acuerdo con la invención en forma cristalina y/o amorfa y/o disuelta en dichas formas de dosificación.

La administración parenteral puede tener lugar evitando un paso de absorción (por ejemplo, intravenosa, intraarterial, intracárdica, intraespinal o intralumbar) o incluyendo una absorción (por
25 ejemplo, intramuscular, subcutánea, percutánea o intraperitoneal). Las formas de administración adecuadas para administración parenteral son, entre otras, preparaciones para inyección e infusión en forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, líofilizados o polvos estériles.

Ejemplos que son adecuados para otras vías de administración son formas farmacéuticas para inhalación (entre otros inhaladores en polvo, nebulizadores), gotas nasales, soluciones nasales,
30 aerosoles nasales; comprimidos/películas/oblas/cápsulas para administración lingual, sublingual o bucal; supositorios; gotas para los ojos, ungüentos para los ojos, baños para los ojos, insertos oculares, gotas para los oídos, aerosoles para los oídos, polvos para los oídos, enjuagues para los oídos, tapones para los oídos; cápsulas vaginales, suspensiones acuosas (lociones, mixturae agitandae), suspensiones lipofílicas, emulsiones, ungüentos, cremas, sistemas terapéuticos
35 transdérmicos (tales como por ejemplo, parches), leche, pastas, espumas, polvos, implantes o stents.

Los compuestos de acuerdo con la invención se pueden incorporar en las formas de administración establecidas. Esto puede tener lugar de forma conocida en sí misma mezclando con excipientes farmacéuticamente aceptables. Los excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen entre otros

- 5
 - rellenos y portadores (por ejemplo celulosa, celulosa microcristalina (tales como, por ejemplo, Avicel[®]), lactosa, manitol, almidón, fosfato de calcio (tales como, por ejemplo, Di-Cafos[®])),
 - bases para ungüentos (por ejemplo gelatina de petróleo, parafinas, triglicéridos, ceras, cera de lana, alcoholes de cera de lana, lanolina, ungüento hidrofílico, polietilenglicoles),
 - bases para supositorios (por ejemplo polietilenglicoles, manteca de cacao, grasa dura),
- 10
 - solventes (por ejemplo agua, etanol, iso-propanol, glicerol, propilenglicol, aceites grasos triglicéridos de longitud de cadena media, polietilenglicoles líquidos, parafinas),
 - tensioactivos, emulsionantes, dispersantes o humectantes (por ejemplo dodecil sulfato de sodio), lecitina, fosfolípidos, alcoholes grasos (tales como, por ejemplo, Lanette[®]), ésteres de ácido graso sorbitán (tales como, por ejemplo, Span[®]), ésteres de ácido graso polioxietilen sorbitán (tales como, por ejemplo, Tween[®]), glicéridos de ácido graso polioxietileno (tales como, por ejemplo, Cremophor[®]), ésteres de ácido graso polioxietileno, éteres de alcohol graso polioxietileno, ésteres de ácido graso glicerol, poloxámeros (tales como, por ejemplo, Pluronic[®]),
- 15
 - amortiguadores, ácidos y bases (por ejemplo fosfatos, carbonatos, ácido cítrico, ácido acético, ácido clorhídrico, solución de hidróxido de sodio, carbonato de amonio, trometamol, trietanolamina),
 - agentes de isotonicidad (por ejemplo glucosa, cloruro de sodio),
 - adsorbentes (por ejemplo sílices altamente dispersas),
 - agentes que aumentan la viscosidad, formadores de gel, espesantes y/o aglutinantes (por ejemplo polivinilpirrolidona, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, almidón, carbómeros, ácidos poliacrílicos (tales como, por ejemplo, Carbopol[®]); alginatos, gelatina),
- 20
 - desintegrantes (por ejemplo almidón modificado, carboximetilcelulosa sódica, glicolato de almidón de sodio (tales como, por ejemplo, Explotab[®]), polivinilpirrolidona reticulada, croscarmelosa sódica (tales como por ejemplo, AcDiSol[®])),
- 25
 - reguladores de flujo, lubricantes, deslizantes y agentes liberadores de moho (por ejemplo estearato de magnesio, ácido esteárico, talco, sílices altamente dispersos (tales como por ejemplo, Aerosil[®])),
- 30

- materiales de revestimiento (por ejemplo azúcar, laca) y formadores de película o membranas de difusión que se disuelven rápidamente o de forma modificada (por ejemplo polivinilpirrolidonas (tales como por ejemplo, Kollidon[®]), alcohol polivinílico, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, etilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa ftalato, acetato de celulosa, acetato ftalato de celulosa, poliacrilatos, polimetacrilatos tales como por ejemplo, Eudragit[®])),
- materiales para cápsulas (por ejemplo gelatina, hidroxipropilmetilcelulosa),
- polímeros sintéticos (por ejemplo poliláctidos, poliglicólidos, poliacrilatos, polimetacrilatos (tales como por ejemplo, Eudragit[®]), polivinilpirrolidonas (tales como por ejemplo, Kollidon[®]), alcoholes polivinílicos, acetatos de polivinilo, óxidos de polietileno, polietilenglicoles y sus copolímeros y copolímeros de bloque),
- plastificantes (por ejemplo polietilenglicoles, propilenglicol, glicerol, triacetina, triacetil citrato, dibutil ftalato),
- potenciadores de penetración,
- estabilizadores (por ejemplo antioxidantes tales como por ejemplo, ácido ascórbico, ascorbil palmitato, ascorbato de sodio, butilhidroxianisol, butilhidroxitolueno, propil galato),
- conservantes (por ejemplo parabenos, ácido sórbico, tiomersal, cloruro de benzalconio, acetato de clorhexidina, benzoato de sodio),
- colorantes (por ejemplo pigmentos inorgánicos tales como por ejemplo, óxidos de hierro, dióxido de titanio),
- saborizantes, endulzantes, agentes para el enmascaramiento del olor y/o sabor.

La presente invención se refiere además a una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de acuerdo con la invención, convencionalmente junto con uno o más excipientes farmacéuticamente adecuados, y a su uso de acuerdo con la presente invención.

En función de técnicas de laboratorio estándar conocidas para evaluar compuestos útiles para el tratamiento de trastornos cardiovasculares y renales, mediante pruebas de toxicidad estándar y mediante ensayos farmacológicos estándar para la determinación de tratamiento de las afecciones antes identificadas en mamíferos, y mediante comparación de estos resultados con los resultados de ingredientes activos conocidos o medicamentos que se usan para tratar estas afecciones, la dosificación eficaz de los compuestos de la presente invención se puede determinar fácilmente para tratamiento de cada indicación deseada. La cantidad del ingrediente activo a ser administrado en el tratamiento de una de estas afecciones puede variar ampliamente de acuerdo con dichas consideraciones como el compuesto particular y la unidad de dosificación empleada, el modo de

administración, el período de tratamiento, la edad y sexo del paciente tratado y la naturaleza y el alcance de la afección tratada.

La cantidad total del ingrediente activo a ser administrado generalmente varía de alrededor de 0,001 mg/kg a alrededor de 200 mg/kg de peso corporal por día, y preferentemente de alrededor de 0,01 mg/kg a alrededor de 20 mg/kg de peso corporal por día. Los programas de dosificación clínicamente útiles varían de una a dosificación de tres veces al día a una vez cada cuatro semanas. Además, es posible “días libres de fármacos” en los cuales al paciente no se le dosifica un fármaco durante un período de tiempo lo que es beneficioso en el balance global entre la tolerabilidad y el efecto farmacológico. Es posible que una dosificación unitaria contenga de alrededor de 0,5 mg a alrededor de 1500 mg de ingrediente activo, y se puede administrar una o más veces por día o menos que una vez al día. La dosificación diaria promedio para la administración por inyección, que incluye inyecciones intravenosas, intramusculares, subcutáneas y parenterales, y uso de técnicas de infusión, será preferentemente de 0,01 a 200 mg/kg del peso corporal total. De manera ilustrativa, el compuesto de la presente invención se puede administrar parenteralmente con una dosis de alrededor de 0,001 mg/kg a alrededor de 10 mg/kg, preferentemente de alrededor de 0,01 mg/kg a alrededor de 1 mg/kg de peso corporal. En una administración oral, un ejemplo de intervalo de dosis es alrededor de 0,01 a 100 mg/kg, preferentemente alrededor de 0,01 a 20 mg/kg, y más preferentemente alrededor de 0,1 a 10 mg/kg de peso corporal. Los valores de intervalos intermedios a los antes mencionados también pretenden ser parte de la invención.

Claro que el régimen de dosificación continuo e inicial específico para cada paciente varía de acuerdo con la naturaleza y gravedad de la afección según se determine por el médico tratante, la actividad del compuesto específico empleado, la edad y estado general del paciente, el tiempo de administración, la vía de administración, la velocidad de excreción del fármaco, las combinaciones de fármacos y similares. El modo de tratamiento deseado y la cantidad de dosis de un compuesto de la presente invención o una sal o éster o composición farmacéuticamente aceptable de este puede ser determinado por aquellos expertos en la técnica usando pruebas de tratamiento convencionales.

Los siguientes ejemplos de modalidades ilustran la invención. La invención no se limita a los ejemplos.

Los porcentajes en las siguientes pruebas y ejemplos son salvo que se especifique lo contrario, en peso; las partes son en peso. Las relaciones de solvente, las relaciones de dilución y las concentraciones informadas para líquidos/soluciones líquidas se basan cada una en el volumen.

SECCIÓN EXPERIMENTAL**SECCIÓN EXPERIMENTAL - PARTE GENERAL**

Las formas de picos NMR se establecen como aparecen en los espectros, no se han considerado posibles efectos de orden mayor.

- 5 Los nombres químicos se generaron usando el software ACD/Name de ACD/Labs. En algunos casos los nombres generalmente aceptados de reactivos comercialmente disponibles se usaron en lugar de nombres generados por ACD/Name.

- La siguiente Tabla 1 enumera las abreviaturas usadas en este párrafo y en la sección Ejemplos siempre que no se expliquen en el cuerpo del texto. Otras abreviaturas tienen sus significados habituales propiamente dichos para un experto en la técnica.
- 10

Tabla 1: Abreviaturas

La siguiente lista enumera las abreviaturas usadas en la presente.

Abreviatura	Significado
abs	absoluto
br	amplio (señal ^1H NMR)
conc.	concentrado
CI	ionización química
d	doblete (señal ^1H NMR)
d	día(s)
DAD	detector de matriz de diodos
DCM	diclorometano
dd	Doble-doblete
periodinano Dess-Martin	1,1,1-triacetoxi-1,1-dihidro-1,2-benziodoxol-3-(1H)-ona
DMSO	dimetilsulfóxido
ESI	ionización por electropulverización (ES)
h	hora(s)
HATU	1-[Bis(dimetilamino)metileno]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio 3-óxido hexafluorofosfato
HPLC	cromatografía líquida de alto rendimiento
LC-MS	Cromatografía líquida - espectrometría de masa
m	múltiple (señal ^1H NMR)
min	minuto(s)
EM	Espectrometría de masa
MTBE	metil-terc-butiléter

NMR	espectroscopía de resonancia magnética nuclear: los cambios químicos (δ) se proporcionan en ppm. Los cambios químicos se corrigieron estableciendo la señal DMSO en 2,50 ppm salvo que se especifique lo contrario.
de t.	de teoría
PDA	matriz de foto diodos
R _t	tiempo de retención (según se mide con HPLC o UPLC) en minutos
s	singlete (señal ¹ H NMR)
SFC	Cromatografía de fluidos supercríticos
SQD	detector de cuadropolo simple
t	triplete (señal ¹ H NMR)
td	triple-doblete (señal ¹ H NMR)
TFA	ácido trifluoroacético
THF	tetrahidrofurano
UPLC	cromatografía líquida de ultra rendimiento

Los diferentes aspectos de la invención descritos en esta solicitud se ilustran con los siguientes ejemplos que no pretenden limitar la invención.

Los ejemplos de experimentos de prueba descritos en la presente sirven para ilustrar la presente
5 invención y la invención no se limita a los ejemplos dados.

Todos los reactivos, para los cuales la síntesis no se describe en la parte experimental, están comercialmente disponibles o son compuestos conocidos o se pueden formar a partir de compuestos conocidos por métodos conocidos por un experto en la técnica.

Los compuestos e intermedios producidos de acuerdo con los métodos de la invención pueden
10 requerir purificación. La purificación de compuestos orgánicos es conocida por los expertos en la técnica y hay varias formas de purificar el mismo compuesto. En algunos casos, puede no ser necesario purificar. En algunos casos, los compuestos se pueden purificar por cristalización. En algunos casos, las impurezas se pueden agitar usando un solvente adecuado. En algunos casos, los compuestos se pueden purificar por cromatografía, particularmente cromatografía ultrarrápida de
15 columna, usando por ejemplo cartuchos de gel de sílice preempaquetados, por ejemplo cartuchos Biotage SNAP KP-Sil[®] o KP-NH[®] en combinación con un sistema de autopurificación Biotage (SP4[®] o Isolera Four[®]) y eluyentes tales como gradientes de acetato de hexano/etilo o DCM/metanol. En algunos casos, los compuestos se pueden purificar por HPLC preparativa usando por ejemplo un autopurificador Waters equipado con un detector de matriz de diodos y/o espectrómetro de masa de
20 ionización por electropulverización en línea en combinación con una columna de fase inversa

preempaquetada adecuada y eluyentes tales como gradientes de agua y acetonitrilo que pueden contener aditivos tales como ácido trifluoroacético, ácido fórmico o amoníaco acuoso.

En algunos casos, los métodos de purificación como se describen anteriormente pueden proporcionar esos compuestos de la presente invención que poseen una funcionalidad suficientemente ácida o básica en la forma de una sal, tal como, en el caso de un compuesto de la presente invención que es suficientemente básico, por ejemplo una sal formiato o trifluoroacetato, o en el caso de un compuesto de la presente invención que es suficientemente ácida, por ejemplo una sal de amonio. Una sal de este tipo se puede transformar en su forma de base libre o ácido libre, respectivamente, por varios métodos conocidos por el experto en la técnica o se puede usar como sales en posteriores ensayos biológicos. Se entenderá que la forma específica (por ejemplo sal, base libre, etc.) de un compuesto de la presente invención como se aísla y como se describe en la presente no es necesariamente la única forma en la que dicho compuesto se puede aplicar a un ensayo biológico para cuantificar la actividad biológica específica.

En el caso de los intermedios de síntesis y ejemplos de trabajo de la invención descritos a continuación, cualquier compuesto especificado en la forma de una sal de la base o ácido correspondiente es generalmente una sal de composición estequiométrica exacta desconocida como se obtiene por la preparación y/o proceso de purificación correspondiente. Salvo que se especifique en más detalle, adiciones a nombres y fórmulas estructurales, tales como “clorhidrato”, “trifluoroacetato”, “sal de sodio”, “sal de potasio”, “sal de dipotasio”, “fosfato de hidrógeno”, “fosfato” o “x HCl”, “x CF₃COOH”, “x Na⁺”, “x K⁺”, “x Ca²⁺”, “x Mg²⁺” entonces no se entenderán en un sentido estequiométrico en el caso de dichas sales, pero tienen meramente carácter descriptivo con relación a los componentes formadores de sales presentes allí.

Esto aplica por consiguiente si los intermedios de síntesis o ejemplos de trabajo o sales de estos se obtuvieron en la forma de solvatos, por ejemplo hidratos, de composición estequiométrica desconocida (si son de un tipo definido) por los procesos de preparación y/o purificación descritos.

Métodos HPLC y LC-MS:

Método 1 (LC/MS)

Instrumento: sistema Waters Acquity SQD UPLC; columna: Waters Acquity UPLC HSS T3 1,8 μ, 50 x 1 mm; eluyente A: 1 L agua + 0,25 ml 99% ácido fórmico, eluyente B: 1 L acetonitrilo + 0,25 ml 99% ácido fórmico, gradiente: 0,0 min 90% A 1,2 min 5% A 2,0 min 5% A; horno: 50°C; velocidad de flujo: 0,40 ml/min; detección UV: 208-400 nm.

Método 2 (LC/MS):

Instrumento MS: Thermo Scientific FT-MS; tipo de instrumento UHPLC+: Thermo Scientific UltiMate 3000; Columna: Waters, HSST3, 2,1 x 75 mm, C18 1,8 μm; eluyente A: 1 L agua + 0,01% ácido fórmico, eluyente B: 1 L acetonitrilo + 0,01% ácido fórmico, gradiente: 0,0 min 10% B → 2,5

min 95% B → 3,5 min 95% B; horno: 50°C; velocidad de flujo: 0,90 ml/min; detección UV: 210 nm/ senda de integración óptima 210-300 nm.

Método 3 (LC-MS):

- 5 Instrumento: Agilent MS Quad 6150; HPLC: Agilent 1290; Columna: Waters Acquity UPLC HSS T3 1,8 µ 50 x 2,1 mm; eluyente A: 1 l de agua + 0,25 ml de 99% ácido fórmico, eluyente B: 1 l de acetonitrilo + 0,25 ml de 99% ácido fórmico; gradiente: 0,0 min 90% A → 0,3 min 90% A → 1,7 min 5% A → 3,0 min 5% A; horno: 50°C; flujo: 1,20 ml/min; detección UV: 205 – 305 nm.

Método 4 (HPLC preparativa):

- 10 Columna: Chromatorex o Reprosil C18 10 µm, 125 x 30 mm; eluyente A: agua+ 0,1% ácido fórmico, eluyente B: acetonitrilo + 0,1% ácido fórmico; gradiente: 3 min 10% B, 17,5 min 95% B, 19,5 min 100% B, 20 min 10% B; flujo: 75 ml/min; tiempo de ejecución: 20 min; detección a 210 nm.

Método 5 (LC-MS):

- Instrumento: Waters Single Quad MS System; Instrument Waters UPLC Acquity; Columna: Waters BEH C18 1,7 µm 50 x 2,1 mm; eluyente A: 1 l agua + 1,0 ml (solución acuosa de amoníaco, 25%)/l, eluyente B: 1 l acetonitrilo; gradiente: 0,0 min 92% A → 0,1 min 92% A → 1,8 min 5% A → 3,5 min 5% A; horno: 50°C; flujo: 0,45 ml/min; detección UV: 210 nm (208-400 nm).

Microondas

El reactor de microondas usado fue un sistema de microondas Initiator⁺ con robot sixty de Biotage[®].

20 **Difractometría de rayos X**

Difractómetro de transmisión PANalytical X'Pert PRO con contador PIXcel (multicanal):

- | | |
|---------------------------|----------------------------|
| radiación: | cobre, K alfa |
| monocromador primario: | espejo de rayos X enfocado |
| longitud de onda (K1): | 1,5406 Å |
| 25 longitud de onda (K2): | 1,5444 Å |
| parámetros de generador: | 40 kV, 40 mA |
| rango de medición: | 2-38° |
| condiciones ambiente: | 25°C, 40 – 60% rh |

Termogravimetría

- 30 *Analizador termogravimétrico TGA 7*; fabricante: Perkin-Elmer; tasa de calentamiento: 10 Kmin⁻¹; gas de purga: nitrógeno, 20-30 ml/min; crisol: crisol de aluminio abierto; preparación de muestra: ninguna.

