

COMPUESTOS AGONISTAS DE GPR35

CAMPO DE LA INVENCION

La presente solicitud se refiere a compuestos y su uso como agonistas del receptor acoplado a proteína G 35 (GPR35). Los compuestos descritos en la presente pueden ser útiles en el tratamiento o prevención de enfermedades en las que están involucrados los receptores GPR35.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El GPR35 es un receptor huérfano perteneciente a la familia de los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) de siete dominios transmembrana. La superfamilia GPCR representa una gran familia de transductores de señales que desempeñan un papel clave en la regulación de diversos aspectos de la fisiología humana. Debido a su trazabilidad farmacológica, estos receptores se han estudiado intensamente como posibles dianas farmacológicas. Un análisis reciente ha puesto de manifiesto que más de 475 fármacos actúan sobre 108 GPCR únicos, lo que representa aproximadamente el 34 % de los fármacos aprobados por la FDA. Aún hay posibilidades de descubrir y desarrollar nuevos fármacos para GPCR huérfanos para los que aún no se han identificado ligandos endógenos.

GPR35 se descubrió originalmente como un marco de lectura abierto que codifica para una proteína de 309 aminoácidos y se localizó en el cromosoma humano 2q37.3 (O'Dowd et al. Genomics, 47, 310-3, 1998). Se mostró que el receptor se expresa en una variedad de tejidos, con alta expresión informada en tejidos gastrointestinales, pulmón y ganglio de la raíz dorsal. El receptor también se encuentra expresado en células inmunitarias, así como en tejidos tal como el bazo, el músculo esquelético y la médula espinal.

De acuerdo con su patrón de expresión, ahora hay evidencia acumulada que destaca el papel terapéutico de GPR35 en diversas indicaciones, incluidas las enfermedades de las vías respiratorias, los síndromes metabólicos (por ejemplo, diabetes), las enfermedades cardiovasculares (por ejemplo, hipertensión) y el dolor. Los ligandos que se dirigen a GPR35 pueden ofrecer utilidad para el tratamiento de una amplia gama de condiciones de enfermedades humanas.

La identidad del ligando endógeno para GPR35 sigue siendo un debate y hasta la fecha se han descrito varios ligandos putativos que incluyen ácido 2-acil lisofosfatídico, CXCL17 y ácido quinurénico. Muchos de los ligandos informados solo muestran una actividad débil en el receptor o muestran falta de especificidad biológica, lo que plantea preguntas sobre la verdadera identidad del ligando endógeno.

Se ha informado que una amplia gama de agonistas sintéticos actúa en GPR35, incluidos zaprinast, ácido pamoico, cromolina, fármacos diuréticos de asa (bumetanida, furosemida), metabolitos de aspirina, quercetina y dicumarol. Además, también se ha informado una actividad agonista débil con agentes antiinflamatorios sulfasalazina y ácido 5-aminosalicílico, que se usan ampliamente en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria del intestino ($EC_{50} \sim 3 \mu M$) (US20130316985).

También se ha informado que los compuestos de la clase de tirosina quinasa, tirofistina (tirofistina-51) así como un inhibidor de catecol-O-metiltransferasa (COMT), entacapona actúan en el receptor destacando la diversidad de la clase de ligando GPR35. Debido a la posible participación de GPR35 en enfermedades humanas, ha habido un interés creciente en el desarrollo de ligandos que son altamente potentes y muestran selectividad por GPR35. La dilucidación de la biología de GPR35 se ha visto algo obstaculizada por la disponibilidad de herramientas farmacológicas adecuadas. De hecho, muchos de los agonistas de GPR35 documentados (endógenos y sintéticos) demuestran solo una actividad débil o parcial en GPR35 y carecen de especificidad de diana, lo que dificulta la disección de la vía. Además, ha quedado claro que algunos compuestos muestran selectividad de especies y posiblemente sesgo de ligando; el supuesto ligando endógeno ácido quinurénico es un ejemplo en el que se informa que la potencia en el receptor humano es al menos 100 veces menor en comparación con el ortólogo de rata (Jenkins et al. *Br J Pharmacol* 162, 733-748, 2011). Por lo tanto, se necesitan agonistas y antagonistas potentes y selectivos de GPR35 para desentrañar el papel fisiológico de este receptor.

Más recientemente, los estudios de asociación de genoma amplio (GWAS) han identificado polimorfismos de un nucleótido individual (SNP) para GPR35 que se han asociado con enfermedad inflamatoria del intestino (IBD). Se han descrito dos SNP, uno de los cuales es un SNP no sinónimo (rs3749171) que codifica una sustitución T108M en el 3^{er} dominio transmembrana (Ellinghaus et al. *Hepatology* 58, 1074-1083, 2013). Este residuo no se conserva en todos los mamíferos y el impacto del polimorfismo en la transducción de señales aún no se ha dilucidado. Un segundo polimorfismo en el locus de GPR35 (rs4676410) codifica

una variante de intrón corriente arriba de GPR35. Un estudio de asociación de todo el fenoma usando 4 grandes cohortes de datos del mundo real demostró la asociación de esta variante genética (rs4676410) con un fenotipo de IBD que confirma los vínculos diana-enfermedad informados anteriormente en estudios anteriores (Diogo et al. Nat Commun 9, 4285, 2018). La asociación informada del polimorfismo de GPR35 en la IBD ha despertado interés en el papel terapéutico potencial de GPR35 para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales.

La enfermedad inflamatoria del intestino es un trastorno gastrointestinal inflamatorio recidivante crónico que comúnmente involucra el íleon y/o el colon. Se cree que la fisiopatología implica una respuesta inmunitaria intestinal anormal, lo que resulta en inflamación de la mucosa, barrera intestinal defectuosa y aumento de la permeabilidad GI. La estrategia de tratamiento implica en gran medida un enfoque gradual a través del uso combinado de agentes tal como aminosalicilatos, corticosteroides, inmunosupresores, productos biológicos (por ejemplo, anti-TNF) y antibióticos, sin embargo, muchos pacientes experimentan un control incompleto de la enfermedad, destacando la alta necesidad insatisfecha. En particular, un aspecto que sigue siendo mal tratado y poco reconocido es el dolor abdominal. El dolor es un síntoma común experimentado por la gran mayoría de los pacientes con IBD durante el curso de la enfermedad y puede surgir de una consecuencia directa o indirecta de la inflamación intestinal. Cualquiera que sea la causa, el dolor afecta negativamente la calidad de vida de los pacientes con IBD. Hasta la fecha, el manejo del dolor abdominal asociado con la IBD sigue siendo un desafío. Los analgésicos de uso común, tal como los agentes antiinflamatorios no esteroideos (NSAID, por sus siglas en inglés), a menudo pueden exacerbar la condición, dejando a los pacientes con opciones de tratamiento limitadas. Por lo tanto, existe una gran necesidad insatisfecha de agentes que puedan proporcionar un alivio rápido del dolor y se necesita con urgencia el desarrollo de nuevos fármacos.

En estudios preclínicos, los ratones mutantes para GPR35 muestran mayores grados de daño epitelial colónico después de una lesión química, en comparación con los ratones tipo silvestre. Los ratones knockout para GPR35 muestran una expresión elevada de citocinas inflamatorias y remodeladoras, aunque los números de afluencia de células inflamatorias en la mucosa no muestran una diferencia general (Farooq et al. Digestive Diseases and Sciences, 63, 2910-22, 2018). También se ha informado un papel de GPR35 en la homeostasis de la barrera, con agentes tal como el cromoglicato de sodio que demuestran la capacidad de reducir la permeabilidad GI en una serie de modelos de sensibilización intestinal (Forbes et al. J Exp Med 205: 897-913, 2008; Yokooji et al. Int Arch Allergy Immunol. 167:193-202, 2015).

De acuerdo con estos hallazgos, se ha mostrado que GPR35 juega un papel en la regulación de las proteínas de unión estrecha y promueve la migración de células epiteliales en estudios *in vitro*. Finalmente, GPR35 se expresa ricamente en neuronas del ganglio de la raíz dorsal (DRG) donde se ha mostrado que se colocaliza con canales iónicos nociceptivos y juega un papel en el procesamiento del dolor (Ohshiro et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 365, 344-8, 2008). Además de los efectos informados sobre la protección de barrera, la cromolina reduce la hipersensibilidad visceral en una cepa de rata sensible al estrés (Carroll et al. PLoS One.8:e84718, 2013), destacando su potencial utilidad en el tratamiento del dolor.

El cromoglicato de sodio es un estabilizador de mastocitos aprobado para una variedad de indicaciones, incluida la mastocitosis sistémica, la profilaxis de la rinitis alérgica y el asma, la conjuntivitis alérgica y la alergia alimentaria (junto con la restricción dietética). Se informa que el uso de cromoglicato en la mastocitosis sistémica da como resultado una mejora de la diarrea, enrojecimiento, dolores de cabeza, vómitos, urticaria y dolor abdominal. Los ensayos que evalúan la efectividad del cromoglicato de sodio en la alergia alimentaria han informado resultados mixtos, con altas dosis generalmente requeridas para ofrecer protección. Se mostró que las dosis de hasta 2 g/día son efectivas para atenuar la gravedad de los síntomas gastrointestinales en pacientes con síndrome de intestino irritable debido a alergia alimentaria (Lunardi et al. Clin Exp Allergy. 21:569-72, 1991). Se han informado hallazgos similares en niños con alergia a la leche en el criterio de valoración de permeabilidad gastrointestinal.

Además de los trastornos gastrointestinales, GPR35 ha recibido interés como diana para el tratamiento de trastornos alérgicos, incluido el asma. En el pulmón, la cromolina se ha usado durante mucho tiempo como una terapia efectiva para el asma con un buen perfil de seguridad y tolerabilidad, pero con una farmacocinética subóptima. Se estima que aproximadamente el 5-12 % del fármaco se absorbe después de la deposición en las vías respiratorias y, más recientemente, se ha desarrollado una formulación mejorada de cromolina (PA101) que logra una deposición de fármaco significativamente mayor en el pulmón.

Clínicamente, la cromolina muestra eficacia en la supresión de la respuesta asmática de inicio inmediato y tardío después de la exposición al alérgeno. En un ensayo de prueba de concepto de fase II, PA101 demostró eficacia en la reducción de la frecuencia de la tos en pacientes con fibrosis pulmonar idiopática. El ARNm de GPR35 está regulado positivamente en respuesta a la exposición a anticuerpos IgE y se ha informado que la cromolina bloquea la liberación de mediadores inflamatorios en cortes de pulmón humano sensibilizados pasivamente con anticuerpos IgE. Es probable que estos efectos involucren varios

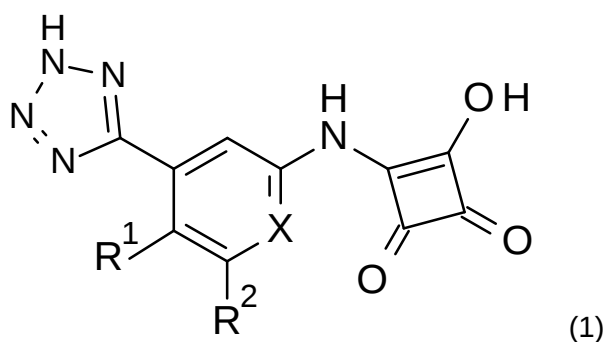
mecanismos, incluida la regulación de la estabilización de los mastocitos y la broncoconstricción inducida por reflejos.

Por lo tanto, los datos emergentes resaltan un amplio potencial terapéutico para los agonistas de GPR35, que van desde trastornos de mastocitos, tratamiento de condiciones de dolor agudo y crónico y enfermedades asociadas con enfermedades alérgicas o inflamatorias tanto en el sistema gastrointestinal como en el pulmón.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a compuestos que tienen actividad como agonistas del receptor acoplado a la proteína G 35 (GPR35).

En resumen, en un aspecto, la invención proporciona compuestos de la fórmula (1):



o una sal o tautómero del mismo, en donde;

X es N o CH;

R¹ es H o halo;

R² es H, halo, alquilo de C₁₋₆ opcionalmente sustituido, cicloalquilo de C₃₋₆ opcionalmente sustituido, alcoxi de C₁₋₆ opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido u O-arilo opcionalmente sustituido.

Los compuestos se pueden usar como agonistas del receptor GPR35. Los compuestos se pueden usar en la fabricación de medicamentos. Los compuestos pueden ser para usarse en el tratamiento, prevención, mejora, control o reducción del riesgo de trastornos asociados con GPR35. Los compuestos se pueden usar en el tratamiento de trastornos de mastocitos, condiciones de dolor agudo y crónico y enfermedades asociadas con enfermedades alérgicas o inflamatorias tanto en el sistema gastrointestinal como en el pulmón.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 es un patrón de difracción de rayos X en polvo de una forma cristalina de la sal de trometamina del Compuesto A (Hidrato I).

La Figura 2 es una curva de calorimetría diferencial de barrido de una forma cristalina de la sal de trometamina del Compuesto A (Hidrato I).

La Figura 3 es una curva de Análisis Gravimétrico Térmico de una forma cristalina de la sal de trometamina del Compuesto A (Hidrato I).

La Figura 4 es un patrón de difracción de rayos X en polvo de una forma cristalina de la sal de trometamina (Hidrato II).

La Figura 5 es una curva de calorimetría diferencial de barrido de una forma cristalina de la sal de trometamina del Compuesto A (Hidrato II).

La Figura 6 es una curva de Análisis Gravimétrico Térmico de una forma cristalina de la sal de trometamina del Compuesto A (Hidrato II).

La Figura 7 es un patrón de difracción de rayos X en polvo de una forma cristalina de ácido libre del Compuesto A (Patrón 3).

La Figura 8 es una curva de Análisis Gravimétrico Térmico de una forma cristalina de ácido libre del Compuesto A (Patrón 3).

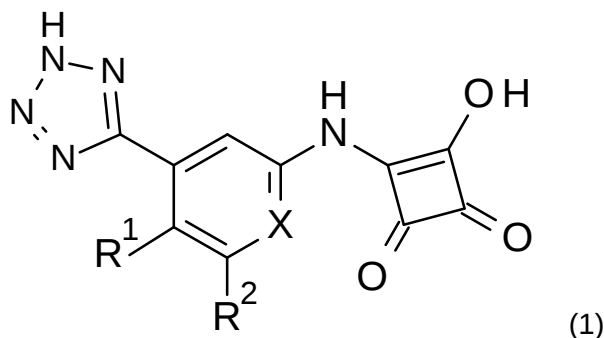
La Figura 9 es un patrón de difracción de rayos X en polvo de una forma cristalina de ácido libre del Compuesto A (Patrón 1).

La Figura 10 es una curva de Análisis Gravimétrico Térmico de una forma cristalina de ácido libre del Compuesto A (Patrón 1).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La invención se refiere a nuevos compuestos. La invención se refiere al uso de nuevos compuestos como agonistas del receptor GPR35. La invención también se refiere al uso de nuevos compuestos en el tratamiento o prevención de enfermedades en las que están involucrados los receptores GPR35. La invención se refiere además al uso de nuevos compuestos en la fabricación de medicamentos para usarse como agonistas del receptor GPR35.

La invención proporciona compuestos de la fórmula (1):



o una sal o tautómero del mismo, en donde;

X es N o CH;

R¹ es H o halo;

R² es H, halo, alquilo de C₁₋₆ opcionalmente sustituido, cicloalquilo de C₃₋₆ opcionalmente sustituido, alcoxi de C₁₋₆ opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido u O-arilo opcionalmente sustituido.

En los compuestos de la presente, X puede ser N. X puede ser CH.

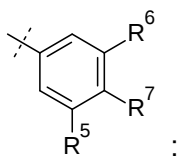
En los compuestos de la presente, R¹ puede ser H. R¹ puede ser halo. R¹ puede ser Cl o F. R¹ puede ser Cl. R¹ puede ser F. R¹ puede ser Br.

En los compuestos de la presente, R² puede ser H. R² puede ser halo. R² puede ser alquilo de C₁₋₆ opcionalmente sustituido. R² puede ser cicloalquilo de C₃₋₆ opcionalmente sustituido. R² puede ser alcoxi de C₁₋₆ opcionalmente sustituido. R² puede ser arilo opcionalmente sustituido. R² puede ser heteroarilo opcionalmente sustituido. R² puede ser heteroarilo monocíclico opcionalmente sustituido. R² puede ser heteroarilo bicíclico opcionalmente sustituido. R² puede ser O-arilo opcionalmente sustituido.

R² puede ser H, alquilo de C₁₋₆ opcionalmente sustituido con 1 a 6 átomos de flúor, cicloalquilo de C₃₋₆ opcionalmente sustituido con 1 a 6 átomos de flúor o alcoxi de C₁₋₆ opcionalmente sustituido con 1 a 6 átomos de flúor. R² puede ser H, trifluorometilo, etilo, ciclopropilo, ciclohexilo o metoxi.

R² puede ser fenilo opcionalmente sustituido con R³, piridilo opcionalmente sustituido con R³, O-fenilo opcionalmente sustituido con R³, indazolilo opcionalmente sustituido con R³

o piridazinilo opcionalmente sustituido con R^3 , en donde R^3 es H, halo, alquilo de C_{1-6} opcionalmente sustituido con 1 a 6 átomos de flúor, cicloalquilo de C_{3-6} opcionalmente sustituido con 1 a 6 átomos de flúor, alcoxi de C_{1-6} opcionalmente sustituido con 1 a 6 átomos de flúor, $-\text{CO}_2R^4$, $-\text{CONHCH}_2R^4$, $-\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{OR}^4$, $-\text{OR}^4$, $-\text{OCH}_2R^4$, $-\text{CH}_2R^4$, $-\text{OCH}_2R^4$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OR}^4$, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OR}^4$, $-\text{CONHR}^4$ o $-\text{CON}(\text{CH}_3)R^4$; donde R^4 es H, alquilo de C_{1-6} opcionalmente sustituido con 1 a 6 átomos de flúor, o un grupo:



R^5 , R^6 y R^7 son independientemente H, halo, CO_2R^8 , CONR^8R^9 o alquilo de C_{1-6} opcionalmente sustituido con 1 a 6 átomos de flúor, en donde uno o dos átomos de carbono del grupo alquilo de C_{1-6} pueden reemplazarse opcionalmente por O;

R^8 y R^9 son independientemente H o alquilo de C_{1-6} opcionalmente sustituido con 1 a 6 átomos de flúor.

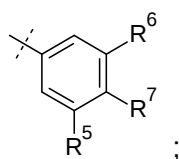
R^2 puede ser arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido u O-arilo opcionalmente sustituido, en donde el sustituyente opcional es R^3 .

R^2 puede ser arilo opcionalmente sustituido, O-arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, heteroarilo monocíclico opcionalmente sustituido o heteroarilo bicíclico opcionalmente sustituido, en donde el sustituyente opcional es R^3 .

R^2 puede ser fenilo sustituido opcionalmente con R^3 , piridilo sustituido opcionalmente con R^3 , O-fenilo sustituido opcionalmente con R^3 , indazolilo sustituido opcionalmente con R^3 o piridazinilo sustituido opcionalmente con R^3 .