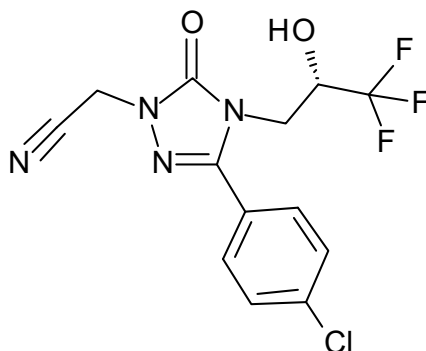
Espectros infrarrojos

Espectrómetro Bruker Tensor 37; resolución espectral 2 cm^{-1} ; cantidad de mediciones individuales 64; rango de cantidad de ondas $4000\text{-}550\text{ cm}^{-1}$; preparación de muestra: ninguna.

SECCIÓN EXPERIMENTAL– MATERIALES DE PARTIDA E INTERMEDIOS

Ejemplo 1A

{3-(4-clorofenil)-5-oxo-4-[(2S)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxipropil]-4,5-dihidro-1H-1,2,4-triazol-1-il} acetonitrilo



5

En un recipiente de reacción 2 l, se disolvieron 100 g (273 mmol) de ácido {3-(4-clorofenil)-5-oxo-4-[(2S)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxipropil]-4,5-dihidro-1H-1,2,4-triazol-1-il} acético (síntesis descrita en el Ejemplo 8A en WO 2010/105770-A1), 43,3 g (547 mmol) de piridina y 33 mg (0,3 mmol) de 4-dimetilaminopiridina se disolvieron en 300 ml THF. La solución resultante se trató a 5°C con 52,8 g (438 mmol) de cloruro de 2,2-dimetilpropanoilo en 15 minutos y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2,5 horas. Después de enfriarse hasta 0°C, se agregó 183 ml de 28% de solución de amoníaco acuosa en 1 h mientras la temperatura de la solución se mantuvo entre 10°C y 20°C y la mezcla resultante luego se agitó a 5°C durante un período de tiempo adicional de 1 h. Luego se agregó 500 ml de metil terc-butíler y 300 ml de 20% ácido cítrico acuoso mientras se mantuvo la temperatura interna entre 10°C y 20°C. Las fases se separaron y la fase orgánica se lavó con 300 ml de 20% ácido cítrico acuoso seguido de 300 ml solución de hidrogenocarbonato de sodio acuoso saturado y finalmente con 300 ml de 10% solución de cloruro de sodio acuoso. La fase orgánica se evaporó a 60°C a presión reducida hasta obtener un residuo oleoso. Luego se agregó 300 ml THF y la solución se evaporó nuevamente hasta obtener una solución oleosa. Esta operación se repitió una segunda vez. El residuo oleoso se recuperó en 360 ml THF y se trató con 172 g (820 mmol) de ácido trifluoroacético anhídrido en 20 min a una temperatura entre 10°C y 20°C. La solución resultante luego se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Se agregó 720 ml de 4-metil-2-pentanona y 650 ml 7,5% de solución de hidróxido de sodio acuosa se agregó a una temperatura entre 10°C y 20°C. Finalmente el valor del pH se ajustó hasta pH = 9,5 usando 7,5% de solución de hidróxido de sodio acuosa. Luego de la fase de separación, la fase orgánica se lavó dos veces con a 450 ml de 10% solución acuosa de cloruro de sodio. La fase orgánica se evaporó a una temperatura de 80°C a presión reducida mientras se agrega 1200 ml n-heptano. La suspensión formada se enfrió hasta 20°C y se formó un sólido que se filtró y lavó con 200 ml n-heptano y luego se secó a presión

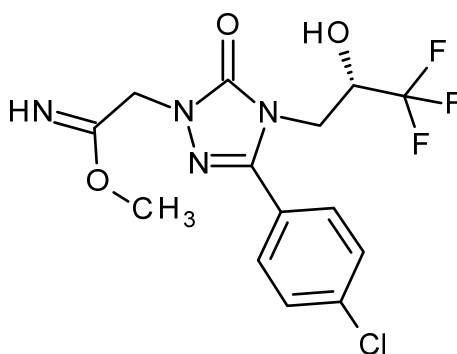
25

reducida (50°C, 30 mbar) proporcionando 88 g (93% de teoría) de {3-(4-clorofenil)-5-oxo-4-[(2S)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxipropil]-4,5-dihidro-1H-1,2,4-triazol-1-il} acetonitrilo como un sólido.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 7,78 (d, 2H), 7,55 (d, 2H), 6,91 (d, 1H), 5,17 (s, 2 H), 4,34-4,23 (m, 1 H), 3,98 (dd, 1H), 3,81 (dd, 1H).

5 **Ejemplo 2A**

2-{3-(4-clorofenil)-5-oxo-4-[(2S)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxipropil]-4,5-dihidro-1H-1,2,4-triazol-1-il}etanimidato de metilo

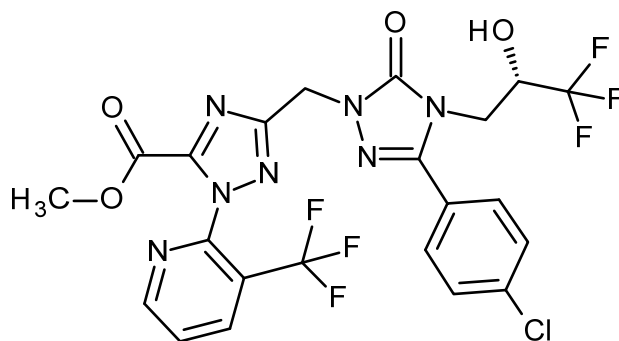


En un recipiente de reacción de 4 l, 200 g (576,9 mmol) de {3-(4-clorofenil)-5-oxo-4-[(2S)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxipropil]-4,5-dihidro-1H-1,2,4-triazol-1-il} acetonitrilo (Ejemplo 1A) en 1600 ml metanol se trató con 5,2 g (28 mmol) de metanolato de sodio (30% en metanol) y la mezcla resultante se agitó a 50°C durante 2,5 horas. La solución orgánica luego se evaporó a 50°C a presión reducida hasta obtener una solución oleosa. Se agregó 2000 ml de metil terc-butiléter y la solución se concentró hasta alcanzar un volumen de 800 ml. Luego se agregó 3000 ml n-heptano y se formó una suspensión. Después de enfriarse hasta 20°C, el sólido se filtró y lavó con 500 ml n-heptano y luego se secó a presión reducida (50°C, 30 mbar) proporcionando 175 g (80% de teoría) de 2-{3-(4-clorofenil)-5-oxo-4-[(2S)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxipropil]-4,5-dihidro-1H-1,2,4-triazol-1-il}etanimidato de metilo como un sólido.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 8,01 (s, 1H), 7,78 (d, 2H), 7,62 (d, 2H), 6,93 (br. s, 1H), 4,50 (s, 2 H), 4,35-4,23 (m, 1 H), 3,96 (dd, 1H), 3,81 (dd, 1H), 3,67 (s, 3 H).

Ejemplo 3A

3-({3-(4-clorofenil)-5-oxo-4-[(2S)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxipropil]-4,5-dihidro-1H-1,2,4-triazol-1-il}metil)-1-[3-(trifluorometil)piridin-2-il]-1H-1,2,4-triazol-5-carboxilato de metilo



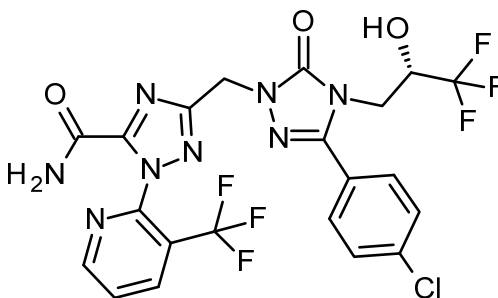
Una solución de 1,0 g de 2-({3-(4-clorofenil)-5-oxo-4-[(2S)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxiopropil]-4,5-dihidro-1H-1,2,4-triazol-1-ilo}etanimidato de metilo (Ejemplo 2A, 2,64 mmol) en 20 ml 1,4-dioxano se enfrió hasta 10°C y luego se trató con 388 mg (3,17 mmol) de cloroacetato de metilo y 0,55 ml (3,18 mmol) de N,N-diisopropiletilamina. La mezcla resultante luego se agitó durante 30 min. Una solución preagitada de 1,10 g (3,17 mmol) de sal de 4-metilbencenosulfonato 2-hidrazino-3-(trifluorometil)piridina (1:1), 0,65 ml (3,72 mmol) N,N-diisopropiletilamina y 506 mg (3,19 mmol) sulfato de cobre(II) anhidro en 10 ml 1,4-dioxano se agregó a la mezcla de reacción y la mezcla resultante luego se agitó durante la noche a temperatura ambiente. Luego se agregó agua y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo, las fases orgánicas combinadas se lavaron con solución acuosa de cloruro de sodio, se secaron sobre sulfato de magnesio y se evaporaron al vacío proporcionando 777 mg (50% de teoría) del compuesto del título como un sólido.

LC-MS (Método 1): $R_t = 1,00$ min; MS (ESIpos): $m/z = 592,6$ $[M+H]^+$

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 8,93 (d, 1H), 8,60 (dd, 1H), 7,98 (dd, 1H), 7,75 (d, 2H), 7,67-7,57 (m, 2H), 6,91 (d, 1H), 5,22 (s, 2H), 4,37-4,22 (m, 1H), 4,10-3,97 (m, 1H), 3,85 (dd, 1H), 3,77 (s, 3H).

Ejemplo 4A

3-({3-(4-clorofenil)-5-oxo-4-[(2S)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxiopropil]-4,5-dihidro-1H-1,2,4-triazol-1-ilo}metil)-1-[3-(trifluorometil)piridin-2-il]-1H-1,2,4-triazol-5-carboxamida



20

1,80 g de 3-({3-(4-clorofenil)-5-oxo-4-[(2S)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxiopropil]-4,5-dihidro-1H-1,2,4-triazol-1-ilo}metil)-1-[3-(trifluorometil)piridin-2-il]-1H-1,2,4-triazol-5-carboxilato de metilo (EJEMPLO 3A, 3,04 MMOL) SE DISOLVIÓ EN 10,0 ML DE UNA SOLUCIÓN DE AMONÍACO (7n en metanol,

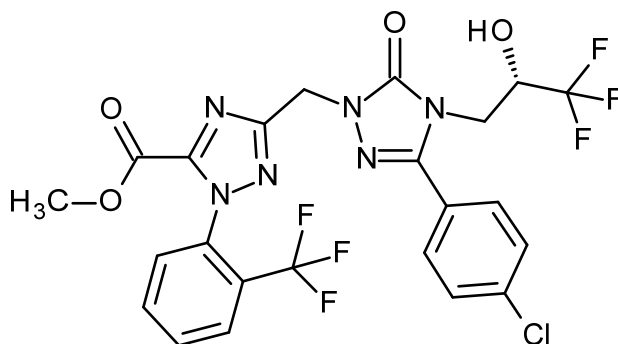
70,0 mmol). La mezcla resultante se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. El solvente se retiró al vacío y el producto bruto se purificó por HPLC preparativa (Método 4). La liofilización del producto que contiene fracciones proporcionó 1,49 g (85% de teoría) del compuesto del título como un sólido.

- 5 LC-MS (Método 3): $R_t = 1,20$ min; MS (ESIpos): $m/z = 577 [M+H]^+$

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 8,87 (d, 1H), 8,51 (d, 1H), 8,39 (s, 1H), 7,99 (s, 1H), 7,90 (dd, 1H), 7,82-7,68 (m, 2H), 7,63 (d, 2H), 6,90 (s, 1H), 5,22-5,07 (m, 2H), 4,29 (br s, 1H), 4,16-3,94 (m, 1H), 3,85 (dd, 1H).

Ejemplo 5A

- 10 3-(3-(4-clorofenil)-5-oxo-4-[(2S)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxipropil]-4,5-dihidro-1H-1,2,4-triazol-1-il)metil)-1-[2-(trifluorometil)fenil]-1H-1,2,4-triazol-5-carboxilato de metilo



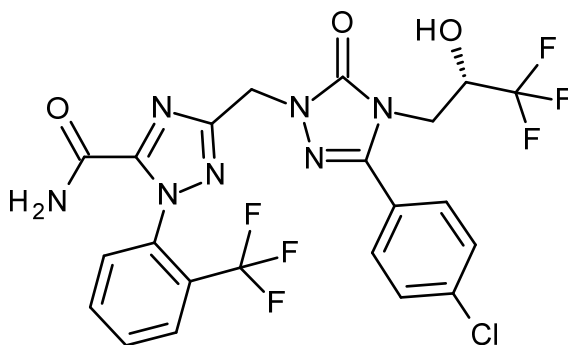
- En argón, una solución de 150 mg (0,40 mmol) de metil-2-{3-(4-clorofenil)-5-oxo-4-[(2S)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxipropil]-4,5-dihidro-1H-1,2,4-triazol-1-il}etanimidato (Ejemplo 2A) en 3 ml THF anhidro se trató a 0°C con 75 μl (0,44 mmol) *N,N*-diisopropiletilamina y 40 μl (0,44 mmol) cloroacetato de metilo y la mezcla se agitó luego a 0°C durante 30 min. 93 mg (0,44 mmol) de [2-(trifluorometil)fenil]hidrazina se agregaron luego, seguido por 145 μl (0,83 mmol) de *N,N*-diisopropiletilamina. La mezcla resultante se agitó durante 2 h a temperatura ambiente, seguido por 1 h a 120°C en el microondas y luego se evaporó. El residuo obtenido se purificó por HPLC preparativa (Método 4) para proporcionar 75 mg (32% de teoría) del compuesto del título.

LC-MS (Método 2): $R_t = 2,01$ min; MS (ESIpos): $m/z = 591,1 [M+H]^+$

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 8,07-7,56 (m, 8H), 6,91 (d, 1H), 5,17 (d, 2H), 4,37-4,21 (m, 1H), 4,09-3,80 (m, 2H), 3,74 (s, 3H).

Ejemplo 6A

- 25 3-(3-(4-clorofenil)-5-oxo-4-[(2S)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxipropil]-4,5-dihidro-1H-1,2,4-triazol-1-il)metil)-1-[2-(trifluorometil)fenil]-1H-1,2,4-triazol-5-carboxamida



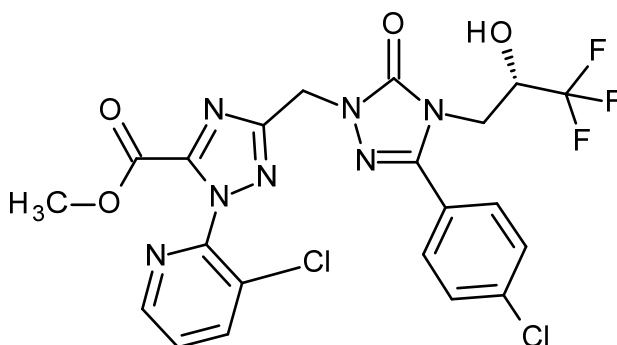
Una mezcla de 55 mg (0,093 mmol) de 3-(3-(4-clorofenil)-5-oxo-4-[(2S)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-
 5 propil]-4,5-dihidro-1H-1,2,4-triazol-1-il)metil)-1-[2-(trifluorometil)fenil]-1H-1,2,4-triazol-
 5-carboxilato de metilo (Ejemplo 5A) en una solución de amoníaco (7N en metanol, 0,8 ml, 5,6
 mmol) se agitó durante la noche a temperatura ambiente y la mezcla se evaporó luego. El residuo
 obtenido se purificó por HPLC preparativa (Método 4) para proporcionar 55 mg (cuant.) del
 compuesto del título.

LC-MS (Método 2): $R_t = 1,77$ min; MS (ESIpos): $m/z = 576,1$ $[M+H]^+$

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 8,23 (s, 1H), 8,00-7,55 (m, 9H), 6,90 (d, 1H), 5,22-5,01
 10 (m, 2H), 4,40-4,18 (m, 1H), 4,10-3,76 (m, 2H).

Ejemplo 7A

3-(3-(4-clorofenil)-5-oxo-4-[(2S)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-
 15 propil]-4,5-dihidro-1H-1,2,4-triazol-1-il)metil)-1-(3-cloropiridin-2-il)-1H-1,2,4-triazol-5-carboxilato de metilo



Una solución de 150 mg de metil-2-{3-(4-clorofenil)-5-oxo-4-[(2S)-3,3,3-trifluor-2-hidroxi-
 4,5-dihidro-1H-1,2,4-triazol-1-ilo}etanimidato (Ejemplo 2A, 26,4 mmol) en 3 ml THF se enfrió
 hasta 0°C y luego se trató con 58,2 mg (0,48 mmol) de clorooxoacetato de metilo y 275 μl (1,58
 mmol) de N,N-diisopropiletilamina. La mezcla resultante se calentó hasta temperatura ambiente y se
 agitó durante 1 h y se enfrió nuevamente hasta 0°C. Luego se agregó 62,6 mg (0,436 mmol) de 3-
 20 cloro-2-hidrazinopiridina y la mezcla de reacción se calentó hasta temperatura ambiente y luego se
 agitó durante 1 h, seguido de 1 h a 120°C en un recipiente sellado bajo irradiación de microondas. El

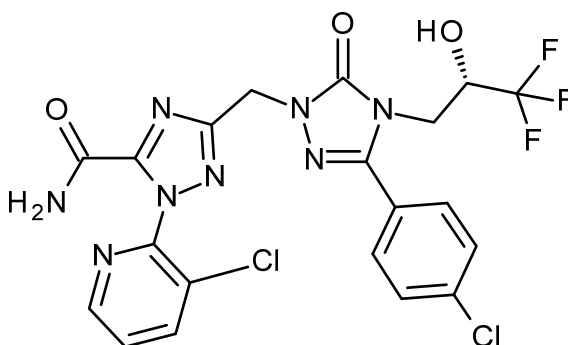
producto bruto se purificó por HPLC preparativa (Método 4). La liofilización del producto que contiene fracciones proporcionó 25,3 mg (11% de teoría) del compuesto del título.

LC-MS (Método 2): $R_t = 1,82$ min; MS (ESIpos): $m/z = 558,1$ $[M+H]^+$

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 8,70-8,24 (m, 2H), 7,89-7,56 (m, 5H), 6,92 (d, 1H), 5,22 (s, 2H), 4,46-4,20 (m, 1H), 3,79 (s, 5H).

Ejemplo 8A

3-(3-(4-clorofenil)-5-oxo-4-[(2S)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxipropil]-4,5-dihidro-1H-1,2,4-triazol-1-il)metil)-1-(3-cloropiridin-2-il)-1H-1,2,4-triazol-5-carboxamida



5,1 g de 3-(3-(4-clorofenil)-5-oxo-4-[(2S)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxipropil]-4,5-dihidro-1H-1,2,4-triazol-1-il)metil)-1-(3-cloropiridin-2-il)-1H-1,2,4-triazol-5-carboxilato de metilo (EJEMPLO 7A, 9,134 MMOL) SE DISOLVIÓ EN 42,5 ML DE UNA SOLUCIÓN DE AMONÍACO (7n en metanol, 297 mmol). La mezcla resultante se agitó durante 2 h a temperatura ambiente. La solución luego se vertió en hielo y la mezcla se agitó durante 10 min. El precipitado se filtró y lavó con agua, que proporcionó 3,5 g de producto bruto. La fase acuosa se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se secó con sulfato de magnesio, se filtró y el solvente se retiró al vacío. El producto bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, diclorometano/metanol, 97/3) proporcionando 4,00 g (81% de teoría) del compuesto del título como un sólido.

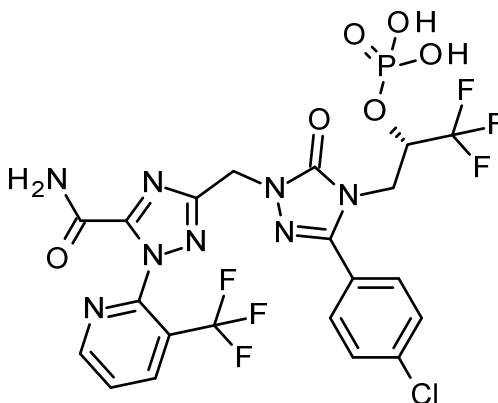
LC-MS (Método 2): $R_t = 1,62$ min; MS (ESIpos): $m/z = 543,1$ $[M+H]^+$

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 8,55 (dd, 1H), 8,39 (s, 1H), 8,25 (dd, 1H), 8,00 (s, 1H), 7,76 (d, 2H), 7,69 (dd, 1H), 7,62 (d, 2H), 6,90 (d, 1H), 5,18 (d, 2H), 4,36-4,23 (m, 1H), 4,06-3,97 (m, 1H), 3,85 (dd, 1H).

SECCIÓN EXPERIMENTAL – EJEMPLOS

Ejemplo 1

(2S)-3-[1-({5-Carbamoil-1-[3-(trifluorometil)piridin-2-il]-1H-1,2,4-triazol-3-il} metil)-3-(4-clorofenil)-5-oxo-1,5-dihidro-4H-1,2,4-triazol-4-il]-1,1,1-trifluoropropan-2-il fosfato dihidrógeno



5

A 0°C, una solución de 3-({3-(4-clorofenil)-5-oxo-4-[(2S)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxipropil]-4,5-dihidro-1H-1,2,4-triazol-1-il} metil)-1-[3-(trifluorometil)piridin-2-il]-1H-1,2,4-triazol-5-carboxamida (Ejemplo 4A, 2,00 g, 3,47 mmol) en tetrahidrofurano (40 ml, 490 mmol) se trató con 4-N,N-dimetilaminopiridina (635 mg, 5,20 mmol) y trietilamina (720 µl, 5,2 mmol). Luego se agregó gota a gota oxiclورو de fósforo (480 µl, 5,2 mmol). La mezcla resultante se agitó durante 40 min a 0°C y luego durante 50 min a temperatura ambiente. Luego se agregó agua (4,0 ml) y una solución de carbonato de hidrógeno de sodio acuosa saturada (24 ml) y la mezcla resultante se agitó durante la noche a temperatura ambiente. Luego se evaporó tetrahidrofurano a temperatura ambiente. La solución resultante se diluyó con agua y se extrajo con acetato de etilo. La fase acuosa se llevó a pH

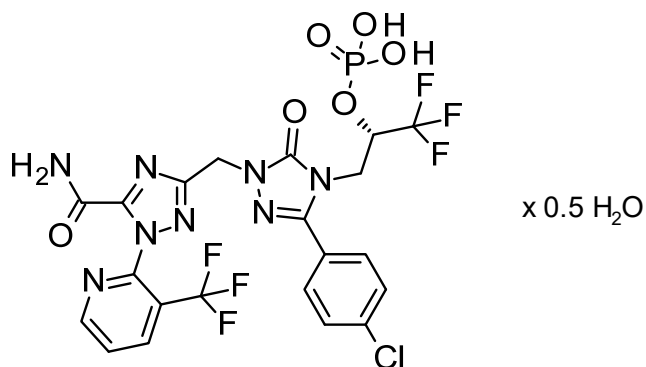
15

20 LC-MS (Método 3): $R_t = 0,94$ min; MS (ESIpos): $m/z = 657,0$ $[M+H]^+$

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 8,86 (d, 1H), 8,58-8,29 (m, 2H), 8,07-7,82 (m, 2H), 7,79-7,45 (m, 4H), 5,33-5,00 (m, 2H), 4,95 – 4,77 (br m, 1H), 4,29-3,89 (m, 2H), 3,36 (br s, 2H, superposición con pico HDO).

Ejemplo 1-1

25 (2S)-3-[1-({5-Carbamoil-1-[3-(trifluorometil)piridin-2-il]-1H-1,2,4-triazol-3-il} metil)-3-(4-clorofenil)-5-oxo-1,5-dihidro-4H-1,2,4-triazol-4-il]-1,1,1-trifluoropropan-2-il hemihidrato de fosfato dihidrógeno



Una suspensión de (2S)-3-[1-({5-carbamoyl-1-[3-(trifluorometil)piridin-2-il]-1H-1,2,4-triazol-3-il}metil)-3-(4-clorofenil)-5-oxo-1,5-dihidro-4H-1,2,4-triazol-4-il]-1,1,1-trifluoropropan-2-il fosfato dihidrógeno (4,46 g, 6,79 mmol) en 446 ml tolueno se agitó a 25°C durante siete días. El sólido se retiró por filtración y el filtrado se evaporó. El sólido y el residuo obtenidos del filtrado se mezclaron juntos y se suspendieron en una mezcla de diclorometano/n-heptano (200 ml, 55:45). La mezcla resultante se agitó a 40 °C durante ocho días. El material sólido se filtró y examinó por difracción de rayos X y corresponde al compuesto del título como material cristalino (forma de hemihidrato).

Tabla 2: Difracción en polvo de rayos del compuesto obtenido como material cristalino en el ejemplo 1-1

Reflejos [2θ] (máximos de pico)	
6,2	20,4
7,5	20,6
11,0	21,3
12,8	21,6
13,0	22,4
13,3	23,3
14,6	23,5
14,7	23,8
14,8	23,9
16,0	24,2
16,3	24,6
16,5	25,1
16,9	25,8
17,3	30,2
19,5	

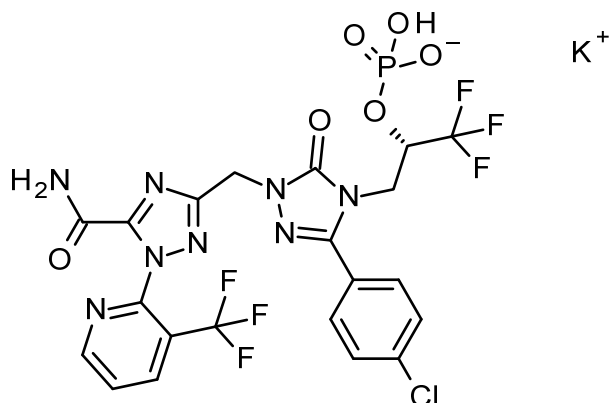
Tabla 3: Espectro infrarrojo del compuesto obtenido como material cristalino en el ejemplo 1-1

Bandas [máximos de pico en cm ⁻¹]	
569*	1100
619	1131
642	1137
656	1163*
678	1175
703	1191*
710	1237*
723	1273
727	1321
746	1334
762*	1354
781	1374
810	1398*
823	1405
853*	1423
860*	1450
888	1495
944	1582
976	1605
1014	1699
1031	3188
1036	3253*
1045	3305*
1091	3392

Las bandas marcadas con * son específicas del ácido libre.

Ejemplo 2

- 5 (2S)-3-[1-({5-carbamoyl-1-[3-(trifluorometil)piridin-2-il]-1H-1,2,4-triazol-3-il}-metil)-3-(4-clorofenil)-5-oxo-1,5-dihidro-4H-1,2,4-triazol-4-il]-1,1,1-trifluoropropan-2-il hidrógeno fosfato de potasio



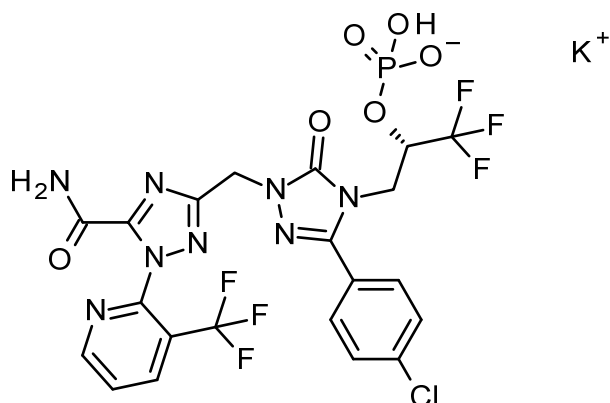
Una solución de (2S)-3-[1-({5-carbamoyl-1-[3-(trifluorometil)piridin-2-il]-1H-1,2,4-triazol-3-il}metil)-3-(4-clorofenil)-5-oxo-1,5-dihidro-4H-1,2,4-triazol-4-il]-1,1,1-trifluoropropan-2-il fosfato dihidrógeno (Ejemplo 1, 104 mg, 158 μ mol) en agua (3,0 ml) se trató con carbonato de hidrógeno de potasio (31,6 mg, 316 μ mol), luego se agitó durante 15 min a temperatura ambiente y se liofilizó proporcionando 124 mg (cuant.) del compuesto del título.

LC-MS (Método 1): R_t = 0,67 min; MS (ESIpos): m/z = 657,0 $[M+H]^+$

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O): δ [ppm] = 8,87-8,80 (m, 1H), 8,52 (d, 1H), 7,95 (dd, 1H), 7,72-7,57 (m, 4H), 5,45-5,36 (m, 1H), 5,35-5,26 (m, 1H), 4,99-4,55 (m, 1H, superposición con pico HDO), 4,20-4,07 (m, 2H).

Ejemplo 3

(2S)-3-[1-({5-carbamoyl-1-[3-(trifluorometil)piridin-2-il]-1H-1,2,4-triazol-3-il}-metil)-3-(4-clorofenil)-5-oxo-1,5-dihidro-4H-1,2,4-triazol-4-il]-1,1,1-trifluoropropan-2-il hidrógeno fosfato de potasio



15

Una solución de (2S)-3-[1-({5-carbamoyl-1-[3-(trifluorometil)piridin-2-il]-1H-1,2,4-triazol-3-il}metil)-3-(4-clorofenil)-5-oxo-1,5-dihidro-4H-1,2,4-triazol-4-il]-1,1,1-trifluoropropan-2-il fosfato dihidrógeno (Ejemplo 1, 35,0 mg, 53,3 μ mol) en agua (1,0 ml) se trató con carbonato de hidrógeno de potasio (5,33 mg, 53,3 μ mol), luego se agitó durante 15 min a temperatura ambiente y se liofilizó proporcionando 39,5 mg (cuant.) del compuesto del título.

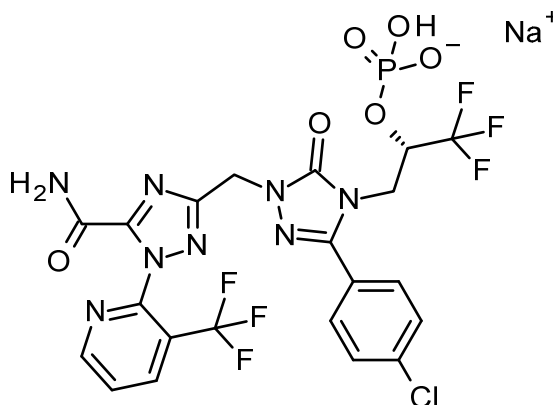
20

LC-MS (Método 1): $R_t = 0,67$ min; MS (ESIpos): $m/z = 657,0$ $[M+H]^+$

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O): δ [ppm] = 8,87-8,80 (m, 1H), 8,54-8,48 (m, 1H), 7,97-7,91 (m, 1H), 7,71-7,57 (m, 4H), 5,43-5,37 (m, 1H), 5,35-5,28 (m, 1H), 4,90-4,64 (m, 1H, superposición con pico HDO), 4,23-4,10 (m, 2H).

5 **Ejemplo 4**

(2S)-3-[1-({5-carbamoil-1-[3-(trifluorometil)piridin-2-il]-1H-1,2,4-triazol-3-il}-metil)-3-(4-clorofenil)-5-oxo-1,5-dihidro-4H-1,2,4-triazol-4-il]-1,1,1-trifluoropropan-2-il hidrógeno fosfato de sodio



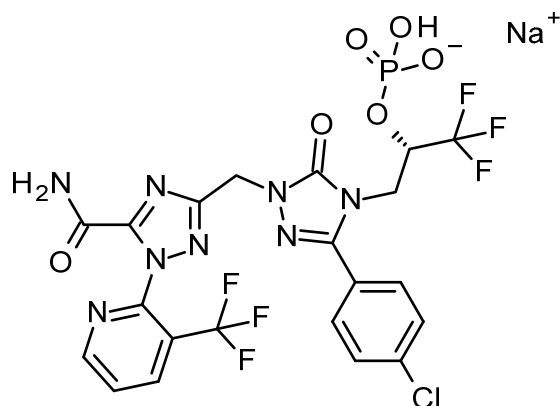
- 10 Una solución de (2S)-3-[1-({5-carbamoil-1-[3-(trifluorometil)piridin-2-il]-1H-1,2,4-triazol-3-il}-metil)-3-(4-clorofenil)-5-oxo-1,5-dihidro-4H-1,2,4-triazol-4-il]-1,1,1-trifluoropropan-2-il fosfato dihidrógeno (Ejemplo 1, 35,0 mg, 53,3 μmol) en agua (1,0 ml) se trató con carbonato disodio (5,65 mg, 53,3 μmol), luego se agitó durante 15 min a temperatura ambiente y se liofilizó proporcionando 41,2 mg (cuant.) del compuesto del título.

- 15 LC-MS (Método 1): $R_t = 0,68$ min; MS (ESIpos): $m/z = 657,0$ $[M+H]^+$

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O): δ [ppm] = 8,86-8,82 (m, 1H), 8,54-8,49 (m, 1H), 7,98-7,92 (m, 1H), 7,72-7,58 (m, 4H), 5,43-5,37 (m, 1H), 5,34-5,28 (m, 1H), 4,88-4,65 (m, 1H, superposición con pico HDO), 4,20-4,06 (m, 2H).

Ejemplo 5

- 20 (2S)-3-[1-({5-carbamoil-1-[3-(trifluorometil)piridin-2-il]-1H-1,2,4-triazol-3-il}-metil)-3-(4-clorofenil)-5-oxo-1,5-dihidro-4H-1,2,4-triazol-4-il]-1,1,1-trifluoropropan-2-il hidrógeno fosfato de sodio



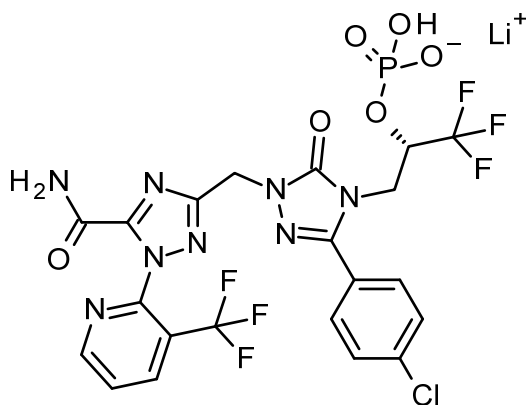
Una solución de (2S)-3-[1-({5-carbamoyl-1-[3-(trifluorometil)piridin-2-il]-1H-1,2,4-triazol-3-il}metil)-3-(4-clorofenil)-5-oxo-1,5-dihidro-4H-1,2,4-triazol-4-il]-1,1,1-trifluoropropan-2-il fosfato dihidrógeno (Ejemplo 1, 35,0 mg, 53,3 μmol) en agua (1,0 ml) se trató con carbonato de hidrógeno de sodio (4,48 mg, 53,3 μmol), luego se agitó durante 15 min a temperatura ambiente y se liofilizó proporcionando 38,6 mg (cuant.) del compuesto del título.

LC-MS (Método 1): $R_t = 0,68$ min; MS (ESIpos): $m/z = 657$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O): δ [ppm] = 8,86-8,81 (m, 1H), 8,53-8,48 (m, 1H), 7,97-7,92 (m, 1H), 7,71-7,58 (m, 4H), 5,42-5,36 (m, 1H), 5,34-5,27 (m, 1H), 4,68 (s, 1H, superposición con pico HDO), 4,22-4,10 (m, 2H).

Ejemplo 6

(2S)-3-[1-({5-carbamoyl-1-[3-(trifluorometil)piridin-2-il]-1H-1,2,4-triazol-3-il}metil)-3-(4-clorofenil)-5-oxo-1,5-dihidro-4H-1,2,4-triazol-4-il]-1,1,1-trifluoropropan-2-il hidrógeno fosfato de litio



15

Una solución de (2S)-3-[1-({5-carbamoyl-1-[3-(trifluorometil)piridin-2-il]-1H-1,2,4-triazol-3-il}metil)-3-(4-clorofenil)-5-oxo-1,5-dihidro-4H-1,2,4-triazol-4-il]-1,1,1-trifluoropropan-2-il fosfato dihidrógeno (Ejemplo 1, 35,0 mg, 53,3 μmol) en agua (1,0 ml) se trató con hidrato de hidróxido de

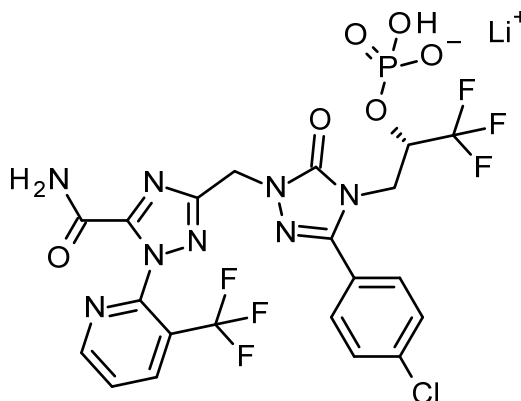
litio (1:1) (4,47 mg, 107 μmol), luego se agitó durante 15 min a temperatura ambiente y se liofilizó proporcionando 38,7 mg (cuant.) del compuesto del título.

LC-MS (Método 1): $R_t = 0,67$ min; MS (ESIpos): $m/z = 657,0$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O): δ [ppm] = 8,86-8,82 (m, 1H), 8,54-8,49 (m, 1H), 7,98-7,91 (m, 1H), 7,72-7,58 (m, 4H), 5,43-5,37 (m, 1H), 5,34-5,28 (m, 1H), 4,90-4,68 (m, 1H, superposición con pico HDO), 4,21-4,06 (m, 2H).