R^3 puede ser H, halo, alquilo de C_{1-6} opcionalmente sustituido con 1 a 6 átomos de flúor, cicloalquilo de C_{3-6} opcionalmente sustituido con 1 a 6 átomos de flúor, alcoxi de C_{1-6} opcionalmente sustituido con 1 a 6 átomos de flúor, $-\text{CO}_2R^4$, $-\text{CONHCH}_2R^4$, $-\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{OR}^4$, $-\text{OR}^4$, $-\text{OCH}_2R^4$, $-\text{CH}_2R^4$, $-\text{OCH}_2R^4$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OR}^4$, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OR}^4$, $-\text{CONHR}^4$ o $-\text{CON}(\text{CH}_3)R^4$;

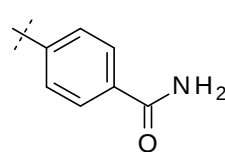
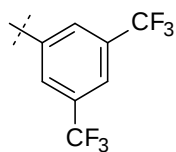
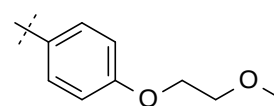
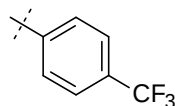
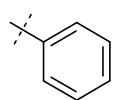
donde R^4 es H, alquilo de C_{1-6} opcionalmente sustituido con 1 a 6 átomos de flúor, o un grupo:



R^5 , R^6 y R^7 son independientemente H, halo, CO_2R^8 , CONR^8R^9 o alquilo de C_{1-6} opcionalmente sustituido con 1 a 6 átomos de flúor, en donde uno o dos átomos de carbono del grupo alquilo de C_{1-6} pueden reemplazarse opcionalmente por O;

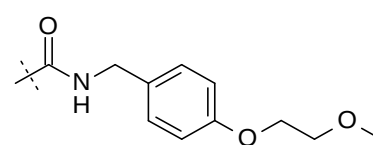
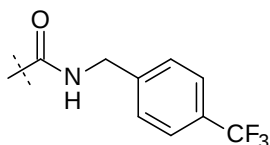
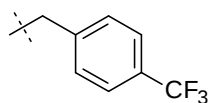
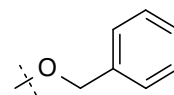
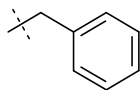
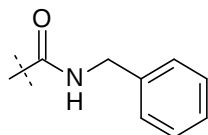
R^8 y R^9 son independientemente H o alquilo de C_{1-6} opcionalmente sustituido con 1 a 6 átomos de flúor.

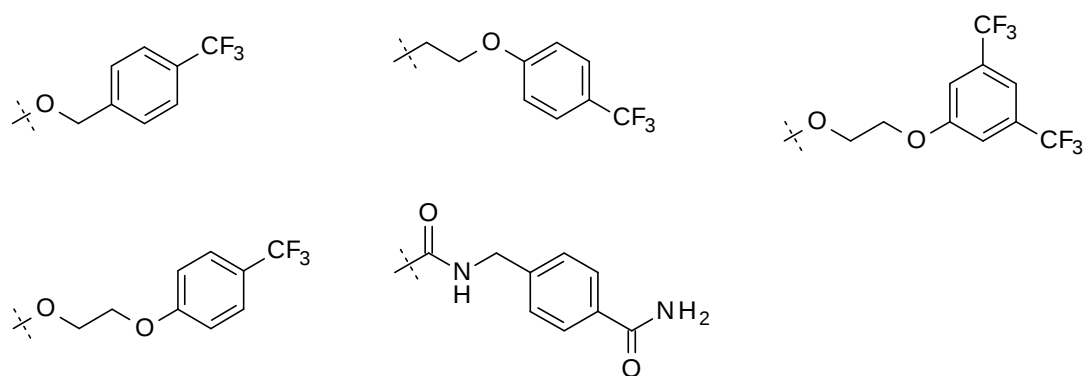
En los compuestos de la presente, R^4 puede ser H, metilo o puede seleccionarse del grupo que consiste en:



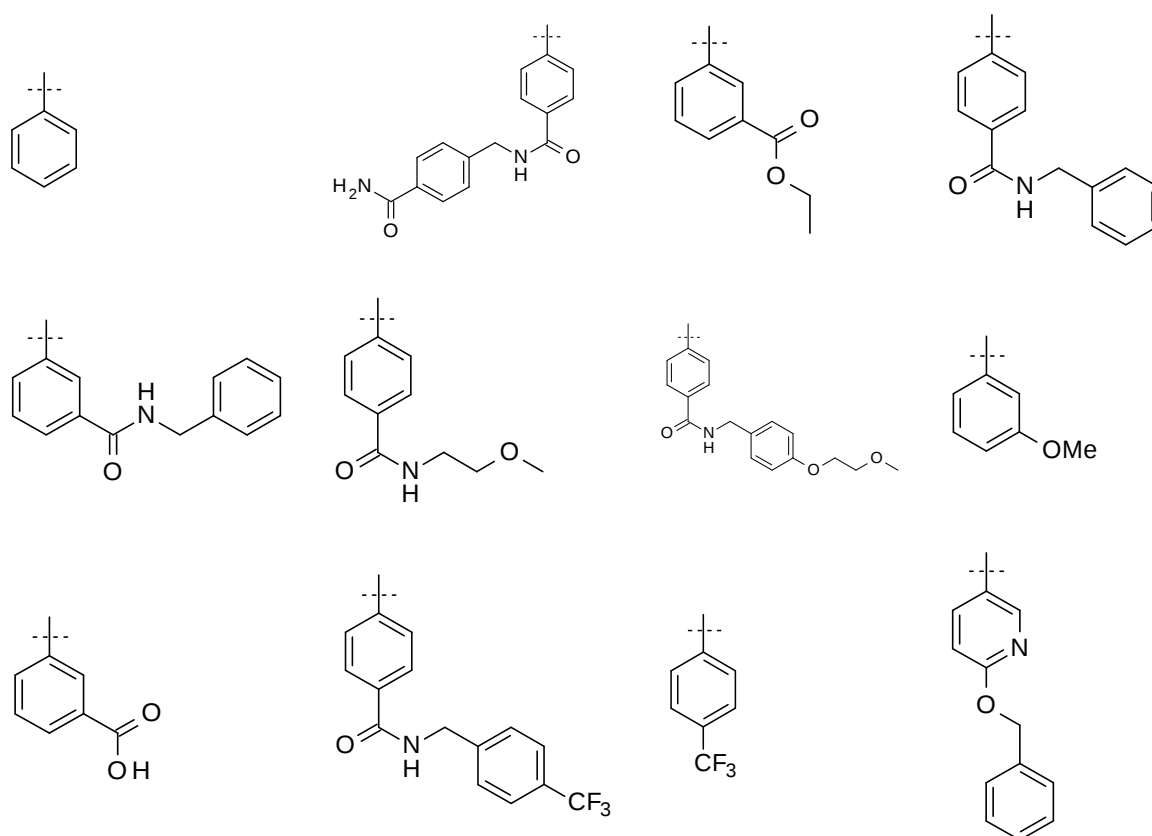
En los compuestos de la presente, R^5 , R^6 y R^7 pueden ser independientemente H, CF_3 , CONH_2 o $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$.

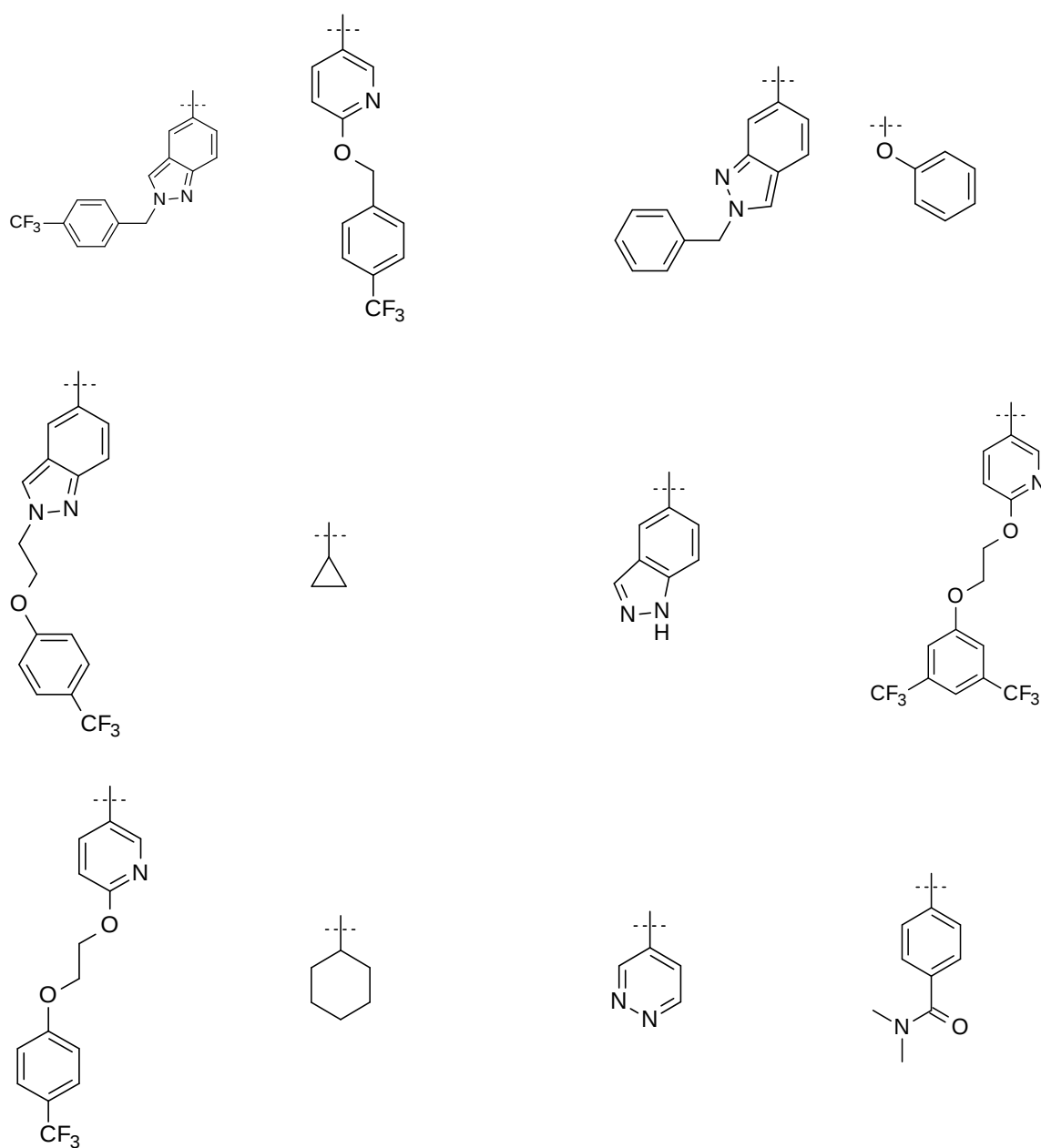
En los compuestos de la presente, R^8 y R^9 pueden ser independientemente H o metilo. R^3 puede ser OMe, CO_2H , CO_2Et , $\text{CON}(\text{CH}_3)_2$, $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$, o seleccionado del grupo que consiste en:



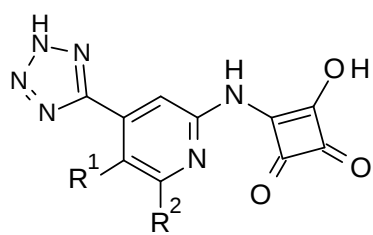
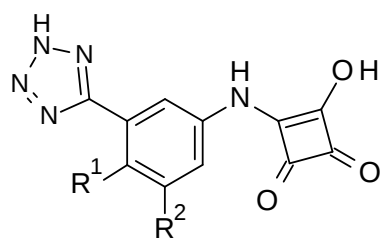


En los compuestos de la presente, R² se puede seleccionar del grupo que consiste en:



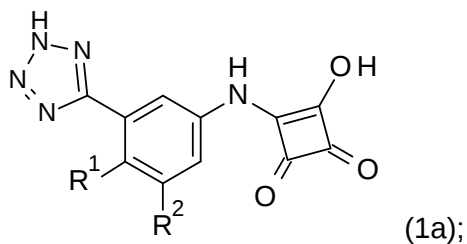


El compuesto puede ser un compuesto de la Fórmula (1a) o (1b):



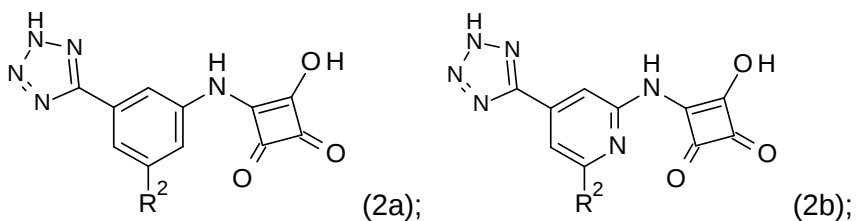
o una sal o tautómero del mismo, en donde R^1 y R^2 son como se definió anteriormente.

En algunas realizaciones, el compuesto puede ser un compuesto de la fórmula (1a):



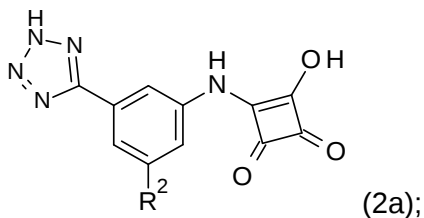
o una sal o tautómero del mismo, en donde R^1 y R^2 son como se definió anteriormente.

El compuesto puede ser un compuesto de la Fórmula (2a) o (2b):



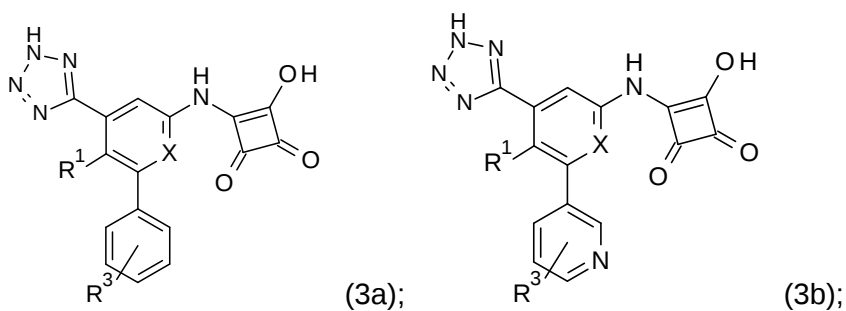
o una sal o tautómero del mismo, en donde R^2 es como se definió anteriormente.

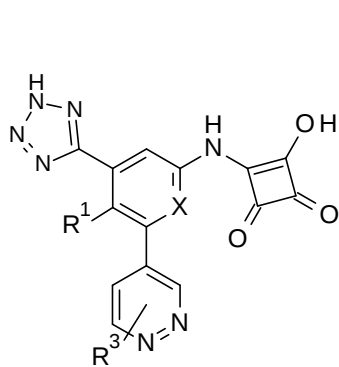
En algunas realizaciones, el compuesto puede ser un compuesto de la fórmula (2a):



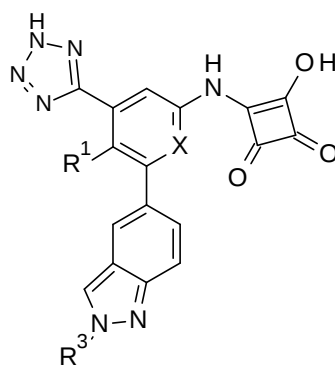
o una sal o tautómero del mismo, en donde R^2 es como se definió anteriormente.

El compuesto puede ser un compuesto de la fórmula (3a), (3b), (3c), (3d) o (3e):

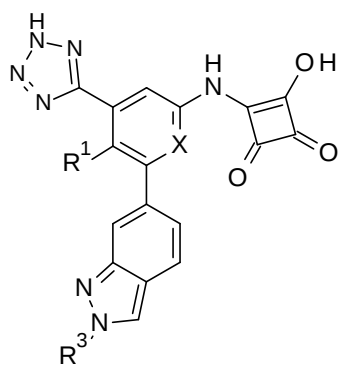




(3c);



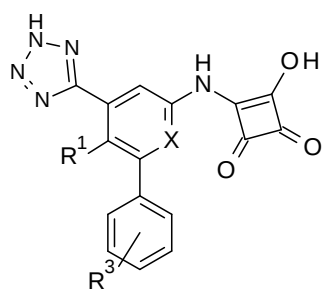
(3d);



(3e);

o una sal o tautómero del mismo; en donde X, R¹ y R³ son como se definió anteriormente.

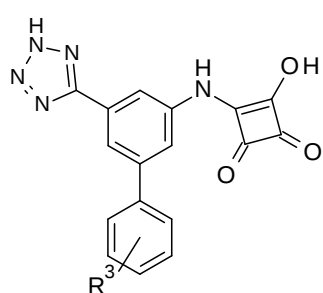
En algunas realizaciones, el compuesto puede ser un compuesto de la fórmula (3a):



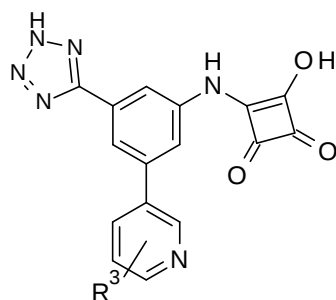
(3a);

o una sal o tautómero del mismo; en donde X, R¹ y R³ son como se definió anteriormente.

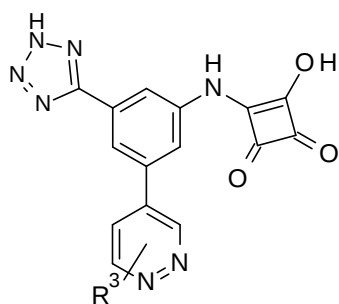
El compuesto puede ser un compuesto de la fórmula (4a), (4b), (4c), (4d) o (4e):



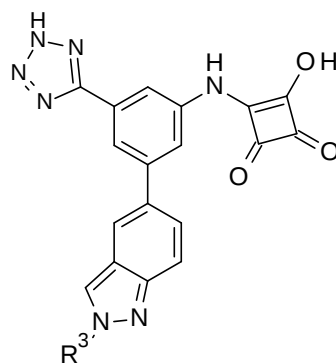
(4a);



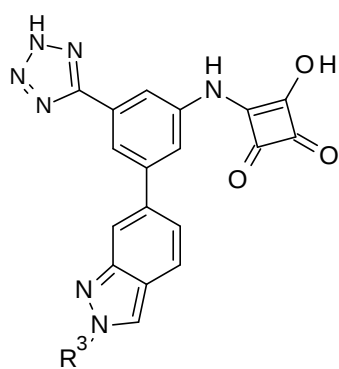
(4b);



(4c);



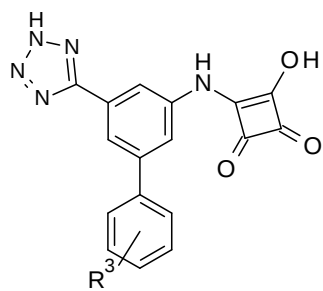
(4d);



(4e);

o una sal o tautómero del mismo; en donde R^3 es como se definió anteriormente.

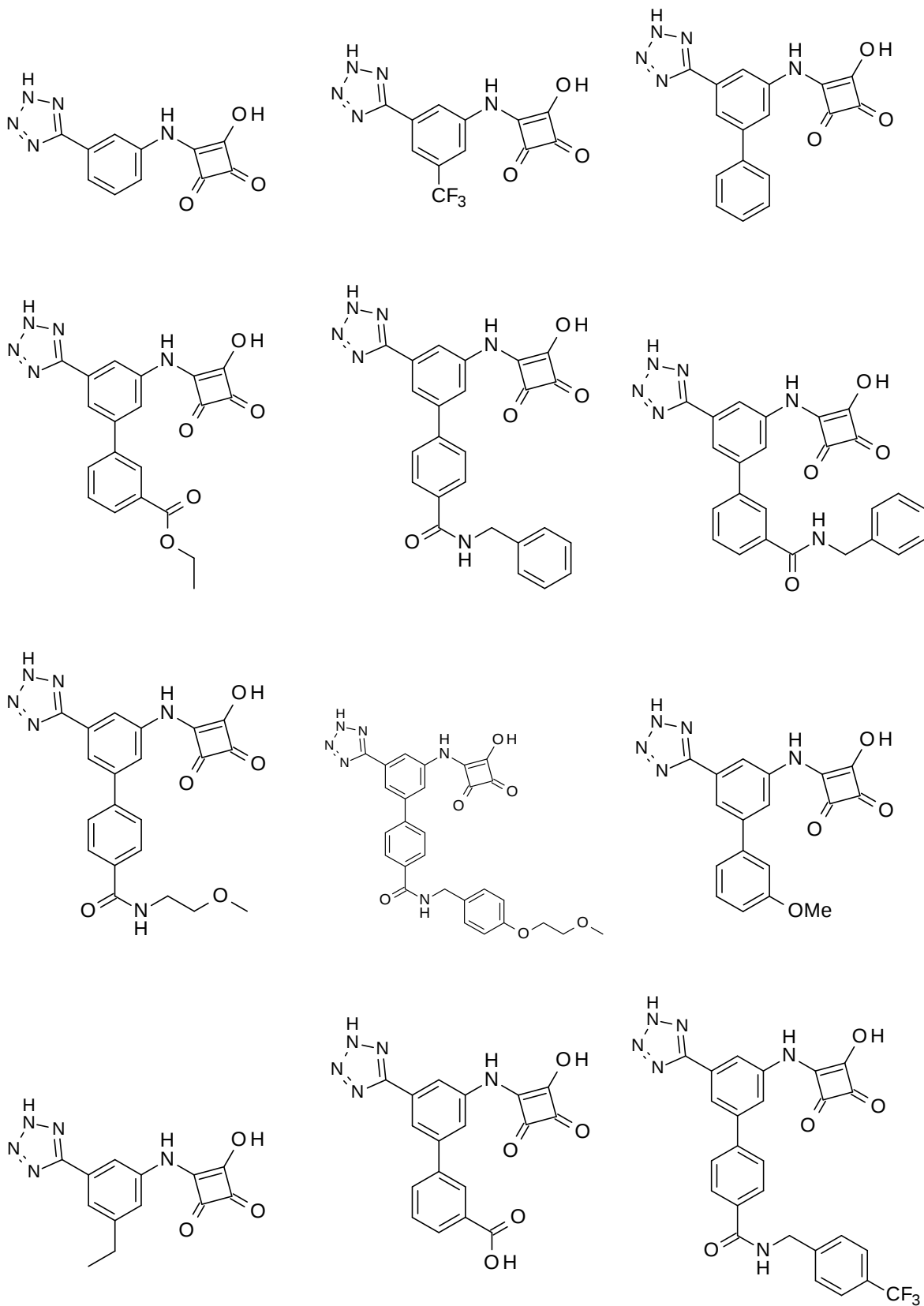
En algunas realizaciones, el compuesto puede ser un compuesto de la fórmula (4a):