Ejemplo 7

(2S)-3-[1-({5-carbamoil-1-[3-(trifluorometil)piridin-2-il]-1H-1,2,4-triazol-3-il}-metil)-3-(4-clorofenil)-5-oxo-1,5-dihidro-4H-1,2,4-triazol-4-il]-1,1,1-trifluoropropan-2-il hidrógeno fosfato de litio



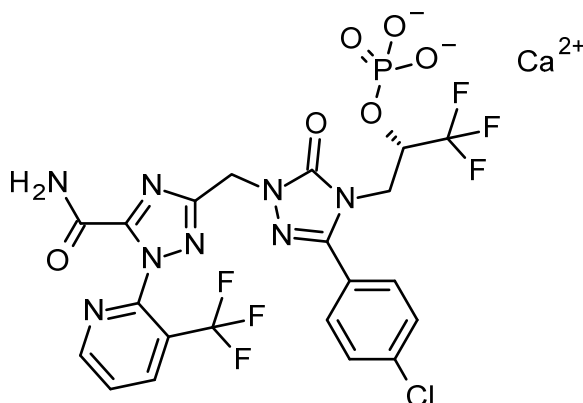
Una solución de (2S)-3-[1-({5-carbamoil-1-[3-(trifluorometil)piridin-2-il]-1H-1,2,4-triazol-3-il}-metil)-3-(4-clorofenil)-5-oxo-1,5-dihidro-4H-1,2,4-triazol-4-il]-1,1,1-trifluoropropan-2-il fosfato dihidrógeno (Ejemplo 1, 35,0 mg, 53,3 μmol) en agua (1,0 ml) se trató con hidrato de hidróxido de litio (1:1) (2,24 mg, 53,3 μmol), luego se agitó durante 15 min a temperatura ambiente y se liofilizó proporcionando 38,3 mg (cuant.) del compuesto del título.

LC-MS (Método 1): $R_t = 0,67$ min; MS (ESIpos): $m/z = 657,0$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O): δ [ppm] = 8,83 (d, 1H), 8,51 (d, 1H), 7,94 (dd, 1H), 7,71-7,58 (m, 4H), 5,42-5,37 (m, 1H), 5,34-5,28 (m, 1H), 4,89-4,65 (m, 1H, superposición con pico HDO), 4,22-4,10 (m, 2H).

Ejemplo 8

(2S)-3-[1-({5-carbamoil-1-[3-(trifluorometil)piridin-2-il]-1H-1,2,4-triazol-3-il}-metil)-3-(4-clorofenil)-5-oxo-1,5-dihidro-4H-1,2,4-triazol-4-il]-1,1,1-trifluoropropan-2-il fosfato de calcio



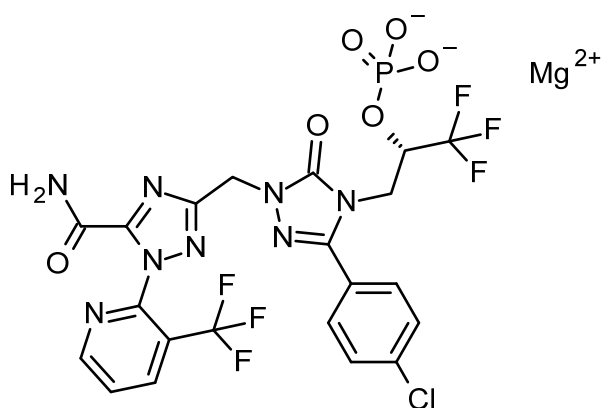
Una solución de (2S)-3-[1-({5-carbamoyl-1-[3-(trifluorometil)piridin-2-il]-1H-1,2,4-triazol-3-il}metil)-3-(4-clorofenil)-5-oxo-1,5-dihidro-4H-1,2,4-triazol-4-il]-1,1,1-trifluoropropan-2-il fosfato dihidrógeno (Ejemplo 1, 100 mg, 152 μ mol) en agua (1 l) se trató con carbonato de calcio (15,2 mg, 152 μ mol), luego se agitó durante 15 min a temperatura ambiente y se liofilizó proporcionando 93,9 mg (cuant.) del compuesto del título.

LC-MS (Método 1): R_t = 0,69 min; MS (ESIpos): m/z = 657,1 $[M+H]^+$

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O): δ [ppm] = 8,86-8,82 (m, 1H), 8,54-8,49 (m, 1H), 7,98-7,92 (m, 1H), 7,72-7,57 (m, 4H), 5,45-5,37 (m, 1H), 5,35-5,28 (m, 1H), 4,91-4,66 (m, 1H, superposición con pico HDO), 4,21-4,09 (m, 2H).

Ejemplo 9

(2S)-3-[1-({5-carbamoyl-1-[3-(trifluorometil)piridin-2-il]-1H-1,2,4-triazol-3-il}-metil)-3-(4-clorofenil)-5-oxo-1,5-dihidro-4H-1,2,4-triazol-4-il]-1,1,1-trifluoropropan-2-il fosfato de magnesio



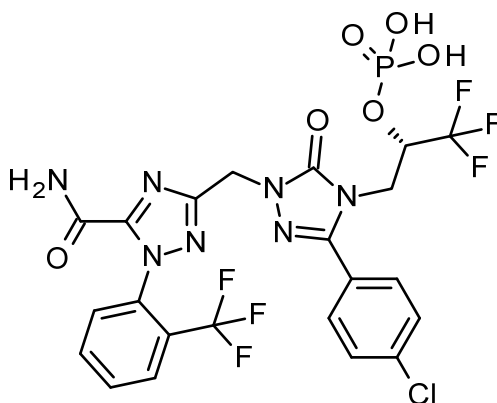
Una solución de (2S)-3-[1-({5-carbamoyl-1-[3-(trifluorometil)piridin-2-il]-1H-1,2,4-triazol-3-il}metil)-3-(4-clorofenil)-5-oxo-1,5-dihidro-4H-1,2,4-triazol-4-il]-1,1,1-trifluoropropan-2-il fosfato dihidrógeno (Ejemplo 1, 35,0 mg, 53,3 μ mol) en agua (1,0 ml) se trató con carbonato de magnesio (4,49 mg, 53,3 μ mol), luego se agitó durante 15 min a temperatura ambiente y se liofilizó proporcionando 40,1 mg (cuant.) del compuesto del título.

LC-MS (Método 1): $R_t = 0,68$ min; MS (ESIpos): $m/z = 657,0$ $[M+H]^+$

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O): δ [ppm] = 8,87-8,81 (m, 1H), 8,54-8,48 (m, 1H), 7,98-7,91 (m, 1H), 7,73-7,58 (m, 4H), 5,43-5,37 (m, 1H), 5,35-5,27 (m, 1H), 4,92-4,60 (m, 1H, superposición con pico HDO), 4,20-4,06 (m, 2H).

5 Ejemplo 10

(2S)-3-[1-({5-Carbamoil-1-[2-(trifluorometil)fenil]-1H-1,2,4-triazol-3-il}metil)-3-(4-clorofenil)-5-oxo-1,5-dihidro-4H-1,2,4-triazol-4-il]-1,1,1-trifluoropropan-2-il fosfato dihidrógeno



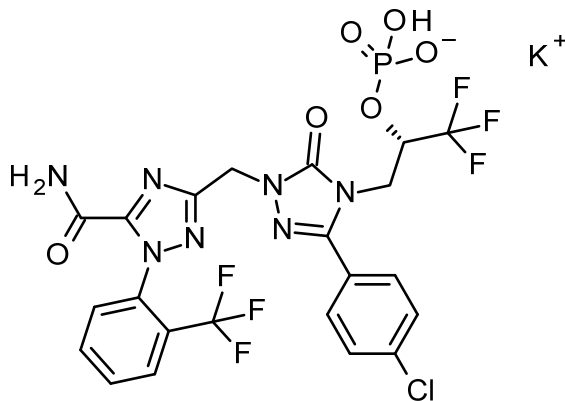
A 0°C , una solución de 3-({3-(4-clorofenil)-5-oxo-4-[(2S)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxipropil]-4,5-dihidro-1H-1,2,4-triazol-1-il}metil)-1-[2-(trifluorometil)fenil]-1H-1,2,4-triazol-5-carboxamida (Ejemplo 6A, 1000 mg, 1,74 mmol) en tetrahidrofurano (20 ml, 250 mmol) se trató con 4-N,N-dimetilaminopiridina (318 mg, 2,60 mmol) y trietilamina (360 μl , 2,6 mmol). Se agregó gota a gota oxicloruro de fósforo (240 μl , 2,6 mmol). La mezcla resultante se agitó durante 40 min a 0°C y luego durante 50 min a temperatura ambiente. Luego se agregó agua (2,0 ml) y una solución de carbonato de hidrógeno de sodio acuosa saturada (12 ml) y la mezcla resultante se agitó durante la noche a temperatura ambiente. Luego se evaporó tetrahidrofurano a temperatura ambiente. La solución resultante se diluyó con agua y se extrajo con acetato de etilo. La fase acuosa se llevó a $\text{pH} = 1$ con una solución de ácido clorhídrico (1N), se diluyó con una solución de cloruro de sodio acuosa saturada y se extrajo con acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con solución de cloruro de sodio saturada, se secaron sobre sulfato de magnesio y se concentraron. El residuo se purificó por HPLC preparativa (Método 4) para proporcionar 876 mg (77% de teoría) del compuesto del título.

LC-MS (Método 1): $R_t = 0,74$ min; MS (ESIpos): $m/z = 656,0$ $[M+H]^+$

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 8,30 (br s, 1H), 7,96-7,50 (m, 8H), 5,25-4,96 (m, 2H), 4,97 – 4,74 (br m, 1H), 4,26-3,91 (m, 2H), 3,57 (br s, 2H, superposición con pico HDO).

Ejemplo 11

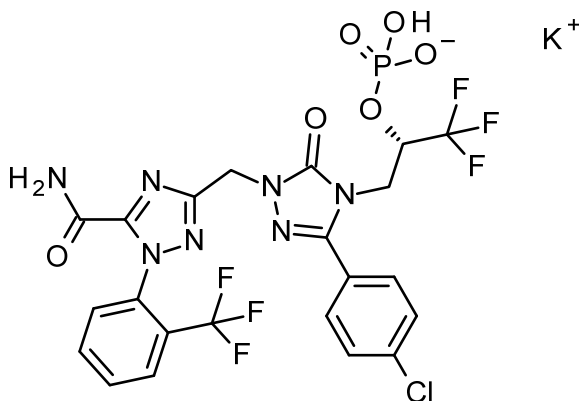
(2S)-3-[1-({5-carbamoil-1-[2-(trifluorometil)fenil]-1H-1,2,4-triazol-3-il}metil)-3-(4-clorofenil)-5-oxo-1,5-dihidro-4H-1,2,4-triazol-4-il]-1,1,1-trifluoropropan-2-il hidrógeno fosfato de potasio



- 5 Una solución de (2S)-3-[1-({5-carbamoil-1-[2-(trifluorometil)fenil]-1H-1,2,4-triazol-3-il}metil)-3-(4-clorofenil)-5-oxo-1,5-dihidro-4H-1,2,4-triazol-4-il]-1,1,1-trifluoropropan-2-il fosfato dihidrógeno (Ejemplo 10, 35,0 mg, 53,4 μmol) en agua (1,0 ml) se trató con carbonato de hidrógeno de potasio (10,7 mg, 107 μmol), luego se agitó durante 15 min a temperatura ambiente y se liofilizó proporcionando 40,4 mg (cuant.) del compuesto del título.
- 10 LC-MS (Método 1): $R_t = 0,73$ min; MS (ESIpos): $m/z = 656,0$ $[\text{M}+\text{H}]^+$
- $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O): δ [ppm] = 7,97-7,93 (m, 1H), 7,87-7,79 (m, 2H), 7,73-7,59 (m, 5H), 5,38-5,33 (m, 1H), 5,30-5,24 (m, 1H), 4,88-4,66 (m, 1H, superposición con pico HDO), 4,20-4,06 (m, 2H).

Ejemplo 12

- 15 (2S)-3-[1-({5-carbamoil-1-[2-(trifluorometil)fenil]-1H-1,2,4-triazol-3-il}metil)-3-(4-clorofenil)-5-oxo-1,5-dihidro-4H-1,2,4-triazol-4-il]-1,1,1-trifluoropropan-2-il hidrógeno fosfato de potasio



Una solución de (2S)-3-[1-({5-carbamoil-1-[2-(trifluorometil)fenil]-1H-1,2,4-triazol-3-il}metil)-3-(4-clorofenil)-5-oxo-1,5-dihidro-4H-1,2,4-triazol-4-il]-1,1,1-trifluoropropan-2-il fosfato

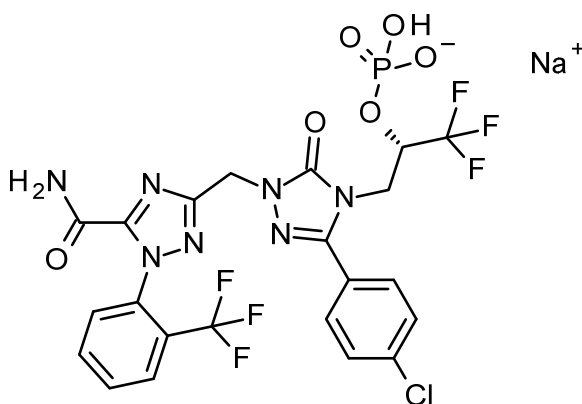
dihidrógeno (Ejemplo 10, 35,0 mg, 53,4 μmol) en agua (1,0 ml) se trató con carbonato de hidrógeno de potasio (5,34 mg, 53,4 μmol), luego se agitó durante 15 min a temperatura ambiente y se liofilizó proporcionando 36,3 mg (cuant.) del compuesto del título.

LC-MS (Método 1): $R_t = 0,73$ min; MS (ESIpos): $m/z = 656,0$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

- 5 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O): δ [ppm] = 7,97-7,93 (m, 1H), 7,88-7,79 (m, 2H), 7,71-7,58 (m, 5H), 5,39-5,24 (m, 2H), 4,90-4,67 (m, 1H, superposición con pico HDO), 4,19-4,09 (m, 2H).

Ejemplo 13

(2S)-3-[1-({5-carbamoil-1-[2-(trifluorometil)fenil]-1H-1,2,4-triazol-3-il}metil)-3-(4-clorofenil)-5-oxo-1,5-dihidro-4H-1,2,4-triazol-4-il]-1,1,1-trifluoropropan-2-il hidrógeno fosfato de sodio



10

Una solución de (2S)-3-[1-({5-carbamoil-1-[2-(trifluorometil)fenil]-1H-1,2,4-triazol-3-il}metil)-3-(4-clorofenil)-5-oxo-1,5-dihidro-4H-1,2,4-triazol-4-il]-1,1,1-trifluoropropan-2-il fosfato dihidrógeno (Ejemplo 10, 35,0 mg, 53,4 μmol) en agua (1,0 ml) se trató con carbonato disodio (5,66 mg, 53,4 μmol), luego se agitó durante 15 min a temperatura ambiente y se liofilizó proporcionando 37,9 mg (cuant.) del compuesto del título.

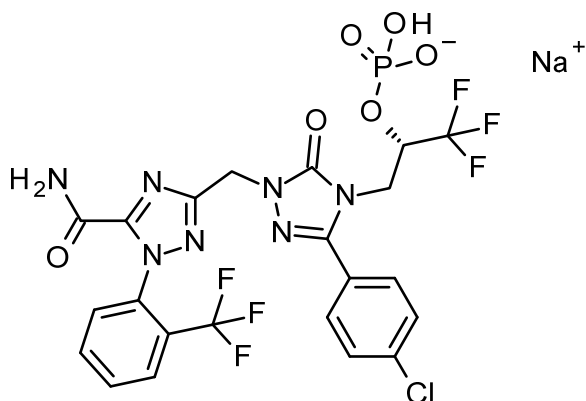
15

LC-MS (Método 1): $R_t = 0,74$ min; MS (ESIpos): $m/z = 656,1$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O): δ [ppm] = 7,97-7,93 (m, 1H), 7,89-7,78 (m, 2H), 7,74-7,57 (m, 5H), 5,40-5,22 (m, 2H), 4,92-4,64 (m, 1H, superposición con pico HDO), 4,22-4,04 (m, 2H).

Ejemplo 14

- 20 (2S)-3-[1-({5-carbamoil-1-[2-(trifluorometil)fenil]-1H-1,2,4-triazol-3-il}metil)-3-(4-clorofenil)-5-oxo-1,5-dihidro-4H-1,2,4-triazol-4-il]-1,1,1-trifluoropropan-2-il hidrógeno fosfato de sodio



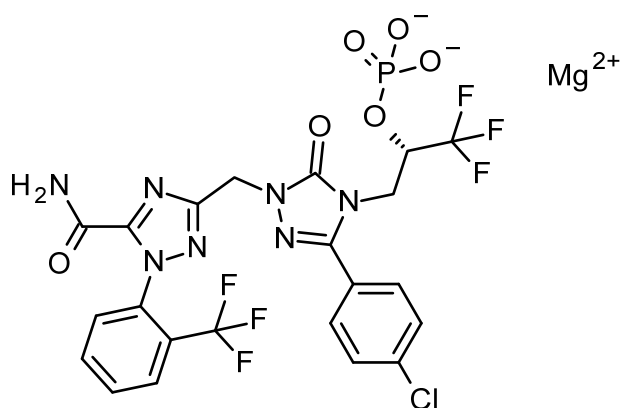
Una solución de (2S)-3-[1-({5-carbamoyl-1-[2-(trifluorometil)fenil]-1H-1,2,4-triazol-3-il}metil)-3-(4-clorofenil)-5-oxo-1,5-dihidro-4H-1,2,4-triazol-4-il]-1,1,1-trifluoropropan-2-il fosfato dihidrógeno (Ejemplo 10, 35,0 mg, 53,4 μ mol) en agua (1,0 ml) se trató con carbonato de hidrógeno de sodio (4,48 mg, 53,4 μ mol), luego se agitó durante 15 min a temperatura ambiente y se liofilizó proporcionando 36,2 mg (cuant.) del compuesto del título.

LC-MS (Método 1): R_t = 0,47 min; MS (ESIpos): m/z = 656,0 $[M+H]^+$

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O): δ [ppm] = 7,97-7,93 (m, 1H), 7,87-7,79 (m, 2H), 7,72-7,59 (m, 5H), 5,39-5,24 (m, 2H), 4,90-4,65 (m, 1H, superposición con pico HDO), 4,20-4,09 (m, 2H).

10 **Ejemplo 15**

(2S)-3-[1-({5-carbamoyl-1-[2-(trifluorometil)fenil]-1H-1,2,4-triazol-3-il}metil)-3-(4-clorofenil)-5-oxo-1,5-dihidro-4H-1,2,4-triazol-4-il]-1,1,1-trifluoropropan-2-il fosfato de magnesio



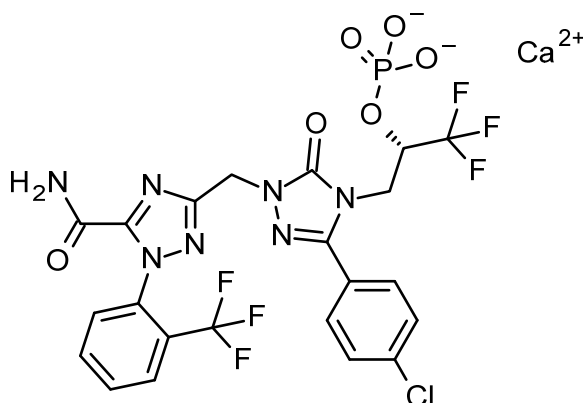
Una solución de (2S)-3-[1-({5-carbamoyl-1-[2-(trifluorometil)fenil]-1H-1,2,4-triazol-3-il}metil)-3-(4-clorofenil)-5-oxo-1,5-dihidro-4H-1,2,4-triazol-4-il]-1,1,1-trifluoropropan-2-il fosfato dihidrógeno (Ejemplo 10, 35,0 mg, 53,4 μ mol) en agua (50 ml) se trató con carbonato de magnesio (4,50 mg, 53,4 μ mol), luego se agitó durante 15 min a temperatura ambiente y se liofilizó proporcionando 37,3 mg (cuant.) del compuesto del título.

LC-MS (Método 2): R_t = 1,34 min; MS (ESIpos): m/z = 656,1 $[M+H]^+$

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O): δ [ppm] = 7,97-7,93 (m, 1H), 7,88-7,79 (m, 2H), 7,72-7,58 (m, 5H), 5,39-5,24 (m, 2H), 4,92-4,63 (m, 1H, superposición con pico HDO), 4,20-4,09 (m, 2H).

Ejemplo 16

(2S)-3-[1-({5-carbamoil-1-[2-(trifluorometil)fenil]-1H-1,2,4-triazol-3-il} metil)-3-(4-clorofenil)-5-oxo-1,5-dihidro-4H-1,2,4-triazol-4-il]-1,1,1-trifluoropropan-2-il fosfato de calcio



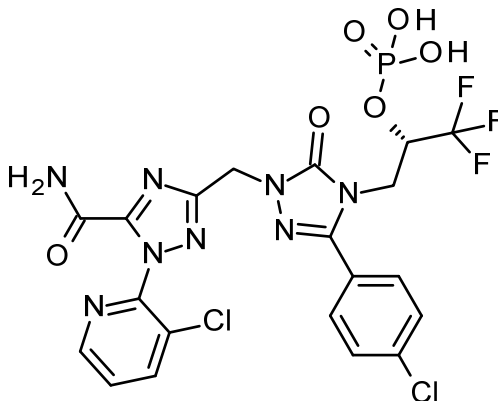
Una solución de (2S)-3-[1-({5-carbamoil-1-[2-(trifluorometil)fenil]-1H-1,2,4-triazol-3-il} metil)-3-(4-clorofenil)-5-oxo-1,5-dihidro-4H-1,2,4-triazol-4-il]-1,1,1-trifluoropropan-2-il fosfato dihidrógeno (Ejemplo 10, 35,0 mg, 53,4 μmol) en agua (15 ml) se trató con monohidrato de acetato de calcio (9,40 mg, 53,4 μmol), luego se agitó durante 15 min a temperatura ambiente y se liofilizó proporcionando 37,9 mg (cuant.) del compuesto del título.

LC-MS (Método 2): R_t = 1,33 min; MS (ESIpos): m/z = 656,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O): δ [ppm] = 8,00-7,91 (m, 1H), 7,89-7,77 (m, 2H), 7,73-7,55 (m, 5H), 5,42-5,22 (m, 2H), 4,99-4,50 (m, 1H, superposición con pico HDO), 4,27-3,99 (m, 2H).

Ejemplo 17

(2S)-3-[1-{{5-Carbamoil-1-(3-cloropiridin-2-il)-1H-1,2,4-triazol-3-il} metil}}-3-(4-cloro-fenil)-5-oxo-1,5-dihidro-4H-1,2,4-triazol-4-il]-1,1,1-trifluoropropan-2-il fosfato dihidrógeno



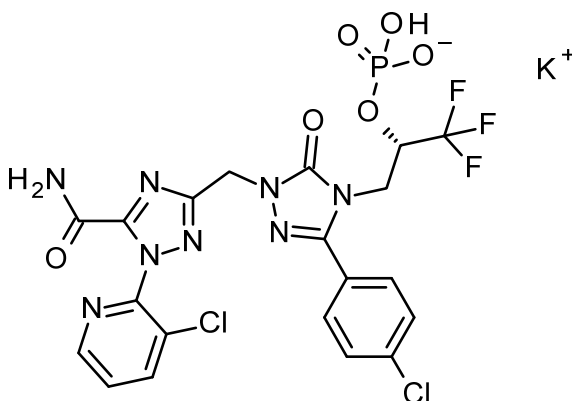
A 0°C, una solución de 3-({3-(4-clorofenil)-5-oxo-4-[(2S)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxipropil]-4,5-dihidro-1H-1,2,4-triazol-1-il} metil)-1-(3-cloropiridin-2-il)-1H-1,2,4-triazol-5-carboxamida (Ejemplo 8A, 200 mg, 368 µmol) en tetrahidrofurano (4,2 ml, 52 mmol) se trató con 4-N,N-dimetilaminopiridina (67,5 mg, 552 µmol) y trietilamina (77 µl, 550 µmol). Luego se agregó gota a gota oxicloruro de fósforo (52 µl, 0,55 mmol). La mezcla resultante se agitó durante 40 min a 0°C y luego durante 50 min a temperatura ambiente. Luego se agregó agua (420 µl) y una solución de carbonato de hidrógeno de sodio acuosa saturada (2,5 ml) y la mezcla resultante se agitó durante la noche a temperatura ambiente. Luego se evaporó tetrahidrofurano a temperatura ambiente. La solución resultante se diluyó con agua y se extrajo con acetato de etilo. La fase acuosa se llevó a pH = 1 con una solución de ácido clorhídrico (1N), se diluyó con una solución de cloruro de sodio acuosa saturada y se extrajo con acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con solución de cloruro de sodio saturada, se secaron sobre sulfato de magnesio y se concentraron. El residuo se purificó por HPLC preparativa (Método 4) para proporcionar 126 mg (55% de teoría) del compuesto del título.

LC-MS (Método 2): $R_t = 1,22$ min; MS (ESI^{neg}): $m/z = 621,0$ $[M-H]^-$

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 8,64-8,34 (m, 2H), 8,24 (dd, 1H), 7,96 (s, 1H), 7,80-7,48 (m, 5H), 5,25-5,00 (m, 2H), 4,93 – 4,76 (br m, 1H), 4,20-3,87 (m, 2H), 3,34 (br s, 2H, superposición con pico HDO).

Ejemplo 18

(2S)-3-[1-{{5-carbamoil-1-(3-cloropiridin-2-il)-1H-1,2,4-triazol-3-il} metil}-3-(4-clorofenil)-5-oxo-1,5-dihidro-4H-1,2,4-triazol-4-il]-1,1,1-trifluoropropan-2-il hidrógeno fosfato de potasio



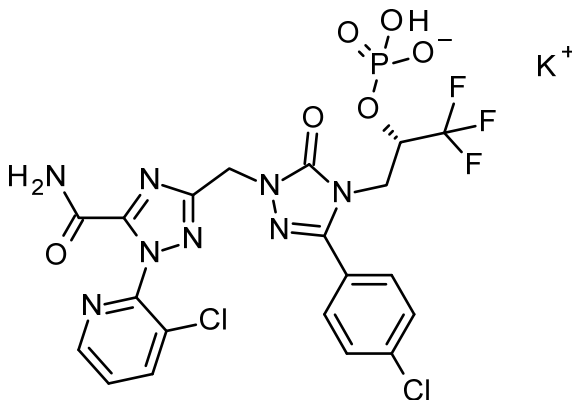
Una solución de (2S)-3-[1-{{5-carbamoil-1-(3-cloropiridin-2-il)-1H-1,2,4-triazol-3-il} metil}-3-(4-clorofenil)-5-oxo-1,5-dihidro-4H-1,2,4-triazol-4-il]-1,1,1-trifluoropropan-2-il fosfato dihidrógeno (Ejemplo 17, 35,0 mg, 56,2 µmol) en agua (2,0 ml) se trató con carbonato de hidrógeno de potasio (11,2 mg, 112 µmol), luego se agitó durante 15 min a temperatura ambiente y se liofilizó proporcionando 40,2 mg (cuant.) del compuesto del título.

LC-MS (Método 1): $R_t = 0,64$ min; MS (ESIpos): $m/z = 623,0$ $[M+H]^+$

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O): δ [ppm] = 8,54 (dd, 1H), 8,22 (dd, 1H), 7,76-7,58 (m, 5H), 5,42 – 5,29 (m, 2H), 4,92-4,63 (m, 1H, superposición con pico HDO), 4,20-4,07 (m, 2H).

Ejemplo 19

- 5 (2S)-3-[1-{{[5-carbamoyl-1-(3-cloropiridin-2-il)-1H-1,2,4-triazol-3-il]metil}-3-(4-clorofenil)-5-oxo-1,5-dihidro-4H-1,2,4-triazol-4-il}-1,1,1-trifluoropropan-2-il hidrógeno fosfato de potasio



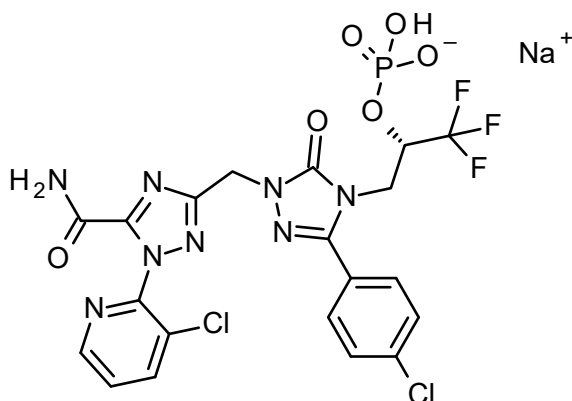
- Una solución de (2S)-3-[1-{{[5-carbamoyl-1-(3-cloropiridin-2-il)-1H-1,2,4-triazol-3-il]metil}-3-(4-clorofenil)-5-oxo-1,5-dihidro-4H-1,2,4-triazol-4-il}-1,1,1-trifluoropropan-2-il fosfato dihidrógeno
10 (Ejemplo 17, 35,0 mg, 56,2 μmol) en agua (2,0 ml) se trató con carbonato de hidrógeno de potasio (5,62 mg, 56,2 μmol), luego se agitó durante 15 min a temperatura ambiente y se liofilizó proporcionando 37,1 mg (cuant.) del compuesto del título.

LC-MS (Método 1): $R_t = 0,65$ min; MS (ESIpos): $m/z = 623,0$ $[M+H]^+$

- $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O): δ [ppm] = 8,55-8,51 (m, 1H), 8,23-8,18 (m, 1H), 7,75-7,57 (m, 5H), 5,35
15 (q, 2H), 4,90-4,63 (m, 1H, superposición con pico HDO), 4,22-4,10 (m, 2H).

Ejemplo 20

- (2S)-3-[1-{{[5-carbamoyl-1-(3-cloropiridin-2-il)-1H-1,2,4-triazol-3-il]metil}-3-(4-clorofenil)-5-oxo-1,5-dihidro-4H-1,2,4-triazol-4-il}-1,1,1-trifluoropropan-2-il hidrógeno fosfato de sodio



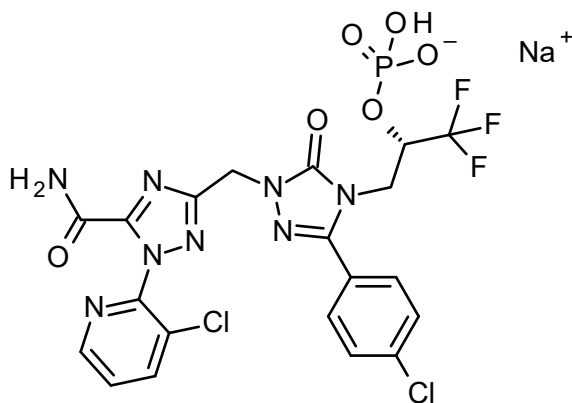
Una solución de (2S)-3-[1-{[5-carbamoil-1-(3-cloropiridin-2-il)-1H-1,2,4-triazol-3-il]metil}-3-(4-clorofenil)-5-oxo-1,5-dihidro-4H-1,2,4-triazol-4-il]-1,1,1-trifluoropropan-2-il fosfato dihidrógeno (Ejemplo 17, 35,0 mg, 56,2 μ mol) en agua (2,0 ml) se trató con carbonato disodio (5,95 mg, 56,2 μ mol), luego se agitó durante 15 min a temperatura ambiente y se liofilizó proporcionando 38,9 mg (cuant.) del compuesto del título.

LC-MS (Método 1): $R_t = 0,65$ min; MS (ESIpos): $m/z = 623,0$ $[M+H]^+$

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O): δ [ppm] = 8,56-8,53 (m, 1H), 8,25-8,20 (m, 1H), 7,75-7,58 (m, 5H), 5,42-5,28 (m, 2H), 4,90-4,64 (m, 1H, superposición con pico HDO), 4,21-4,06 (m, 2H).

Ejemplo 21

10 (2S)-3-[1-{[5-carbamoil-1-(3-cloropiridin-2-il)-1H-1,2,4-triazol-3-il]metil}-3-(4-clorofenil)-5-oxo-1,5-dihidro-4H-1,2,4-triazol-4-il]-1,1,1-trifluoropropan-2-il hidrógeno fosfato de sodio



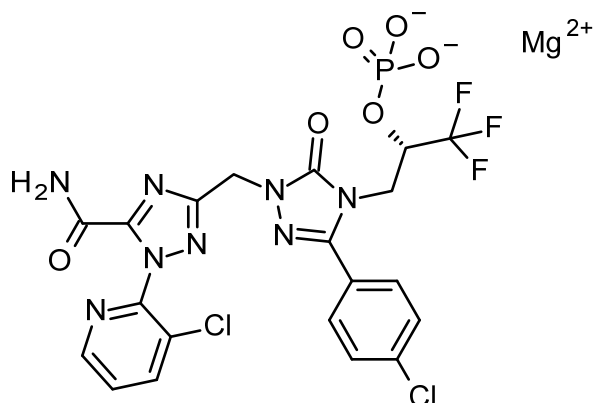
Una solución de (2S)-3-[1-{[5-carbamoil-1-(3-cloropiridin-2-il)-1H-1,2,4-triazol-3-il]metil}-3-(4-clorofenil)-5-oxo-1,5-dihidro-4H-1,2,4-triazol-4-il]-1,1,1-trifluoropropan-2-il fosfato dihidrógeno (Ejemplo 17, 35,0 mg, 56,2 μ mol) en agua (2,0 ml) se trató con fosfato dihidrógeno (4,72 mg, 56,2 μ mol), luego se agitó durante 15 min a temperatura ambiente y se liofilizó proporcionando 36,4 mg (cuant.) del compuesto del título.

LC-MS (Método 1): $R_t = 0,64$ min; MS (ESIpos): $m/z = 623,1$ $[M+H]^+$

15 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O): δ [ppm] = 8,56-8,51 (m, 1H), 8,24-8,18 (m, 1H), 7,75-7,56 (m, 5H), 5,43-5,28 (m, 2H), 4,92-4,59 (m, 1H, superposición con pico HDO), 4,25-4,09 (m, 2H).

Ejemplo 22

20 (2S)-3-[1-{[5-carbamoil-1-(3-cloropiridin-2-il)-1H-1,2,4-triazol-3-il]metil}-3-(4-clorofenil)-5-oxo-1,5-dihidro-4H-1,2,4-triazol-4-il]-1,1,1-trifluoropropan-2-il fosfato de magnesio



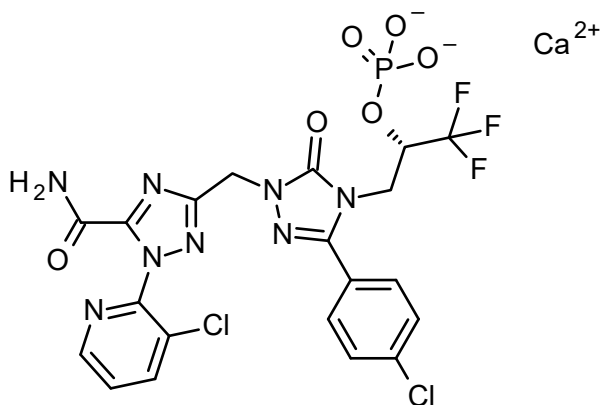
Una solución de (2S)-3-[1-{[5-carbamoyl-1-(3-cloropiridin-2-il)-1H-1,2,4-triazol-3-il]metil}-3-(4-clorofenil)-5-oxo-1,5-dihidro-4H-1,2,4-triazol-4-il]-1,1,1-trifluoropropan-2-il fosfato dihidrógeno (Ejemplo 17, 35,0 mg, 56,2 μmol) en agua (53 ml) se trató con carbonato de magnesio (4,74 mg, 56,2 μmol), luego se agitó durante 15 min a temperatura ambiente y se liofilizó proporcionando 37,8 mg (cuant.) del compuesto del título.

LC-MS (Método 2): $R_t = 1,13$ min; MS (ESIpos): $m/z = 623,0$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O): δ [ppm] = 8,57-8,52 (m, 1H), 8,26-8,19 (m, 1H), 7,77-7,58 (m, 5H), 5,43-5,28 (m, 2H), 4,95-4,58 (m, 1H, superposición con pico HDO), 4,07 (s, 2H).

10 **Ejemplo 23**

(2S)-3-[1-{[5-carbamoyl-1-(3-cloropiridin-2-il)-1H-1,2,4-triazol-3-il]metil}-3-(4-clorofenil)-5-oxo-1,5-dihidro-4H-1,2,4-triazol-4-il]-1,1,1-trifluoropropan-2-il fosfato de calcio



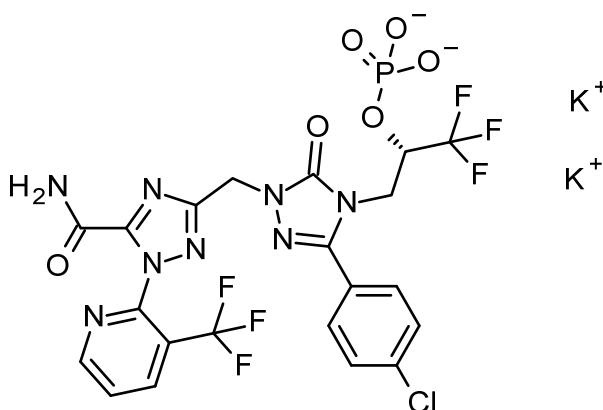
Una solución de (2S)-3-[1-{[5-carbamoyl-1-(3-cloropiridin-2-il)-1H-1,2,4-triazol-3-il]metil}-3-(4-clorofenil)-5-oxo-1,5-dihidro-4H-1,2,4-triazol-4-il]-1,1,1-trifluoropropan-2-il fosfato dihidrógeno (Ejemplo 17, 35,0 mg, 56,2 μmol) en agua (2,0 ml) se trató con monohidrato de acetato de calcio (1:1) (9,89 mg, 56,2 μmol), luego se agitó durante 15 min a temperatura ambiente y se liofilizó proporcionando 38,5 mg (cuant.) del compuesto del título.

LC-MS (Método 1): $R_t = 0,65$ min; MS (ESIpos): $m/z = 623,0$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ [ppm] = 8,56-8,52 (m, 1H), 8,25-8,19 (m, 1H), 7,76-7,58 (m, 5H), 5,42-5,29 (m, 2H), 4,68 (s, 1H, superposición con pico HDO), 4,23-4,10 (m, 2H).