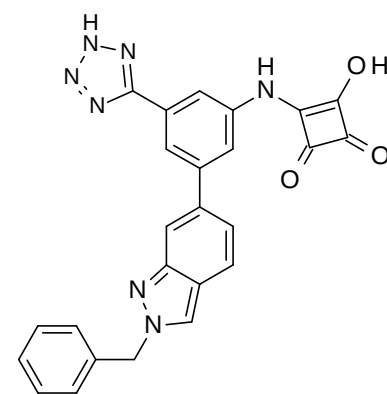
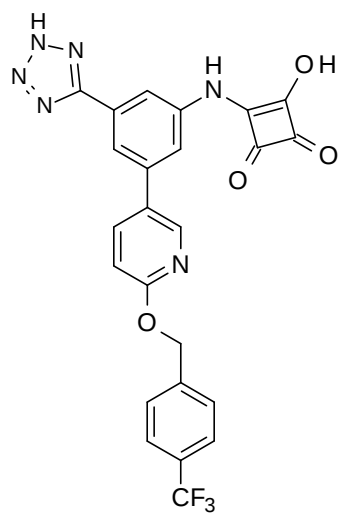
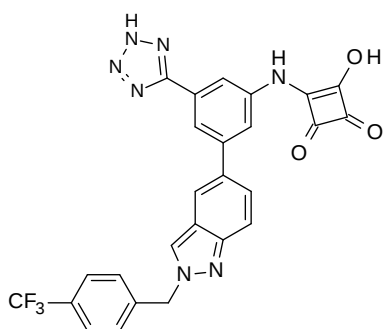
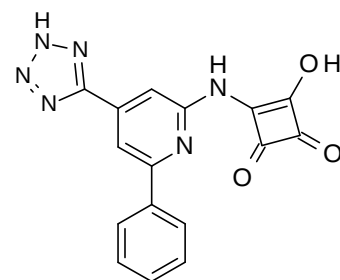
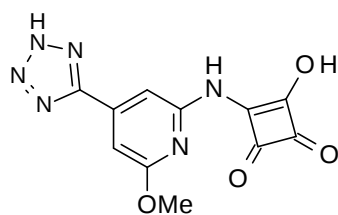
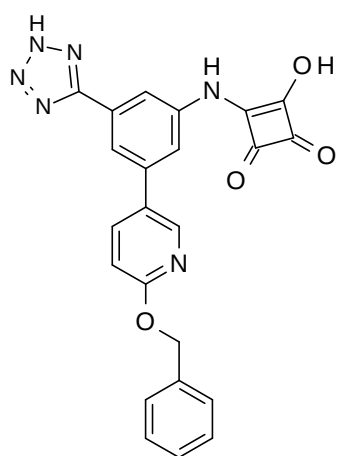
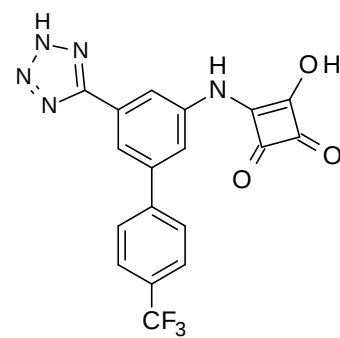
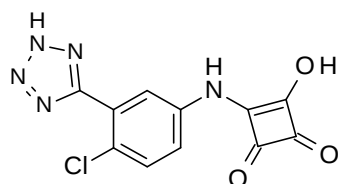
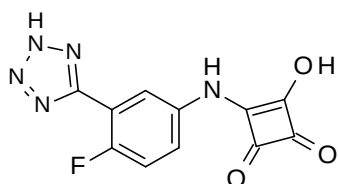


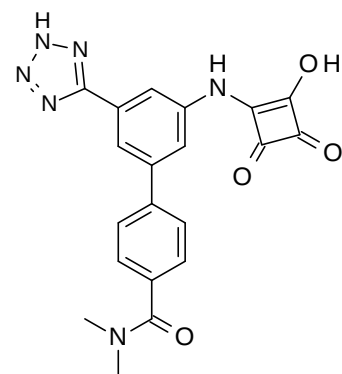
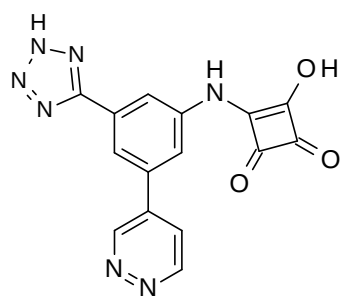
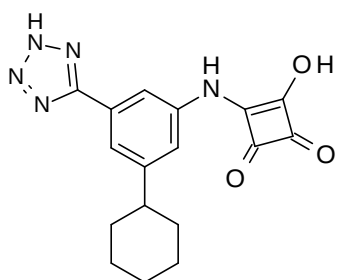
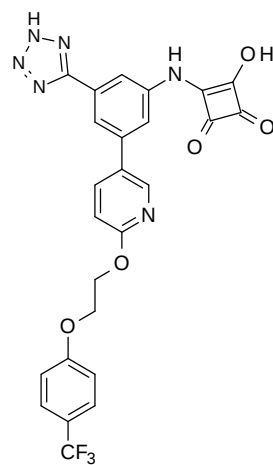
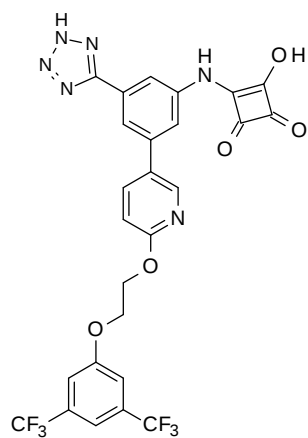
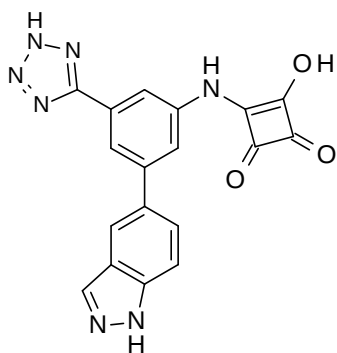
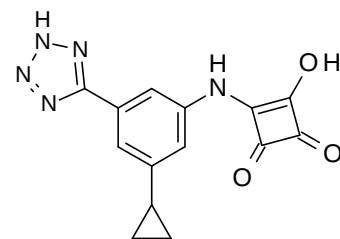
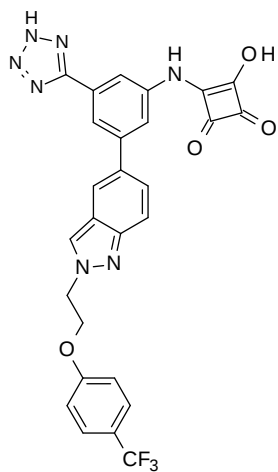
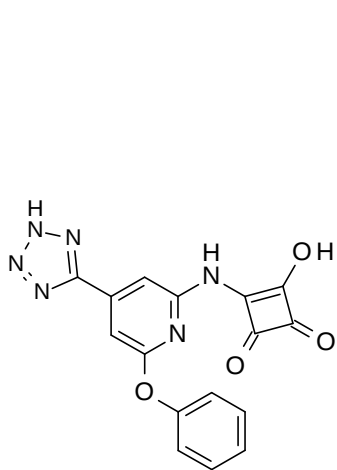
(4a);

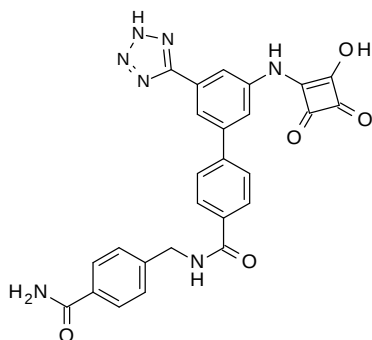
o una sal o tautómero del mismo; en donde R^3 es como se definió anteriormente.

El compuesto se puede seleccionar del grupo que consiste en:









o una sal o tautómero del mismo.