Ejemplo 24

(2S)-3-[1-({5-carbamoyl-1-[3-(trifluorometil)piridin-2-il]-1H-1,2,4-triazol-3-il}-metil)-3-(4-clorofenil)-5-oxo-1,5-dihidro-4H-1,2,4-triazol-4-il]-1,1,1-trifluoropropan-2-il fosfato dipotasio



A 0°C, una solución de (2S)-3-[1-({5-carbamoyl-1-[3-(trifluorometil)piridin-2-il]-1H-1,2,4-triazol-3-il}metil)-3-(4-clorofenil)-5-oxo-1,5-dihidro-4H-1,2,4-triazol-4-il]-1,1,1-trifluoropropan-2-il fosfato dihidrógeno (Ejemplo 1, 400 mg, 0,609 mmol) en acetonitrilo (12 ml) se trató con una solución de carbonato de hidrógeno de potasio (1,2 ml, 1 M, 1,2 mmol). La mezcla resultante se agitó durante 5 min a 0°C, 5 min a temperatura ambiente y se liofilizó.

50 mg del compuesto liofilizado se disolvió en 2-propanol (3 ml). La solución resultante se concentró lentamente en agitación a temperatura ambiente. Luego de 3 semanas, el solvente se evaporó completamente. El sólido obtenido se examinó por difracción de rayos X y corresponde al compuesto del título como material mesomorfo. Una estequiometría de potasio de 1,9±0,2 se calculó según el análisis TGA (9,9% solvente residual en masa) y la cromatografía de iones (9,1% potasio en masa) de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Estequiometría} = [(\%_{\text{potasio}}) / (1 - \%_{\text{solvente residual}} - \%_{\text{potasio}})] \times [(M_{\text{ácido libre}}) / (M_{\text{potasio}})]$$

LC-MS (Método 5): R_t = 0,67 min; MS (ESIpos): m/z = 657,1 [M+H]⁺

¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ [ppm] = 8,84 (d, 1H), 8,51 (d, 1H), 7,95 (dd, 1H), 7,74-7,56 (m, 4H), 5,47-5,23 (m, 2H), 4,23-4,03 (m, 2H).

Tabla 4: Difracción en polvo de rayos X del compuesto obtenido en el ejemplo 24

Reflejos [2θ] (máximos de pico)	
3,6	20,3

Reflejos [2 θ] (máximos de pico)	
7,3	20,7
11,1	21,4
12,1	21,8
12,5	22,2
12,7	22,9
14,2	25,3
14,5	25,6
15,6	25,9
17,8	26,3
18,1	

Tabla 5: Espectro infrarrojo del compuesto obtenido en el ejemplo 24

Bandas [máximos de pico en cm ⁻¹]	
567	1031
578	1046
591*	1089
623	1123*
639	1142*
655	1227*
687*	1258
708*	1266
722	1287
727	1320
747	1349*
757*	1373
782	1403
808	1431*
821	1449
835*	1496
883	1579
974	1601
1015	1699

Las bandas marcadas con * son específicas de la sal de potasio.

SECCIÓN EXPERIMENTAL – ENSAYOS BIOLÓGICOS**Abreviaturas y acrónimos:**

Acc. n.º	número de acceso
AP	fosfatasa alcalina
AVP	arginina vasopresina
B _{máx}	máxima capacidad de unión al ligando
BSA	albúmina en suero bovino
cAMP	adenosina monofosfato cíclica
Cat. n.º	número de catálogo
ADNc	ácido desoxirribonucleico complementario
CHO	ovario de hámster chino
CRE	elemento de respuesta a cAMP
Ct	umbral de ciclo
DMEM/F12	medio de Eagle modificado por Dulbecco/ medio Ham's F12 (1:1)
ADN	ácido desoxirribonucleico
DMSO	dimetilsulfóxido
DTT	ditiotreitól
EC ₅₀	concentración eficaz máxima media
EDTA	ácido etilendiamina-tetraacético
FAM	carboxifluoresceína succinimidil éster
f.c.	concentración final
FCS	suero de ternero fetal
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanosulfónico
IC ₅₀	concentración inhibidora media máxima
K _d	constante de disociación
K _i	constante de disociación de un inhibidor
mRNA	ácido ribonucleico mensajero
PBS	solución salina amortiguada con fosfato
PEG	polietilenglicol
p.o.	<i>per os</i> , peroral
ARN	ácido ribonucleico
RTPCR	reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
SPA	ensayo de proximidad de centelleo
TAMRA	carboxitetrametilrodamina
TRIS; Tris	2-amino-2-hidroximetilpropano-1,3-diol
v/v	volumen/volumen; concentración, porcentaje de solución

La demostración de la actividad de los compuestos de la presente invención se puede lograr a través de ensayos *in vitro*, *ex vivo*, e *in vivo* que son conocidos en la técnica. Por ejemplo, para demostrar la actividad de los compuestos de la presente invención, se pueden usar los siguientes ensayos.

B-1. Ensayo celular *in vitro* para determinar actividad del receptor de vasopresina

- 5 La identificación de agonistas y antagonistas de los receptores de vasopresina V1a y V2 de humanos, ratas y perros, así como la cuantificación de la actividad de los compuestos de la invención se realizan usando líneas celulares recombinantes. Estas líneas celulares derivan originalmente de célula epitelial de ovario de hámster (ovario de hámster chino, CHO K1, ATCC: American Type Culture Collection, Manassas, VA 20108, EUA). Estas líneas celulares de prueba expresan constitutivamente
- 10 los receptores V1a y V2 de humano, rata o perro. En el caso de receptores V1a acoplados a $G_{\alpha q}$, las células también se transfectan de forma estable con una forma modificada de fotoproteínas sensibles a calcio aequorina (V1a de humano y rata) u obelina (V1a de perro), que, después de la reconstitución con el cofactor coelenterazina, emiten luz cuando hay aumentos en las concentraciones de calcio libre [Rizzuto R, Simpson AW, Brini M, Pozzan T, *Nature* **358**, 325-327 (1992); Illarionov BA, Bondar VS, Illarionova VA, Vysotski ES, *Gene* **153** (2), 273-274 (1995)]. Las células del receptor
- 15 de vasopresina resultantes reaccionan con estimulación de receptores V1a expresados recombinantemente por liberación intracelular de iones de calcio, que se pueden cuantificar por la luminiscencia de fotoproteína resultante. Los receptores V2 acoplados con G_s se transfectan de forma estable en líneas celulares que expresan el gen para luciferasa de luciérnaga bajo el control de un
- 20 promotor responsable de CRE. La activación de receptores V2 induce la activación del promotor de respuesta a CRE mediante aumento de cAMP, induciendo así la expresión de luciferasa de luciérnaga. La luz emitida por fotoproteínas de líneas celulares V1a, así como la luz emitida por luciferasa de luciérnaga de líneas celulares V2 corresponden a la activación o inhibición del receptor de vasopresina correspondiente. La bioluminiscencia de las líneas celulares se detecta usando un
- 25 luminómetro adecuado [Milligan G, Marshall F, Rees S, *Trends in Pharmacological Sciences* **17**, 235-237 (1996)].

Procedimiento de prueba:

Líneas celulares del receptor de vasopresina V1a:

- El día previo al ensayo, las células se colocan en medio de cultivo (DMEM/F12, 2% FCS, 2 mM glutamina, 10 mM HEPES, 5 μ g/ml coelenterazina) en placas de microtitulación den 384 pocillos y
- 30 se mantienen en una incubadora celular (96% de humedad, 5% v/v CO_2 , 37°C). El día del ensayo, los compuestos de prueba en varias concentraciones se colocan durante 10 minutos en los pocillos de la placa de microtitulación antes de agregar el agonista [Arg⁸]-vasopresina en una concentración de EC₅₀. La señal de luz resultante se mide inmediatamente en un luminómetro.

Líneas celulares del receptor de vasopresina V2:

El día previo al ensayo, las células se colocan en medio de cultivo (DMEM/F12, 2% FCS, 2 mM glutamina, 10 mM HEPES) en placas de microtitulación den 384 pocillos y se mantienen en una incubadora celular (96% de humedad, 5% v/v CO₂, 37°C). El día del ensayo, los compuestos de prueba en varias concentraciones y el agonista [Arg⁸]-vasopresina en una concentración de EC₅₀ se agregan juntos a los pocillos, y las placas se incuban durante 3 horas en una incubadora celular. Tras la adición del reactivo de lisis celular TritonTM y la luciferina sustrato, se mide la luminiscencia de luciferasa de luciérnaga en un luminómetro.

La Tabla 1A a continuación enumera valores individuales de IC₅₀ para los compuestos de la invención (que incluyen mezclas racémicas, así como enantiómeros separados) que se obtuvieron de líneas celulares transfectadas con el receptor V1a o V2 humano: Esto significa que estos valores IC₅₀ son los valores para el profármaco y no para el fármaco respectivo subyacente ya que el profármaco es principalmente estable en condiciones de ensayo. Los datos para el fármaco respectivo subyacente se muestran en Experimentos mencionados a continuación.

15 Tabla 1A:

Ejemplo n.º	IC₅₀ hV1a [µM]	IC₅₀ hV2 [µM]	relación IC₅₀ hV2/hV1a
4A	0,00120	0,16966	141,0
6A	0,00058	0,02390	41,4
8A	0,00102	0,03900	38,2
1	0,01572	0,19333	12,3
2	0,03950	0,62000	15,7
3	0,00615	0,12300	20,0
4	0,01110	0,15000	13,5
5	0,00505	0,08500	16,8
6	0,01550	0,22000	14,2
7	0,00885	0,16000	18,1
8	0,01700	0,14500	8,5
9	0,01400	0,22500	16,1
10	0,01063	0,04700	4,4
11	0,04050	0,03700	0,9
12	0,01650	0,02400	1,5

Ejemplo n.º	IC ₅₀ hV1a [µM]	IC ₅₀ hV2 [µM]	relación IC ₅₀ hV2/hV1a
13	0,01900	0,02650	1,4
14	0,01900	0,01850	1,0
15	0,01950	0,02100	1,1
16	0,02900	0,03050	1,1
17	0,00980	0,13000	13,3
18	0,03350	0,08400	2,5
19	0,02400	0,05100	2,1
20	0,03950	0,08550	2,2
21	0,02100	0,03800	1,8
22	0,04500	0,09000	2,0
23	0,02700	0,07350	2,7

B-2. Ensayo de unión radioactivo

Los valores de IC₅₀ y K_i se pueden determinar en ensayos de unión radioactiva usando fracciones de membrana de línea celular de riñón embrionario humano 293 (HEK293) o líneas celulares CHO-K1 que expresan los receptores de vasopresina humana V1a y V2 correspondientes.

Los receptores de vasopresina recombinante humana V1a expresados en células HEK293 se usan en 50 mM de amortiguador Tris-HCl, pH 7,4, 5 mM MgCl₂, 0,1% de BSA usando técnicas estándar. Alícuotas de membranas preparadas se incuban con compuestos de prueba en varias concentraciones en duplicados y 0,03 nM [¹²⁵I]fenilacetil-D-Tyr(Me)-Phe-Gln-Asn-Arg-Pro-Arg-Tyr-NH₂ durante 120 minutos a 25°C. La unión no específica se estima en presencia de 1 µM [Arg⁸]Vasopresina. Los receptores se filtran y lavan, los filtros luego se cuentan para determinar [¹²⁵I]fenilacetil-D-Tyr(Me)-Phe-Gln-Asn-Arg-Pro-Arg-Tyr-NH₂ específicamente unido.

Las células CHO-K1 transfectadas de forma estable con un plásmido que codifica el receptor de vasopresina recombinante humana V2 se usan para preparar membranas en 50 mM de amortiguador Tris-HCl, pH 7,4, 10 mM MgCl₂, 0,1% de BSA usando técnicas estándar. Alícuotas de membranas preparadas se incuban con compuestos de prueba en varias concentraciones en duplicados y 4 nM [³H](Arg⁸)-Vasopresina durante 120 minutos a 25°C. La unión no específica se estima en presencia de 1 mM (Arg⁸)-Vasopresina. Las membranas se filtran y se lavan 3 veces y los filtros se cuentan para determinar [³H](Arg⁸)-Vasopresina específicamente unida.

Los valores de IC₅₀ se determinan por análisis de regresión de mínimos cuadrados no lineales usando MathIQ™ (ID Business Solutions Ltd., Reino Unido). La constante de inhibición K_i se calcula usando la ecuación de Cheng and Prusoff (Cheng, Y., Prusoff, W.H., *Biochem. Pharmacol.* 22:3099-3108, 1973).

- 5 Para verificar la conversión de profármacos en fármacos respectivos, los profármacos se incuban con y sin fosfatasa alcalina. Escisión del resto de fosfato por fosfatasa alcalina convierte el profármaco en el fármaco respectivo subyacente [Coleman J. E., *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1992**, 21, 441-483]. Como profármaco y fármaco respectivo subyacente muestran diferentes valores IC₅₀, el valor del profármaco luego del tratamiento con fosfatasa alcalina se asemeja al IC₅₀ del fármaco
10 respectivo.

B-3. Ensayo celular *in vitro* para detectar la acción de antagonistas del receptor de vasopresina V1a en la regulación de genes profibróticas

- La línea celular H9C2 (American Type Culture Collection No. ATCC CRL-1446), descrita como un tipo de cardiomiocito aislado d tejido cardíaco de rata, expresa de forma endógena el receptor de
15 vasopresina V1a AVPR1A en gran cantidad de copias, mientras la expresión de AVPR2 no se puede detectar. Asimismo, la línea celular NRK49F (ATCC No. CRL1570) aislada de tejido de riñón de rata, muestra patrón de expresión similar de expresión de AVPR1A mRNA alto y reducción de expresión de AVPR2. Para ensayos celulares que detectan la inhibición de la regulación dependiente del receptor AVPR1A de expresión génica por antagonistas del receptor, el procedimiento es el
20 siguiente:

- Las células H9C2 o células NRK49F se siembran en placas de microtitulación de 6 pocillos para cultivo celular a una densidad celular de 50 000 células/ pocillo en 2,0 ml de medio Opti-MEM (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, EUA, n.º de catálogo No. 11058-021) y se mantienen en una incubadora celular (96% de humedad, 8% v/v CO₂, 37°C). Después de 24 horas, se cargan conjuntos
25 de tres pocillos (triplicado) con solución vehicular (control negativo) y solución de vasopresina ([Arg8]-vasopresina acetato, Sigma, n.º de catálogo V9879), o compuesto de prueba (disuelto en vehículo: agua con 20% v/v etanol) y solución de vasopresina. En el cultivo celular, la concentración de vasopresina final es 1 nM. La solución del compuesto de prueba se agrega al cultivo celular en pequeños volúmenes, de modo que no se exceda una concentración final de 0,03% de etanol en el
30 ensayo celular. Después de un tiempo de incubación de 5 horas, el sobrenadante de cultivo se quita bajo succión, las células adherentes se lisan en 350 µl de amortiguador RLT (Qiagen, n.º de catálogo 79216), y el ARN se aísla del lisado usando el kit RNeasy (Qiagen, n.º 74104). A esto le sigue digestión de ADNsa (Invitrogen, n.º de catálogo 18068-015), síntesis de cADN (Promega, ImProm-II Reverse Transcription System, n.º de catálogo A3800) y reacción en cadena de polimerasa por
35 transcripción inversa (RT-PCR) (pPCR MasterMix RT-QP2X-03-075, Eurogentec, Seraing, Bélgica). Todos los procedimientos se realizan de acuerdo con los protocolos de trabajo de los fabricantes del

- reactivo de prueba. Los conjuntos de cebadores para el RTPCR se seleccionan según las secuencias génicas de mRNA (NCBI GenBank Entrez Nucleotide Data Base) usando el programa Primer3Plus con sondas etiquetadas con 6-FAM TAMRA. El RTPCR para determinar la expresión de mRNA relativa de células de varios lotes de ensayo se realiza usando el detector de secuencia Applied Biosystems ABI Prism 7700 en formato de placa de microtitulación de 384 pocillos de acuerdo con las instrucciones operativas del instrumento. La expresión génica relativa se representa por el valor delta-delta Ct [Applied Biosystems, User Bulletin No. 2 ABI Prism 7700 SDS, 11 de diciembre de 1997 (actualizado 10/2001)] con referencia al nivel de expresión del gen L-32 de proteína ribosómica (n.º de acceso GenBank NM_013226) y el valor Ct umbral de Ct = 35.
- 10 Para verificar la conversión de profármacos en fármacos respectivos, los profármacos se incuban con y sin fosfatasa alcalina. Escisión del resto de fosfato por fosfatasa alcalina convierte el profármaco en el fármaco respectivo subyacente [Coleman J. E., *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1992**, 21, 441-483]. Como profármaco y fármaco respectivo subyacente muestran diferentes valores IC₅₀, el valor del profármaco luego del tratamiento con fosfatasa alcalina se asemeja al IC₅₀ del fármaco respectivo.

B-4. Ensayo celular in vitro para verificación de conversión de profármaco en fármaco

- Para verificar la conversión de profármacos en fármacos respectivos, los profármacos se incuban con y sin fosfatasa alcalina. Escisión del resto de fosfato por fosfatasa alcalina convierte el profármaco en el fármaco respectivo subyacente [Coleman J. E., *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1992**, 21, 441-483]. Como profármaco y fármaco respectivo subyacente muestran diferentes valores IC₅₀, el valor del profármaco luego del tratamiento con fosfatasa alcalina se asemeja al IC₅₀ del fármaco respectivo. La determinación de los valores IC₅₀ de compuestos de la invención en el receptor V1a humano se lleva a cabo usando una línea celular recombinante. La línea celular deriva originalmente de una célula epitelial de ovario de hámster (ovario de hámster chino, CHO K1, ATCC: American Type Culture Collection, Manassas, VA 20108, EUA). Esta línea celular de prueba expresa constitutivamente el receptor V1a humano. Las células también se transfectan de forma estable con una forma modificada de fotoproteína sensibles a calcio aequorina que, después de la reconstitución con el cofactor coelenterazina, emite luz tras aumentos en la concentración de calcio libre [Rizzuto R, Simpson AW, Brini M, Pozzan T, *Nature* **358**, 325-327 (1992); Illarionov BA, Bondar VS, Illarionova VA, Vysotski ES, *Gene* **153** (2), 273-274 (1995)]. La célula del receptor de vasopresina resultante reacciona con la estimulación del receptor V1a expresado recombinantemente por liberación intracelular de iones de calcio, que se puede cuantificar por la luminiscencia de fotoproteína resultante. La bioluminiscencia de la línea celular se detecta usando un luminómetro adecuado [Milligan G, Marshall F, Rees S, *Trends in Pharmacological Sciences* **17**, 235-237 (1996)].

Procedimiento de prueba:

El día previo al ensayo, las células se siembran en medio de cultivo (DMEM/F12, 2% FCS, 2 mM glutamina, 10 mM HEPES, 5 µg/ml coelenterazina) en placas de microtitulación de 384 pocillos y se mantienen en una incubadora celular (96% de humedad, 5% v/v CO₂, 37°C). El día del ensayo, 100 µl de compuestos de prueba a una concentración de 100 µM se incuban durante 15 minutos con 500 unidades de fosfatasa alcalina a 37°C en amortiguador tyrode (20 mM HEPES, 130 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM NaHCO₃, 2 mM MgCl₂, pH 7,4). Luego de la incubación los compuestos se diluyen inmediatamente y se colocan durante 10 minutos a 37°C en las células V1a sembradas. Para la detección de la actividad antagonista de los compuestos se agrega [Arg⁸]-vasopresina a concentración de EC₅₀ y la señal de luz resultante se mide inmediatamente en un luminómetro.

Se realizó LC-MS de las muestras de compuesto (Ejemplo 4A y Ejemplo 1) con y sin fosfatasa alcalina (AP).

Método 6 (LC-MS):

Instrumento MS: Instrumento Waters TOF; UPLC tipo Instrumento: Waters Acquity I-CLASS; Columna: Waters, HSST3, 2,1 x 50 mm, C18 1,8 µm; eluyente A: 1 l agua + 0,01% ácido fórmico; eluyente B: 1 l acetonitrilo + 0,01% ácido fórmico; gradiente: 0,0 min 2% B → 0,5 min 2% B → 7,5 min 95% B → 10,0 min 95% B; Horno: 50°C; Flujo: 1,00 ml/min; detección UV: 210 nm.

Ejemplo 4A con AP

LC-MS (Método 6): R_t = 3,83 min; MS (ESIpos): m/z = 577,1 [M+H]⁺

Ejemplo 4A sin AP

LC-MS (Método 6): R_t = 3,84 min; MS (ESIpos): m/z = 577,1 [M+H]⁺

Ejemplo 1 con AP

LC-MS (Método 6): R_t = 3,83 min; MS (ESIpos): m/z = 577,1 [M+H]⁺

Ejemplo 1 sin AP

LC-MS (Método 6): R_t = 3,19 min; MS (ESIpos): m/z = 657,1 [M+H]⁺

Tabla 2A: Los valores IC₅₀ de fármacos y sus respectivos profármacos en presencia y ausencia de fosfatasa alcalina (AP)

Ejemplo n.º	fármaco	IC ₅₀ con AP [µM]	IC ₅₀ sin AP [µM]
1	profármaco	0,00145	0,01310
4A	fármaco	0,00135	0,00125

10	profármaco	0,00130	0,01100
6A	fármaco	0,00135	0,00135
17	profármaco	0,00103	0,00945
8A	fármaco	0,00110	0,00170

B-5. La inhibición de vasopresina indujo agregación de plaquetas humanas para la verificación de la conversión de profármaco en fármaco

Las plaquetas humanas expresan el receptor de V1a de forma endógena. Se descubrió que las concentraciones de vasopresina de arginina (AVP) relativamente altas (aprox. 50-100 nM) estimulan la agregación de plaquetas ex vivo. Entonces, las plaquetas enriquecidas con sangre humana pueden servir como un tejido que expresa V1a para estudios farmacológicos antagonistas de vasopresina.

Para verificar la conversión de profármacos en fármacos respectivos, los profármacos se incuban con y sin fosfatasa alcalina. Escisión del resto de fosfato por fosfatasa alcalina convierte el profármaco en el fármaco. Como profármaco y fármaco respectivo subyacente muestran diferentes valores IC_{50} , el valor del profármaco luego del tratamiento con fosfatasa alcalina se asemeja al IC_{50} del fármaco respectivo.

100 μ l del compuesto de prueba a una concentración de 100 μ M se incuban durante 15 min con 500 unidades de fosfatasa alcalina a 37°C en amortiguador Tyrode modificado (134 mM NaCl, 12 mM $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, 0,34 mM $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, 2,9 mM KCl, 5 mM HEPES, 5 mM Glucosa) y se almacenan a 4°C hasta su uso adicional en ensayo de agregación plaquetaria.

La sangre humana se recoge en tubos de plástico que contienen un volumen 1/10 de 0,106 M de citrato de trisodio por punción venosa en voluntarios sanos no fumadores (n=4/grupo) que no tomaron fármacos por al menos 1 semana. El plasma rico en plaquetas (PRP) se obtiene por centrifugación de la muestra de sangre a 140 g durante 20 min a temperatura ambiente. El sedimento resultante se descarta y el PRP se centrifuga adicionalmente (11.000 rpm, 1 min) para producir plasma pobre en plaquetas (PPP). La agregación de plaquetas se mide de forma turbidimétrica usando un agregómetro (APACT 4). La reacción se sigue monitoreando cambios en transmisión de luz en alícuotas de 178 μ L de PRP, en agitación continua a 37°C, en comparación con control de PPP. Varias concentraciones de antagonistas de vasopresina (en 2 μ L) se agregan a PRP 5 min antes de la adición de 20 μ L AVP (concentración final 100 nM). Los efectos inhibidores de los compuestos se determinan midiendo la amplitud máxima de la curva de agregación en comparación con la respuesta de control. Los valores de IC_{50} se calculan según una curva de inhibición de respuesta a la concentración por un programa de regresión no lineal iterativo. Todos los valores se expresan como valores promedio (Tabla 3A).

Tabla 3A: Efectos de compuestos de prueba en agregación en plasma rico en plaquetas humano.

Ejemplo n.º	fármaco	IC₅₀ con AP [μM]	IC₅₀ sin AP [μM]
1	profármaco	0,01274	0,14460
4A	fármaco	0,01020	0,02115

B-6. Efectos sobre la contracción de anillos de vasos de ratas aislados**Aorta aislada**

- 5 Los compuestos de prueba se pueden investigar en anillos aórticos aislados de ratas macho Wistar que expresan el receptor V1a. Las ratas macho Wistar se sometieron a eutanasia usando dióxido de carbono. La aorta se remueve y coloca en amortiguador helado Krebs-Henseleit de la siguiente composición (en mmol/l): NaCl 112, KCl 5,9, CaCl₂ 2,0, MgCl₂ 1,2, NaH₂PO₄ 1,2, NaHCO₃ 25, glucosa 11,5. La aorta se corta en anillos de 3 mm y se transfiere a 20 ml de baños de órganos que
- 10 contienen solución Krebs-Henseleit equilibrada con 95% O₂, 5% CO₂ a 37°C. Para registrar la tensión isométrica los anillos se montan entre dos ganchos. La tensión restante se ajusta hasta 3 g. Después de un período de equilibrio, cada experimento se inicia exponiendo la preparación a K⁺ (50 mM) de solución Krebs-Henseleit. Los anillos aórticos luego se precontraen usando 1 nmol/l Arg-vasopresina. Después de establecida una contracción estable, se construye una curva de respuesta a
- 15 dosis cumulativa del compuesto de prueba. La contracción estabilizada inducida por Arg-vasopresina se define como 100% de tensión. La relajación se expresa como porcentaje de tensión.

Arteria renal aislada

- Las ratas macho Wistar (200-250 g) se sometieron a eutanasia usando dióxido de carbono. La arteria renal se remueve y coloca en amortiguador helado Krebs-Henseleit de la siguiente composición (en
- 20 mmol/l): NaCl 112, KCl 5,9, CaCl₂ 2,0, MgCl₂ 1,2, NaH₂PO₄ 1,2, NaHCO₃ 25, glucosa 11,5. Para medir la tensión isométrica, los segmentos de anillo, de 2 mm de longitud, se montan en un miógrafo de cámara de vasos pequeños (Danish Myo Technology A/S, Dinamarca) usando dos cables de tungsteno sujetos a montajes de mandíbula. Un montaje de mandíbula se une a un micrómetro permitiendo el control de la circunferencia del vaso. El otro montaje de mandíbula se une con un
- 25 transductor de fuerza para medir el desarrollo de tensión. La preparación total se mantiene en una cámara con solución de sal fisiológica a 37°C burbujeada con oxígeno. Después de 30 min de período de equilibrio, los vasos se extienden a su diámetro óptimo de lumen para desarrollo de tensión activo que se determina en función de la relación de tensión de circunferencia interna-pared. La circunferencia interna se establece en 90% de lo que sería la de los vasos si se hubieran expuesto a
- 30 una tensión pasiva equivalente a la producida por una presión transmural de 100 mmHg.

Después, los vasos se lavan tres veces con amortiguador Krebs-Henseleit y se dejan equilibrar durante 30 min. La contractilidad luego se analiza por una exposición de dos veces a una solución de K^+ alto (50 mmol/l KCl). Después de lavar con amortiguador Krebs-Henseleit los vasos luego se precontraen luego usando 1 nmol/l Arg-vasopresina. Después de establecida una contracción estable, se construye una curva de respuesta a dosis cumulativa del compuesto de prueba. La contracción estabilizada inducida por Arg-vasopresina se define como 100% de tensión. La relajación se expresa como porcentaje de tensión.

Para verificar la conversión de profármacos en fármacos respectivos, los profármacos se incuban con y sin fosfatasa alcalina. Escisión del resto de fosfato por fosfatasa alcalina convierte el profármaco en el fármaco respectivo subyacente [Coleman J. E., *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1992**, 21, 441-483]. Como profármaco y fármaco respectivo subyacente muestran diferentes valores IC_{50} , el valor del profármaco luego del tratamiento con fosfatasa alcalina se asemeja al IC_{50} del fármaco respectivo.

B-7. Ensayo *in vivo* para detectar efectos cardiovasculares: medición de presión sanguínea en ratas anestesiadas (modelo de 'desafío' de vasopresina)

Se usan ratas macho Sprague-Dawley (250-350 g de peso corporal) bajo anestesia de inyección de ketamina/xilazina/pentobarbital. Tubos de polietileno (PE-50, Intramedic®), que se precargan con solución de cloruro de sodio isotónica que contiene heparina (500 IU/ml), se introducen en la vena yugular y la vena femoral y luego se relacionan. Mediante un acceso venoso, con la ayuda de una jeringa, se inyecta Arg-vasopresina (SIGMA); la sustancia de prueba se administra mediante el segundo acceso venoso. Para la determinación de la presión sanguínea sistólica, se relaciona un catéter de presión (Millar SPR-320 2F) en la arteria carótida. El catéter arterial está conectado a un transductor de presión que alimenta sus señales a una computadora de registro equipada con software de registro adecuado. En un experimento típico, al animal experimental se le administran 3-4 inyecciones de bolo sucesivas en intervalos de 10-15 min con una cantidad definida de Arg-vasopresina (30 ng/kg) en solución de cloruro de sodio isotónica. Cuando la presión sanguínea alcanzó nuevamente niveles iniciales, la sustancia de prueba se administra como un bolo con infusión continua posterior en un solvente adecuado. Después de esto, en intervalos definidos (10-15 min), se administra nuevamente la misma cantidad de Arg-vasopresina que al comienzo. En función de los valores de presión sanguínea, se hace una determinación de la medida con la que la sustancia de prueba contrarresta el efecto hipertenso de Arg-vasopresina. Animales de control solo reciben solvente en vez de la sustancia de prueba.

Luego de la administración intravenosa, los compuestos de la invención en comparación con los controles del solvente ocasionan una inhibición del aumento de presión sanguínea por Arg-vasopresina.

B-8. Ensayo *in vivo* para detectar efectos mediados por el receptor V2 de vasopresina: investigaciones de diuresis en ratas conscientes mantenidas en jaulas de metabolismo

Se mantienen ratas Wistar (400-500 g de peso corporal) con acceso libre a alimento (Altromin) y agua potable. Durante el experimento, los animales se mantienen con acceso libre a agua potable durante 7 horas individualmente en jaulas de metabolismo adecuadas para ratas de esta clase de peso (Tecniplast Deutschland GmbH, D-82383 Hohenpeißenberg). Al comienzo del experimento, se les administra a los animales la sustancia de prueba en un volumen de 1 ml/kg de peso corporal de un solvente adecuado (2-Hidroxipropil-beta-ciclodextrina) mediante sonda en el estómago. Los animales de control solo recibieron solvente. Las pruebas de control y sustancia se realizan en paralelo el mismo día. Los grupos de control y los grupos de dosis de sustancia consisten en 6 a 8 animales. Durante el experimento, la orina excretada por los animales se recoge continuamente en un receptor en la base de la jaula. El volumen de orina se determina por separado para cada animal. Antes de comenzar el experimento, el peso corporal de los animales individuales se determina.

Luego de la administración intravenosa, en comparación con las aplicaciones de control de solvente, un compuesto de bloqueo del receptor V2 de vasopresina ocasionaría una excreción aumentada de orina, que se basa esencialmente en una excreción aumentada de agua (acuaresis).

La Tabla 4A a continuación muestra cambios observados en la excreción urinaria con relación al control de solvente (= 100%) para ejemplos de compuestos de la invención y compuestos de comparación a tres dosificaciones diferentes:

20 Tabla 4A:

Ejemplo n.º	Dosificación [mg/kg]	Volumen urinario [% vs. control]	Dosificación [mg/kg]	Volumen urinario [% vs. control]	Dosificación [mg/kg]	Volumen urinario [% vs. control]
WO2016/071212 (Ejemplo 82)	0,3	413	1,0	848	3,0	1416
4A	0,3	95	1,0	154	3,0	134
1	0,3	127	1,0	117	3,0	108

Los resultados mostrados en Tabla 4A demuestran que los compuestos de la presente invención no poseen ninguna actividad de bloqueo de V2 dependiente de la dosis significativo a las dosis indicadas *in vivo*. Esto es contrario al Ejemplo 82 de WO2016/071212 que dio surgimiento a un incremento dependiente de la dosis, de hasta catorce veces, en el volumen urinario versus el grupo de control del vehículo a una dosis de 3 mg/kg i.v.

B-9. Ensayo in vivo para detectar efectos renales protectores: Modelo de lesión de isquemia aguda/reperfusión en roedores

Se obtienen ratones macho C57Bl/6J criados en laboratorio de 6-8 semanas de edad en Taconic Biosciences, y se obtienen ratas Sprague Dawley® de 6-8 semanas de edad en Charles River. Tanto
5 ratas como ratones se mantienen en condiciones de laboratorio estándar, ciclos de 12 horas de luz-
oscuridad con acceso a alimentación normal y tomando agua ad libitum. Para el modelo de lesión
por reperfusión isquémica se usa un total de 10-12 ratas o ratones en cada grupo de control y
experimental.

Los animales se anestesian con isoflurano inhalado continuamente. Se realiza una nefrectomía
10 derecha a través de una incisión en el flanco derecho 7 días antes de los procedimientos isquémicos
en los riñones contralaterales. Para la isquemia renal se realiza una incisión en el flanco izquierdo.
Los vasos renales se exponen por disección del pedículo renal izquierdo. Se usan grapas vasculares
no traumáticas para detener el flujo de sangre (arteria y vena) durante 45 min (ratas) o 25 min
(ratones) de isquemia. La reperfusión se establece removiendo las grapas. La pared abdominal (capa
15 muscular y piel) se cierra con suturas de 5.0 polipropileno. Se aplica Temgesic® (buprenorfina, 0,025
mg/kg s.c.) como analgésico.

Se recoge orina de cada animal en jaulas metabólicas durante la noche antes de sacrificarlos 24h
después de la isquemia. Después de sacrificarlos, se obtienen las muestras de sangre bajo anestesia
terminal. Después de la centrifugación de las muestras de sangre, se aísla el suero. Se mide creatinina
20 en suero y urea en suero mediante analizador de bioquímica clínica (Pentra 400). Para la evaluación
de biomarcadores de lesión en riñones en suero y urinarios (lipocalina asociada con neutrófilo
gelatinasa [NGAL], ELISA de molécula de lesión renal - 1 [KIM-1] y Osteopontina) se realizan de
acuerdo con el protocolo de los fabricantes. Se mide la creatinina y albúmina urinarias para
determinar la relación albúmina/creatinina.

25 ARN total se aísla de los riñones. Los riñones izquierdos se congelaron instantáneamente en
nitrógeno líquido en el sacrificio. El tejido de riñones luego se homogeniza y se obtiene ARN. ARN
total se transcribe en ADNc. Usando NGAL renal PCR en tiempo real TaqMan, la expresión de
ARNm de Osteopontina, KIM-1, Nefrina y Podocina se analiza en tejidos de riñones completos.

Las diferencias entre grupos se analizaron por ANOVA unidireccional con correcciones de Dunnett
30 para múltiples comparaciones. La importancia estadística se define como $< 0,05$. Todos los análisis
estadísticos se realizan usando GraphPad Prism 7.

B-10. Ensayo in vivo para detectar efectos cardiovasculares: investigaciones hemodinámicas en perros anestesiados

Se anestesian perros beagle machos (Beagle, Marshall BioResources, EUA) con un peso de entre 10
35 y 15 kg con pentobarbital (30 mg/kg i.v., Narcoren®, Merial, Alemania) para las intervenciones

quirúrgicas y exámenes hemodinámicos y funcionales. Pancuroniumbromide (Pancuronium Inresa, Inresa, Alemania, 2-4 mg/animal i.v.) sirve además como un relajante muscular. Los perros se intuban y ventilan con una mezcla de aire ambiente/oxígeno (30/70%), alrededor de 2,5-4 L/min. La ventilación ocurre usando un ventilador de GE Healthcare (Avance, Alemania) y se monitorea
 5 usando un analizador de dióxido de carbono (-Datex Ohmeda). Se mantiene la anestesia por infusión continua de pentobarbital (50 µg/kg/min); se usa fentanilo como un analgésico (10 µg/kg/h).

En intervenciones preparatorias, los perros se equipan con un marcapasos cardíaco. Al comienzo del experimento, se implanta un marcapasos cardíaco de Biotronik (Logos®, Alemania) en un bolsillo de piel subcutáneo y se pone en contacto con el corazón mediante un electrodo de marcapasos (Siello
 10 S60®, Biotronik, Alemania) que se avanza a través de la vena yugular externa con iluminación en el ventrículo derecho.

Entonces los accesos se remueven y los perros se despiertan espontáneamente de la anestesia. Después de 7 días adicionales, se activa el marcapasos descrito anteriormente y el corazón se estimula a una frecuencia de 220 latidos por minuto.

15 Los experimentos de prueba de fármaco real se realizan 28 días después del comienzo de la estimulación del marcapasos usando la siguiente instrumentación:

- Introducción de un catéter en la vejiga para liberación de la vejiga y para medir el flujo de orina
- Unión de electrocardiografía (ECG) lleva a las extremidades para medición de ECG
- 20 • Introducción de un introductor de vaina relleno con solución de cloruro de sodio en la arteria femoral. Este tubo está conectado con un sensor de presión (Braun Melsungen, Melsungen, Alemania) para medir la presión arterial sistémica
- Introducción de un catéter Millar Tip (tipo 350 PC, Millar Instruments, Houston, EUA) a través de un puerto asegurado en la arteria carótida, para medir hemodinámica cardíaca
- 25 • Introducción de un catéter Swan-Ganz (CCOmbo 7.5F, Edwards, Irvine, EUA) mediante la vena yugular en la arteria pulmonar, para medir la salida cardíaca, saturación de oxígeno, presiones arteriales pulmonares y presión venosa central
- Colocación de un catéter venoso en la vena cefálica para infundir pentobarbital para remplazo líquido y para muestreo de sangre (determinación de niveles de plasma de la
 30 sustancia o de otros valores sanguíneos clínicos)
- Colocación de un catéter venoso en la vena safena para infundir fentanilo y para administración de la sustancia
- Infusión de vasopresina (Sigma) en dosificación en aumento hasta una dosis de 4 mU/kg/min. Las sustancias farmacológicas luego se analizan con esta dosificación.