El compuesto se puede seleccionar del grupo que consiste en:

- 3-((3-(1H-tetrazol-5-il)fenil)amino)-4-hidroxiciclobut-3-eno-1,2-diona;
- 3-((3-(1H-tetrazol-5-il)-5-(trifluorometil)fenil)amino)-4-hidroxiciclobut-3-eno-1,2-diona;
- 3-((5-(1H-tetrazol-5-il)-[1,1'-bifenil]-3-il)amino)-4-hidroxiciclobut-3-eno-1,2-diona;
- 3'-((2-hidroxi-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il) amino)-5'-(1H-tetrazol-5-il)-[1,1'-bifenil]-3-carboxilato de etilo;
- N-bencil-3'-((2-hidroxi-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)-5'-(1H-tetrazol-5-il)-[1,1'-bifenil]-4-carboxamida;
- N-bencil-3'-((2-hidroxi-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)-5'-(1H-tetrazol-5-il)-[1,1'-bifenil]-3-carboxamida;
- 3'-((2-hidroxi-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)-N-(2-metoxietil)-5'-(1H-tetrazol-5-il)-[1,1'-bifenil]-4-carboxamida;
- 3'-((2-hidroxi-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)-N-(4-(2-metoxietoxi)bencil)-5'-(1H-tetrazol-5-il)-[1,1'-bifenil]-4-carboxamida;
- 3-hidroxi-4-((3'-metoxi-5-(1H-tetrazol-5-il)-[1,1'-bifenil]-3-il)amino)ciclobut-3-eno-1,2-diona;
- 3-((3-etil-5-(1H-tetrazol-5-il)fenil)amino)-4-hidroxiciclobut-3-eno-1,2-diona;
- ácido 3'-((2-hidroxi-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)-5'-(1H-tetrazol-5-il)-[1,1'-bifenil]-3-carboxílico;
- 3'-((2-hidroxi-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)-5'-(1H-tetrazol-5-il)-N-(4-(trifluorometil)bencil)-[1,1'-bifenil]-4-carboxamida;
- 3-((4-fluoro-3-(1H-tetrazol-5-il)fenil)amino)-4-hidroxiciclobut-3-eno-1,2-diona;
- 3-((4-cloro-3-(1H-tetrazol-5-il)fenil)amino)-4-hidroxiciclobut-3-eno-1,2-diona;

3-((5-(1H-tetrazol-5-il)-4'-(trifluorometil)-[1,1'-bifenil]-3-il)amino)-4-hidroxiciclobut-3-eno-1,2-diona;

3-((3-(6-(benciloxi)piridin-3-il)-5-(1H-tetrazol-5-il)fenil)amino)-4-hidroxiciclobut-3-eno-1,2-diona;

3-hidroxi-4-((6-metoxi-4-(1H-tetrazol-5-il)piridin-2-il)amino)ciclobut-3-eno-1,2-diona;

3-hidroxi-4-((6-fenil-4-(1H-tetrazol-5-il)piridin-2-il)amino)ciclobut-3-eno-1,2-diona;

3-((3-(1H-tetrazol-5-il)-5-(2-(4-(trifluorometil)bencil)-2H-indazol-5-il)fenil)amino)-4-hidroxiciclobut-3-eno-1,2-diona;

3-((3-(1H-tetrazol-5-il)-5-(6-((4-(trifluorometil)bencil)oxi)piridin-3-il)fenil)amino)-4-hidroxiciclobut-3-eno-1,2-diona;

3-((3-(2-bencil-2H-indazol-5-il)-5-(1H-tetrazol-5-il)fenil)amino)-4-hidroxiciclobut-3-eno-1,2-diona;

3-hidroxi-4-((6-fenoxi-4-(1H-tetrazol-5-il)piridin-2-il)amino)ciclobut-3-eno-1,2-diona;

3-((3-(1H-tetrazol-5-il)-5-(2-(2-(4-(trifluorometil)fenoxi)etil)-2H-indazol-6-il)fenil)amino)-4-hidroxiciclobut-3-eno-1,2-diona;

3-((3-ciclopropil-5-(1H-tetrazol-5-il)fenil)amino)-4-hidroxiciclobut-3-eno-1,2-diona;

3-((3-(1H-indazol-5-il)-5-(1H-tetrazol-5-il)fenil)amino)-4-hidroxiciclobut-3-eno-1,2-diona;

3-((3-(6-(2-(3,5-bis(trifluorometil)fenoxi)etoxi)piridin-3-il)-5-(1H-tetrazol-5-il)fenil)amino)-4-hidroxiciclobut-3-eno-1,2-diona;

3-((3-(1H-tetrazol-5-il)-5-(6-(2-(4-(trifluorometil)fenoxi)etoxi)piridin-3-il)fenil)amino)-4-hidroxiciclobut-3-eno-1,2-diona;

3-((3-ciclohexil-5-(1H-tetrazol-5-il)fenil)amino)-4-hidroxiciclobut-3-eno-1,2-diona;

3-hidroxi-4-((3-(piridazin-4-il)-5-(1H-tetrazol-5-il)fenil)amino)ciclobut-3-eno-1,2-diona;

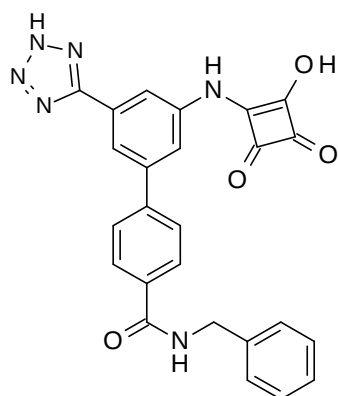
3'-((2-hidroxi-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)-N,N-dimetil-5'-(1H-tetrazol-5-il)-[1,1'-bifenil]-4-carboxamida;

N-(4-carbamoilbencil)-3'-((2-hidroxi-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)-5'-(1H-tetrazol-5-il)-[1,1'-bifenil]-4-carboxamida;

o una sal o tautómero del mismo.

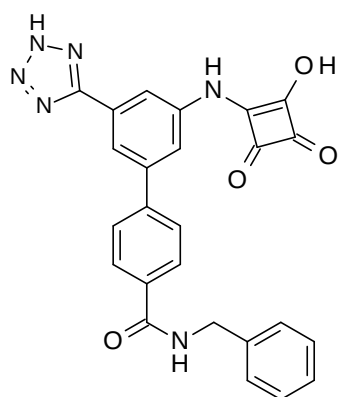
En algunas realizaciones, la sal del compuesto de la fórmula (1) es una sal farmacéuticamente aceptable.

En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto que tiene la estructura:



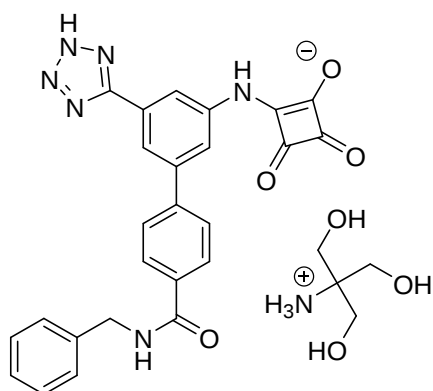
(Compuesto A),

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto que tiene la estructura:



(Compuesto A).

La presente descripción también proporciona una sal de trometamina que tiene la estructura:



La presente descripción también proporciona formas cristalinas del Compuesto A o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunas realizaciones, la forma cristalina

comprende ácido libre del Compuesto A o sal de trometamina del Compuesto A.

En algunas realizaciones, la forma cristalina comprende la sal de trometamina del Compuesto A. En algunas realizaciones, la sal de trometamina cristalina del Compuesto A es un hidrato. En una realización, la sal de trometamina del Compuesto A cristalina es Hidrato I. En una realización, la sal de trometamina del Compuesto A cristalina se caracteriza por un patrón de XRPD sustancialmente de acuerdo con la Figura 1. En una realización, la sal de trometamina del Compuesto A cristalina se caracteriza por un patrón de XRPD que comprende ángulos de difracción a $3,9 \pm 0,2$, $7,7 \pm 0,2$, $10,0 \pm 0,2$ y $15,8 \pm 0,2$ °2 θ , cuando se mide usando radiación de Cu K α .

En una realización, la sal de trometamina del Compuesto A cristalina es Hidrato II. En una realización, la sal de trometamina del Compuesto A cristalina se caracteriza por un patrón de XRPD sustancialmente de acuerdo con la Figura 4. En una realización, la sal de trometamina del Compuesto A cristalina se caracteriza por un patrón de XRPD que comprende ángulos de difracción a $4,4 \pm 0,2$, $14,4 \pm 0,2$ y $23,9 \pm 0,2$ °2 θ , cuando se mide usando radiación de Cu K α .

En algunas realizaciones, la forma cristalina comprende el Compuesto A (ácido libre). En algunas realizaciones, el Compuesto A cristalino (ácido libre) es un hidrato. En algunas realizaciones, el Compuesto A cristalino (ácido libre) es el Patrón 1. En algunas realizaciones, el Compuesto A cristalino (ácido libre) es el Patrón 3.

En una realización, el ácido libre del Compuesto A cristalino se caracteriza por un patrón de XRPD sustancialmente de acuerdo con la Figura 7. En una realización, el ácido libre del Compuesto A cristalino se caracteriza por un patrón de XRPD sustancialmente de acuerdo con la Figura 9.

Los compuestos descritos en la presente se pueden usar en terapia. Los compuestos descritos en la presente se pueden usar en medicina.

Los compuestos se pueden usar como agonistas del receptor GPR35. Los compuestos se pueden usar en la fabricación de medicamentos. Los compuestos pueden ser para usarse en el tratamiento, prevención, mejora, control o reducción del riesgo de trastornos asociados con GPR35. Los compuestos se pueden usar en el tratamiento o prevención de trastornos de mastocitos, condiciones de dolor agudo y crónico y enfermedades asociadas con enfermedades alérgicas o inflamatorias tanto en el sistema gastrointestinal como en el

pulmón.

Los compuestos se pueden usar para tratar trastornos y condiciones gastrointestinales, usando agentes que actúan selectivamente en el receptor GPR35. Estos incluyen, pero no se limitan a: alergia alimentaria, intolerancia alimentaria y trastornos alérgicos, enfermedad celíaca, síntomas gastrointestinales asociados con mastocitosis sistémica y otros trastornos relacionados con mastocitos (síndrome de activación de mastocitos, trastorno de mastocitos clonales, síndrome de activación de mastocitos monoclonales, urticaria idiopática, anafilaxia idiopática), colitis mastocítica, síndrome del intestino irritable (IBS), trastornos de motilidad gastrointestinal, trastornos gastrointestinales funcionales, enfermedad por reflujo gastroesofágico (GERD), reflujo duodenogástrico, enfermedades diarreicas, gastroenteritis eosinofílica, esofagitis eosinofílica, diarrea infecciosa (tal como *Clostridium difficile*, *Salmonella*, toxina de *Shigella*), colitis microscópica, enfermedades gastrointestinales inmunomediadas, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad inflamatoria del intestino, dolor abdominal visceral. En algunas realizaciones, los compuestos se pueden usar para tratar el síndrome del intestino irritable (IBS), que incluye IBS con estreñimiento (IBS-C), IBS con diarrea (IBS-D) e IBS con hábitos intestinales mixtos (IBS-M). En algunas realizaciones, los compuestos se pueden usar para tratar IBS-D.