Las señales primarias se amplían si es necesario (ACQ7700, Data Sciences International, EUA, o Edwards-Vigilance-Monitor, Edwards, Irvine, EUA) y se introducen posteriormente en el sistema Ponemah (Data Sciences International, EUA) para evaluación. Las señales se registran continuamente a lo largo del período experimental y se procesan además de forma digital por dicho software y se promedian durante 30 segundos.

B-11. Efectos agudos en cambios mediados por vasopresina de hemodinámica sistémica, flujo sanguíneo renal y oxigenación en ratas anestesiadas

Los experimentos se realizan en ratas macho Sprague Dawley (Charles River, Alemania; 350-450 g peso corporal). En la preparación de procedimientos quirúrgicos las ratas se anestesian con isoflurano y se colocan en una tabla calentada para mantener la temperatura corporal interna a 37°C, se evaluaron usando un termómetro rectal insertado. La anestesia por inhalación con isoflurano se aplica usando un vaporizador calibrado para inducir y mantener la anestesia con isoflurano 5 vol. % y 2 vol. %, respectivamente. Una cánula PE50 se coloca en la arteria femoral derecha para monitorear la presión arterial promedio (MAP). Otro catéter PE50 se inserta en la vena femoral para infusión intravenosa. El riñón izquierdo se expone por una incisión en el flanco izquierdo y se separa de las uniones perirrenales. La cápsula del riñón permanece intacta. Durante la cirugía y posteriores períodos de equilibrio y control, las ratas reciben una infusión intravenosa de solución salina (0,9% NaCl) a tasa 100 µL/min. Las mediciones renales de flujo sanguíneo renal (RBF) se registran usando una sonda de flujo sanguíneo Doppler láser (Oxford Optronix, Reino Unido) que se une y estabiliza a la superficie del riñón. La sonda se inserta en la corteza renal a una profundidad de 2 mm y otra en la médula renal a 4 mm. El flujo sanguíneo renal, oxígeno y temperatura se miden por sonda de sensor combinada (Oxford Optronix, Reino Unido). La MAP, frecuencia cardíaca (HR), RBF, temperatura y oxígeno se registran continuamente. Luego de la cirugía y equilibrio, las mediciones iniciales se determinan durante 20 minutos. A las ratas luego se les suministra una infusión intravenosa con vasopresina a tasa 50 ng/kg/min en 100 µL/kg durante 20 minutos. En el tercer período, se determina el efecto de infusión combinada de vasopresina y un antagonista del receptor de vasopresina dual (Ejemplo 82 de WO 2016/071212) o un antagonista de V1a selectivo (Ejemplo 1) o vehículo que se aplica como bolo en diferente concentración.

Tabla 5A: Efectos del antagonista del receptor de vasopresina dual Ejemplo 82 de WO2016/071212 en cambios mediados por vasopresina (AVP) de hemodinámica sistémica y renal en ratas.

Ejemplo 82 de WO 2016/071212	Basal Promedio ± SD	AVP 50 [ng/kg/min] Promedio ± SD	AVP + Vehículo 1 [mL/kg] Promedio ± SD	AVP + Ejemplo 82 de WO 2016/071212 30 [μg/kg] Promedio ± SD
MAP [mmHg]	96,69 ± 1,18	135,20 ± 12,87	129,90 ± 0,76	100,40 ± 3,22
HR [BPM]	330,4 ± 2,33	276,90 ± 18,85	263,30 ± 0,27	309,60 ± 10,79
RBF [U]	822,2 ± 14,22	668,20 ± 62,58	614,50 ± 7,94	820,90 ± 20,28
pO ₂ [mmHg]	39,05 ± 0,98	20,56 ± 10,27	7,86 ± 2,21	23,71 ± 0,34
n = 8 animales/grupo. Los datos son promedio ± SD. MAP = presión sanguínea arterial promedio. HR = frecuencia cardíaca. RBF = flujo sanguíneo renal. pO ₂ = presión parcial de oxígeno renal				

5 Tabla 6A: Efectos del antagonista del receptor V1a de vasopresina selectivo Ejemplo 4A en cambios mediados por vasopresina (AVP) de hemodinámica sistémica y renal en ratas.

Ejemplo 4A	Basal Promedio ± SD	AVP 50 [ng/kg/min] Promedio ± SD	AVP + Vehículo 1 [mL/kg] Promedio ± SD	AVP + Ejemplo 4A 30 [μg/kg] Promedio ± SD
MAP [mmHg]	97,44 ± 0,57	135,40 ± 12,9	130,50 ± 1,09	114,80 ± 7,42
HR [BPM]	334,10 ± 1,12	283,40 ± 16,69	268,60 ± 2,68	270,50 ± 2,89
RBF [U]	1060,00 ± 8,89	758,30 ± 107,40	698,60 ± 18,83	878,10 ± 96,92
pO ₂ [mmHg]	27,86 ± 0,96	17,04 ± 4,42	11,32 ± 0,87	15,86 ± 4,01

n = 8 animales/grupo. Los datos son promedio $\pm$ SD.

MAP = presión sanguínea arterial promedio. HR = frecuencia cardíaca. RBF = flujo sanguíneo renal. pO_2 = presión parcial de oxígeno renal

Tabla 7A: Efectos del antagonista del receptor V1a de vasopresina Ejemplo 1 en cambios mediados por vasopresina (AVP) de hemodinámica sistémica y renal en ratas.

Ejemplo 1	Basal Promedio $\pm$ SD	AVP 50 [ng/kg/min] Promedio $\pm$ SD	AVP + Vehículo 1 [mL/kg] Promedio $\pm$ SD	AVP + Ejemplo 1 30 [μg/kg] Promedio $\pm$ SD
MAP [mmHg]	97,93 $\pm$ 1,09	124,60 $\pm$ 10,04	117,70 $\pm$ 2,27	103,50 $\pm$ 4,97
HR [BPM]	371,20 $\pm$ 1,73	292,30 $\pm$ 25,25	272,20 $\pm$ 1,56	276,20 $\pm$ 4,46
RBF [U]	924,60 $\pm$ 16,72	791,90 $\pm$ 46,47	780,30 $\pm$ 13,35	877,00 $\pm$ 43,01
pO_2 [mmHg]	20,70 $\pm$ 0,39	10,54 $\pm$ 3,391	11,20 $\pm$ 0,61	14,32 $\pm$ 1,13
n = 8 animales/grupo. Los datos son promedio $\pm$ SD. MAP = presión sanguínea arterial promedio. HR = frecuencia cardíaca. RBF = flujo sanguíneo renal. pO_2 = presión parcial de oxígeno renal				

B-12. Estabilidad de pH

- 5 0,15 mg del compuesto de prueba se disolvieron en 0,1 ml de dimetilsulfóxido y 0,4 ml de acetonitrilo. Para la disolución completa el vial de HPLC con la solución de muestra se agita y se trata con irradiación ultrasónica. Luego se agrega 1,0 ml de la respectiva solución amortiguadora y la muestra se centrifuga en vórtice. La solución de muestra se analiza por HPLC para determinar la cantidad del compuesto de prueba en un momento particular durante un período de tiempo de 24 h a
- 10 37 °C. Las áreas pico en porcentaje se usan para la cuantificación.

Amortiguadores

pH 4,0: amortiguador Fluka, Orden n.º 33643 (11,76 g ácido cítrico, 2,57 g cloruro de sodio y 2,72 g hidróxido de sodio).

- pH 7,4: 90 g de cloruro de sodio, 13,61 g de fosfato dihidrógeno de potasio y 83,35 g de solución de
- 15 hidróxido de sodio 1 M se componen hasta 1 litro con agua Millipore y luego se diluyen 1:10. Ajuste con ácido fosfórico a pH = 7,4.

pH 10: amortiguador Fluka, orden n.º 33649 (4,77 g Borax, 0,73 g hidróxido de sodio).

Porciones de 15 µl de la solución de muestra se analizan por HPLC en diferentes momentos (0 h, 1 h, 2 h, 4 h y 24 h) a 37°C. Las áreas pico en porcentaje se usan para cuantificación.

Método HPLC

- 5 Eluyente: A = 1 ml ácido trifluoroacético /L en agua; B = 1 ml ácido trifluoroacético/L en acetonitrilo
- Columna: Nucleodur 100 C18ec, 3µm, 50 x 2 mm
- Temperatura: 37°C
- Detección: 214 nm
- 10 Inyección: 15 µl
- Gradiente:
- | Tiempo (min) | A (%) | B (%) | Flujo (ml/min) |
|--------------|-------|-------|----------------|
| 0,0 | 98 | 2 | 0,75 |
| 1,0 | 98 | 2 | 0,75 |
| 15,0 | 5 | 95 | 0,75 |
| 17,5 | 5 | 95 | 0,75 |
| 17,7 | 98 | 2 | 1,50 |
| 18,2 | 98 | 2 | 1,50 |
| 18,5 | 98 | 2 | 1,00 |
| 19,0 | 98 | 2 | 0,75 |
- 15
- 20

Las relaciones del área pico (F) en diferentes momentos con relación al área pico en el punto de partida se muestran en la Tabla 8A para ejemplos representativos:

Tabla 8A:

Ejemplo n.º	Amortiguador pH	% Compuesto Prueba luego de 4 h [F(t=4h)x100/F(t=0h)]	% Compuesto Prueba luego de 24 h [F(t=24h)x100/F(t=0h)]
1	4	100	100
1	7,4	99	99
1	10	99	98
10	4	100	100
10	7,4	100	100
17	4	100	100
17	7,4	100	100

B-13. SolubilidadProcedimiento experimental

Para cada sustancia 0,5 - 0,6 mg se pesan exactamente. En cada caso, se agrega medio suficiente a la muestra de modo tal que se obtiene una concentración de $c = 500 \mu\text{g} / \text{ml}$. La solución de muestra se agita durante 24 h a temperatura ambiente y 1400 rpm.

Otro peso de muestra de 0,5 - 0,6 mg es necesario para la solución de calibración de DMSO. Esta muestra se llena con DMSO hasta una concentración de $c = 600 \mu\text{g} / \text{ml}$. Dos soluciones de calibración se preparan de esta solución madre. En un vial HPLC de 2 ml, 1000 μl de DMSO se introducen inicialmente y 34,4 μl de la solución madre se colocan con pipeta ($c = 20 \mu\text{g} / \text{ml}$). 71,4 μl de esta solución ($c = 20 \mu\text{g} / \text{ml}$) se colocan en otro vial HPLC de 2 ml que contiene 500 μl de DMSO ($c = 2,5 \mu\text{g} / \text{ml}$).

Luego de agitar las soluciones de prueba, 230 μl del sobrenadante se transfieren a un tubo de centrifugación y se centrifugan a 42 000 rpm (223 000 g) durante 30 min. 180 μl del sobrenadante se toman luego y cada uno se diluye con DMSO (1:5 muestra 1; 1:100 muestra 2), y se transfieren a viales de HPLC. Las dos soluciones de calibración y las soluciones de muestra diluidas se analizan por HPLC. La cuantificación se realiza en las correspondientes áreas pico.

Solvente

Agua destilada; ácido trifluoroacético (Merck; 1.08262.0100); acetonitrilo (grado de HPLC); DMSO (Merck; 8.02912.2500).

Medio

Amortiguador de citrato pH4: amortiguador Fluka, Orden n.º 33643 (11,76 g ácido cítrico, 2,57 g cloruro de sodio y 2,72 g hidróxido de sodio).

Amortiguador pH7: amortiguador Fluka, Orden n.º 33646 (3,52 g dihidrógenofosfato de potasio, 7,26 g fosfato de hidrógeno de potasio).

Amortiguador PBS pH7,4: Solución de 6,18 g de cloruro de sodio y 3,96 g de fosfato dihidrógeno de sodio en 1 L de agua destilada, ajustada con solución de hidróxido de sodio acuosa 1M a pH 7,4.

Amortiguador-Tris pH8,5: 0,6057 g de TRIS se disolvieron en 95 ml de agua, se ajustó a pH 8,5 con ácido clorhídrico acuoso, se llenó con agua hasta alcanzar 100 ml de volumen.

30 Equipo HPLC

Agilent 1100 o aparato comparable con detección UV, longitud de onda variable (z.B. haz de diodos); baño ultrasónico; Vibromix von Janke & Kunkel; Thermomixer de Eppendorf

Método HPLC

Eluyente A: 1 ml ácido trifluoroacético/L agua; Eluyente B: 1 ml ácido trifluoroacético/L acetonitrilo

Gradiente: Tiempo (min)		A (%)	B (%)	Flujo (ml/min)
5	0,0	98	2	1,5
	0,2	98	2	1,5
	3,3	10	90	1,5
	4,0	10	90	1,5
	4,1	98	2	2,5
10	4,7	98	2	2,5
	5,0	98	2	1,5

Columna: Zorbax Extend-c18, 50 x 3,0 mm, 3,5 µm; temperatura de columna: 30°C; Flujo: 1,5 ml/min; detector: 214 / 254 nm; volumen de inyección: 20µl.

La solubilidad de los ejemplos representativos se muestra en la Tabla 9A.

Tabla 9A:

Ejemplo n.º	Solubilidad [mg/l]			
	pH = 4	pH = 7,0	pH = 7,4	pH = 8,5
4A	8,7	no detectable	-	6,7
6A	no detectable	no detectable	-	4,3
8A	5,9	2,8	-	4,0
1	> 500	> 500	-	> 500
4	> 500	-	> 500	> 500
6	> 500	-	464	464
7	> 500	-	> 500	> 500
9	> 500	-	> 500	447
10	454	> 500	-	479
17	> 500	> 500	-	> 500
20	> 500	-	> 500	> 500
22	> 500	-	> 500	> 500

B-14. Determinación de parámetros farmacocinéticos luego de administración intravenosa y oral

Los parámetros farmacocinéticos de los compuestos de acuerdo con la invención se determinan en ratas macho Wistar, perros hembra Beagle y monos hembra Cynomolgus. La administración intravenosa se lleva a cabo por un vehículo de formulación adecuado para la respectiva especie, como una formulación de plasma/DMSO o solución salina fisiológica (pH4 o más) para ratas, o una formulación de agua/PEG400/etanol o solución salina fisiológica (pH4 o más) para perros y monos. En todas las especies, la administración oral de la sustancia disuelta se realiza por alimentación forzada, usando un vehículo de formulación adecuado, como formulación de agua/PEG400/etanol o solución salina fisiológica. La toma de muestra de sangre de ratas se simplifica insertando un catéter adecuado en la vena yugular externa derecha antes de la administración de sustancia. La operación se realiza al menos un día antes del experimento con anestesia de isoflurano y de la administración de un analgésico (atropina/Rimadyl (3/1) 0,1 ml s.c.). La sangre se toma (generalmente al menos 6 puntos de tiempo) en un período de tiempo que incluye puntos de tiempo terminales de al menos 7 horas hasta un máximo de 72 horas después de la administración de sustancia. Cuando se toma la sangre, se pasa a tubos que contienen un anticoagulante adecuado, preferentemente K-EDTA. Luego el plasma sanguíneo se obtiene por centrifugación y opcionalmente se almacena a -20°C hasta procesamiento adicional.

Un estándar interno (que también puede ser una sustancia químicamente no relacionada) se agrega a las muestras de los compuestos de acuerdo con la invención, las muestras de calibración y clasificadores, y le sigue la precipitación de proteínas por medio de exeso de acetonitrilo. De manera alternativa, el estándar interno se agrega al acetonitrilo y la mezcla luego se agrega en exceso a muestras de los compuestos de acuerdo con la invención, muestras de calibración y clasificadores para precipitación de proteínas. La adición de una solución amortiguadora coincidió con las condiciones LC, y posterior mezcla en vórtice, es seguido por la centrifugación a 2800g. El sobrenadante se analiza por LC-MS/MS usando C18 o columnas de fase inversa de bifenilo y mezclas de fase móvil variable. Las sustancias se cuantifican mediante las alturas o áreas máximas de cromatogramas de iones extraídos de experimentos de monitoreo de iones seleccionados específicos.

La concentración de plasma/gráficas de tiempo determinados se usan para calcular los parámetros farmacocinéticos como AUC (área bajo la curva), C_{máx} (máxima concentración), t_{1/2} (semivida terminal), F (biodisponibilidad), MRT (tiempo de permanencia medio) y CL (depuración), usando un programa de cálculo farmacocinético validado.

Dado que la cuantificación de sustancia se realiza en plasma, es necesario determinar la distribución de sangre/plasma de la sustancia para ser capaz de ajustarse a los parámetros farmacocinéticos correspondientes. Con este fin, una cantidad definida de sustancia se incubó en sangre entera de la especie en cuestión en una mezcla oscilante durante 20 min. Después de la centrifugación a 2800g,

la concentración de plasma se midió (por medio de LC-MS/MS usando C18 o columnas de fase inversa de bifenilo y mezclas de fase móvil variable) y se determinó calculando la relación de la concentración de sangre entera contra la concentración de plasma (valor $C_{\text{sangre}}/C_{\text{plasma}}$).

C) Ejemplos de trabajo de composiciones farmacéuticas

Las sustancias de acuerdo con la invención pueden convertirse en preparaciones farmacéuticas de la siguiente forma:

Comprimido:

5 **Composición:**

100 mg del compuesto del Ejemplo 1, 50 mg de lactosa (monohidrato), 50 mg de almidón de maíz, 10 mg de polivinilpirrolidona (PVP 25) (de BASF, Alemania) y 2 mg de estearato de magnesio.

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

Producción:

- 10 La mezcla del compuesto del Ejemplo 1, lactosa y almidón se granula con una solución de fuerza al 5% (m/m) del PVP en agua. Después de secarse, los gránulos se mezclan con el estearato de magnesio durante 5 min. Esta mezcla se comprime en una prensa de formación de comprimidos convencional (véase anteriormente formato del comprimido).

Suspensión oral

15 **Composición:**

1000 mg del compuesto del Ejemplo 1, 1000 mg de etanol (96%), 400 mg de Rhodigel (goma xantana de FMC, EUA) y 99 g de agua.

10 ml de suspensión oral corresponde a una sola dosis de 100 mg del compuesto de la invención.

Producción:

- 20 El Rhodigel se suspende en etanol; y el compuesto del Ejemplo 1 se agrega a la suspensión. El agua se agrega con agitación. La mezcla se agita durante alrededor de 6 h hasta que la hinchazón del Rhodigel esté completa.

Solución i.v. estéril:

- 25 El compuesto de acuerdo con la invención se disuelve en una concentración por debajo de la solubilidad de saturación en un solvente fisiológicamente aceptable (por ejemplo, solución de cloruro de sodio isotónica, solución de glucosa 5% y/o solución de PEG 400 30%). La solución se esteriliza por filtración y se rellena en recipientes de inyección estériles y libres de pirógenos.

- 30 Aunque la invención se describió con referencia a modalidades específicas, es evidente que otras modalidades y variaciones de la invención se pueden encontrar por parte de otros expertos en la técnica sin apartarse del espíritu y alcance verdaderos de la invención. Las reivindicaciones pretenden entenderse como que incluyen todas dichas variaciones de modalidades y equivalentes.