En algunas realizaciones, los compuestos se pueden usar para tratar la enfermedad inflamatoria del intestino (IBD). En algunas realizaciones, los compuestos se pueden usar para tratar la enfermedad de Crohn. En algunas realizaciones, los compuestos se pueden usar para tratar la colitis ulcerosa.

Los compuestos se pueden usar para tratar los síntomas de dolor asociados con la enfermedad gastrointestinal y otras condiciones viscerales que incluyen enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad inflamatoria del intestino, colitis por radiación, cistitis por radiación, enfermedad celíaca, enteropatía por gluten, cistitis por radiación, cistitis intersticial, síndrome de vejiga dolorosa; cáncer, enfermedad por reflujo gastroesofágico, mucositis por quimioterapia y radioterapia, pancreatitis, prostatitis, dolor pélvico, endometriosis, hepatitis; fibrosis hepática y cirrosis.

Los compuestos se pueden usar para tratar enfermedades y condiciones pulmonares. Estos incluyen, pero no se limitan a, enfermedades pulmonares obstructivas crónicas, asma, bronquitis crónica, fibrosis quística, enfisema, tos idiopática crónica, trastorno de las vías respiratorias hiperactivas y fibrosis pulmonar idiopática.

La presente solicitud también proporciona un método de tratamiento de acuerdo con cualquier uso del compuesto de la fórmula (1) descrito en la presente. En algunas realizaciones, se proporciona un método para tratar trastornos asociados con GPR35 en un sujeto en necesidad del mismo, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la fórmula (1) (por ejemplo, Compuesto A) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunas realizaciones, el sujeto es un humano.

En algunas realizaciones, el trastorno es enfermedad inflamatoria del intestino (IBD). En algunas realizaciones, el trastorno es enfermedad de Crohn. En algunas realizaciones, el trastorno es colitis ulcerosa.

En algunas realizaciones, el trastorno es síndrome del intestino irritable (IBS), que incluye IBS con estreñimiento (IBS-C), IBS con diarrea (IBS-D) e IBS con hábitos intestinales mixtos (IBS-M). En algunas realizaciones, el trastorno es IBS-D.

Definiciones

En esta solicitud, se aplican las siguientes definiciones, a menos que se indique lo contrario.

El término "tratamiento", en relación con los usos de cualquiera de los compuestos descritos en la presente, incluidos los de la fórmula (1), se usa para describir cualquier forma de intervención en la que se administra un compuesto a un sujeto que padece o está en riesgo de padecer o potencialmente en riesgo de padecer la enfermedad o trastorno en cuestión. Por lo tanto, el término "tratamiento" abarca tanto el tratamiento preventivo (profiláctico) como el tratamiento donde se muestran síntomas medibles o detectables de la enfermedad o trastorno.

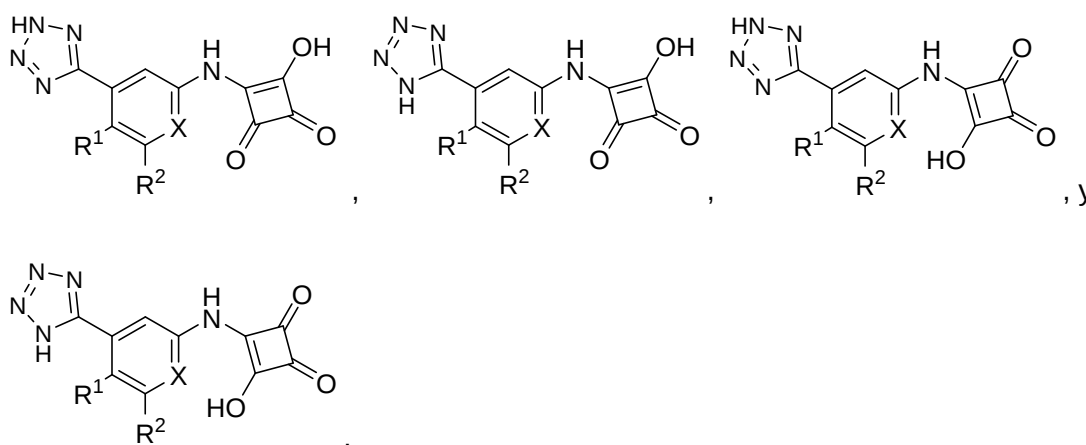
El término "cantidad terapéutica efectiva" (por ejemplo, en relación con los métodos de tratamiento de una enfermedad o condición) se refiere a una cantidad del compuesto que es efectiva para producir un efecto terapéutico deseado. Por ejemplo, si la condición es dolor, luego la cantidad terapéutica efectiva es una cantidad suficiente para proporcionar un nivel deseado de alivio del dolor. El nivel deseado de alivio del dolor puede ser, por ejemplo, la remoción completa del dolor o una reducción en la gravedad del dolor.

Los términos "alquilo" como en "alquilo de C₁₋₆", "cicloalquilo" como en "cicloalquilo de C₃₋₆", "alcoxi" como en "alcoxi de C₁₋₆", "arilo", "heteroarilo", "monocíclico" y "bicíclico" se usan

todos en su sentido convencional (por ejemplo, como se define en el Libro de Oro de la IUPAC), a menos que se indique lo contrario.

En la medida en que cualquiera de los compuestos descritos tenga centros quirales, la presente invención se extiende a todos los isómeros ópticos de estos compuestos, ya sea en forma de racematos o enantiómeros resueltos. La invención descrita en la presente se refiere a todas las formas cristalinas, solvatos e hidratos de cualquiera de los compuestos descritos, independientemente de cómo se preparen. En la medida en que cualquiera de los compuestos descritos en la presente tiene centros ácidos o básicos tal como grupos carboxilatos o amino, luego todas las formas de sal de los compuestos se incluyen en la presente. En el caso de los usos farmacéuticos, la sal debe considerarse como una sal farmacéuticamente aceptable.

Los compuestos de la invención pueden existir en formas tautoméricas. Se va a entender que cualquier referencia a un compuesto nombrado o un compuesto representado estructuralmente pretende abarcar todos los tautómeros de este compuesto. Por ejemplo, el compuesto de la fórmula (1) abarca los tautómeros que se muestran a continuación:



Las sales o sales farmacéuticamente aceptables que se pueden mencionar incluyen sales de adición del ácido y sales de adición de base. Esas sales se pueden formar por medios convencionales, por ejemplo, por reacción de un ácido libre o una forma de base libre de un compuesto con uno o más equivalentes de un ácido o base apropiado, opcionalmente en un solvente, o en un medio en el que la sal es insoluble, seguido de la remoción de el solvente, o el medio, usando técnicas estándar (por ejemplo, *in vacuo*, por liofilización o por filtración). Las sales también se pueden preparar intercambiando un contraión de un compuesto en forma de una sal con otro contraión, por ejemplo, usando una resina de intercambio iónico adecuada.

Ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de adición de ácido derivadas de ácidos minerales y ácidos orgánicos, y sales derivadas de metales tal como sodio, magnesio, potasio y calcio. Las sales de adición de base farmacéuticamente aceptables representativas también incluyen, pero no se limitan a, aluminio, amonio, 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol (TRIS, trometamina), arginina, benetamina (N-bencilfenetilamina), benzatina (N,N'-dibenciletilendiamina), bis-(2-hidroxietyl)amina, bismuto, calcio, cloroprocaína, colina, clemizol (1-p clorobencil-2-pirrolidina-1'-ilmetilbencimidazol), ciclohexilamina, dibenciletilendiamina, dietilamina, dietiltiamina, dimetilamina, dimetiletanolamina, dopamina, etanolamina, etilendiamina, L-histidina, hierro, isoquinolina, lepidina, litio, lisina, magnesio, meglumina (N-metilglucamina), piperazina, piperidina, potasio, procaína, quinina, quinolina, sodio, estroncio, t-butilamina, y zinc. En una realización, las sales de los compuestos descritos en la presente descripción son sales de trometamina (TRIS).

Los ejemplos de sales de adición de ácido incluyen sales de adición de ácido formadas con ácido acético, 2,2-dicloroacético, adípico, algínico, ácidos arilsulfónicos (por ejemplo, bencenosulfónico, naftalen-2-sulfónico, naftalen-1,5-disulfónico y p-toluensulfónico), ascórbico (por ejemplo, L-ascórbico), L-aspartico, benzoico, 4-acetamidobenzoico, butanoico, (+) canfórico, canfor-sulfónico, (+)-(1S)-canfor-10-sulfónico, cáprico, caproico, caprílico, cinámico, cítrico, ciclámico, dodecilsulfúrico, etan-1,2-disulfónico, etansulfónico, 2-hidroxi-etansulfónico, fórmico, fumárico, galactárico, gentísico, glucoheptónico, glucónico (por ejemplo, D-glucónico), glucurónico (por ejemplo, D-glucurónico), glutámico (por ejemplo, L-glutámico), α -oxoglutámico, glicólico, hipúrico, bromhídrico, clorhídrico, hidriódico, isetiónico, láctico (por ejemplo, (+)-L-láctico y (±)-DL-láctico), lactobiónico, maleico, málico (por ejemplo, (-)-L-málico), malónico, (±)-DL-mandélico, metafosfórico, metansulfónico, 1-hidroxi-2-naftoico, nicotínico, nítrico, oleico, orótico, oxálico, palmítico, pamoico, fosfórico, propiónico, L-piroglutámico, salicílico, 4-amino-salicílico, sebácico, esteárico, succínico, sulfúrico, tánico, tartárico (por ejemplo, (+)-L-tartárico), tiociánico, ácidos undecilénico y valérico.

También se incluye cualquier solvato de los compuestos y sus sales. Los solvatos preferidos son solvatos formados por la incorporación en la estructura de estado sólido (por ejemplo, estructura cristalina) de los compuestos de la invención de moléculas de un solvente farmacéuticamente aceptable no tóxico (denominado a continuación como el solvente de solvatación). Los ejemplos de estos solventes incluyen agua, alcoholes (tal como etanol, isopropanol y butanol) y dimetilsulfóxido. Los solvatos se pueden preparar al recrystalizar los compuestos de la invención con un solvente o mezcla de solventes que contienen el solvente de solvatación. Ya sea que se ha formado o no un solvato en cualquier caso dado al someter

los cristales del compuesto a análisis usando técnicas conocidas y estándar tal como análisis termogravimétrico (TGA), calorimetría diferencial de barrido (DSC) y cristalografía de rayos X.

Los solvatos pueden ser solvatos estequiométricos o no estequiométricos. Los solvatos particulares pueden ser hidratos, y los ejemplos de hidratos incluyen hemihidratos, monohidratos y dihidratos. Para un análisis más detallado de los solvatos y los métodos usados para prepararlos y caracterizarlos, ver Bryn *et al*, Solid-State Chemistry of Drugs, Segunda Edición, publicada por SSCI, Inc de West Lafayette, IN, EE. UU., 1999, ISBN 0-967-06710-3.

El término “composición farmacéutica” en el contexto de la presente invención significa una composición que comprende un agente activo y que comprende adicionalmente uno o más portadores farmacéuticamente aceptables. La composición puede contener además ingredientes seleccionados de, por ejemplo, diluyentes, adyuvantes, excipientes, vehículos, agentes conservadores, cargas, agentes desintegradores, agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes de suspensión, agentes edulcorantes, agentes saborizantes, agentes perfumadores, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos, agentes lubricantes y agentes dispersantes, dependiendo de la naturaleza del modo de administración y las formas de dosificación. Las composiciones pueden tomar la forma, por ejemplo, de tabletas, grageas, polvos, elixires, jarabes, preparaciones líquidas que incluyen suspensiones, aerosoles, inhalantes, tabletas, grageas, emulsiones, soluciones, sellos, gránulos, cápsulas y supositorios, así como preparaciones líquidas para inyecciones, que incluyen preparaciones de liposomas.

Los compuestos de la invención pueden contener una o más sustituciones isotópicas, y una referencia a un elemento particular incluye dentro de su alcance todos los isótopos del elemento. Por ejemplo, una referencia al hidrógeno incluye dentro de su alcance ^1H , ^2H (D) y ^3H (T). De manera similar, las referencias a carbono y oxígeno incluyen dentro de su alcance respectivamente ^{12}C , ^{13}C y ^{14}C y ^{16}O y ^{18}O . De manera análoga, una referencia a un grupo funcional particular también incluye dentro de su alcance variaciones isotópicas, a menos que el contexto indique lo contrario. Por ejemplo, una referencia a un grupo alquilo tal como un grupo etilo o un grupo alcoxi tal como un grupo metoxi también cubre variaciones en las que uno o más de los átomos de hidrógeno en el grupo está en forma de un isótopo de deuterio o tritio, por ejemplo, como en un grupo etilo en el que los cinco átomos de hidrógeno están en la forma isotópica de deuterio (un grupo perdeuteroetilo) o un grupo metoxi en el que los tres átomos de hidrógeno están en la forma isotópica de deuterio (un grupo trideuterometoxi). Los

isótopos pueden ser radiactivos o no radiactivos.

Las dosis terapéuticas pueden variar dependiendo de los requisitos del paciente, la gravedad de la condición que se trata y el compuesto que se emplea. La determinación de la dosis adecuada para una situación particular está dentro de la habilidad de la técnica. En general, el tratamiento se inicia con dosificaciones más pequeñas que son menores que la dosis óptima del compuesto. En lo sucesivo, la dosificación se incrementa en pequeños incrementos hasta que se alcance el efecto óptimo bajo las circunstancias. Por conveniencia, la dosificación diaria total se puede dividir y administrar en partes durante el día si así se desea.

La magnitud de una dosis efectiva de un compuesto, por supuesto, variará con la naturaleza de la severidad de la condición a ser tratada y con el compuesto particular y su vía de administración. La selección de las dosificaciones apropiadas está dentro de la capacidad de un experto en la técnica, sin una carga indebida. En general, el intervalo de dosis diaria puede ser de aproximadamente 10 µg a aproximadamente 30 mg por kg de peso corporal de un ser humano y un animal no humano, preferentemente de aproximadamente 50 µg a aproximadamente 30 mg por kg de peso corporal de un ser humano y un animal no humano, por ejemplo de aproximadamente 50 µg a aproximadamente 10 mg por kg de peso corporal de un ser humano y un animal no humano, por ejemplo de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 30 mg por kg de peso corporal de un ser humano y un animal no humano, por ejemplo de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 10 mg por kg de peso corporal de un ser humano y un animal no humano y más preferentemente de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 1 mg por kg de peso corporal de un ser humano y un animal no humano.

Formulaciones farmacéuticas

Aunque es posible que el compuesto activo se administre solo, es preferible presentarlo como una composición farmacéutica (por ejemplo, formulación).

Por consiguiente, en algunas realizaciones de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de la Fórmula (1) o una sal del mismo como se definió anteriormente conjuntamente con al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

El o los excipientes farmacéuticamente aceptables se pueden seleccionar de, por

ejemplo, portadores (por ejemplo, un portador sólido, líquido o semisólido), adyuvantes, diluyentes (por ejemplo, diluyentes sólidos tal como rellenos o agentes de carga; y diluyentes líquidos tal como solventes y cosolventes), agentes de granulación, aglutinantes, adyuvantes de flujo, agentes de recubrimiento, agentes de control de la liberación (por ejemplo, polímeros o ceras retardantes o retardantes de la liberación), agentes aglutinantes, desintegrantes, agentes amortiguadores, lubricantes, conservadores, agentes antifúngicos y antibacterianos, antioxidantes, agentes amortiguadores, agentes de ajuste de la tonicidad, agentes espesantes, agentes saborizantes, edulcorantes, pigmentos, plastificantes, agentes de enmascaramiento del sabor, estabilizantes o cualquier otro excipiente usado convencionalmente en composiciones farmacéuticas.

El término “farmacéuticamente aceptable” como se usa en la presente significa compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que son, dentro del alcance del buen juicio médico, adecuados para usarse en contacto con los tejidos de un sujeto (por ejemplo, un sujeto humano) sin toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, proporcional a una relación beneficio/riesgo razonable. Cada excipiente también debe ser “aceptable” en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación.

Las composiciones farmacéuticas que contienen compuestos de la Fórmula (1) se pueden formular de acuerdo con técnicas conocidas, ver, por ejemplo, Remington 's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA, EUA. Las composiciones farmacéuticas pueden estar en cualquier forma adecuada para administración oral, parenteral, intravenosa, intramuscular, intratecal, subcutánea, tópica, intranasal, intrabronquial, sublingual, bucal, oftálmica, ótica, rectal, intravaginal o transdérmica.

Las formas de dosificación farmacéuticas adecuadas para administración oral incluyen tabletas (recubiertas o no recubiertas), cápsulas (cubierta dura o blanda), comprimidos oblongos, píldoras, pastillas para chupar, jarabes, soluciones, polvos, gránulos, elixires y suspensiones, tabletas sublinguales, obleas o parches tal como parches bucales.

La composición puede ser una composición de tableta o una composición de cápsula. Las composiciones de tabletas pueden contener una dosificación unitaria de compuesto activo conjuntamente con un diluyente o portador inerte tal como un azúcar o alcohol de azúcar, por ejemplo; lactosa, sacarosa, sorbitol o manitol; y/o un diluyente no derivado de azúcar tal como carbonato de sodio, fosfato de calcio, carbonato de calcio o una celulosa o derivado de la misma tal como celulosa microcristalina (MCC), metilcelulosa, etilcelulosa,

hidroxipropilmetilcelulosa y almidones tal como almidón de maíz. Las tabletas también pueden contener ingredientes estándar tal como agentes aglutinantes y de granulación tal como polivinilpirrolidona, desintegrantes (por ejemplo, polímeros reticulados hinchables tal como carboximetilcelulosa reticulada), agentes lubricantes (por ejemplo, estearatos), conservadores (por ejemplo, parabenos), antioxidantes (por ejemplo, BHT), agentes amortiguadores (por ejemplo, amortiguadores de fosfato o citrato) y agentes efervescentes tal como mezclas de citrato/bicarbonato. Estos excipientes son bien conocidos y no es necesario analizarlos en detalle aquí.

Las tabletas pueden diseñarse para liberar el fármaco ya sea en contacto con fluidos estomacales (tabletas de liberación inmediata) o para liberar de manera controlada (tabletas de liberación controlada) durante un período de tiempo prolongado o con una región específica del tracto GI.

Las composiciones farmacéuticas comprenden habitualmente de aproximadamente 1 % (p/p) a aproximadamente 95 % (p/p) de ingrediente activo y de 99 % (p/p) a 5 % (p/p) de un excipiente farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, como se definió anteriormente) o combinación de estos excipientes. Preferentemente, las composiciones comprenden de aproximadamente 20 % (p/p) a aproximadamente 90 % (p/p) de ingrediente activo y de 80 % (p/p) a 10 % (p/p) de un excipiente farmacéutico o combinación de excipientes. Las composiciones farmacéuticas comprenden de aproximadamente 1 % (p/p) a aproximadamente 95 % (p/p), preferiblemente de aproximadamente 20 % (p/p) a aproximadamente 90 % (p/p), de ingrediente activo. Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención pueden estar, por ejemplo, en forma de dosis unitaria, tal como en forma de ampollas, viales, supositorios, jeringas precargadas, grageas, polvos, tabletas o cápsulas.

Las tabletas y cápsulas pueden contener, por ejemplo, 0-20 % (p/p) de desintegrantes, 0-5 % (p/p) de lubricantes, 0-5 % (p/p) de adyuvantes de flujo y/o 0-99 % (p/p) de rellenos/ o agentes de carga (dependiendo de la dosis del fármaco). También pueden contener 0-10 % (p/p) de aglutinantes poliméricos, 0-5 % (p/p) de antioxidantes, 0-5 % (p/p) de pigmentos. Las tabletas de liberación lenta contendrán además habitualmente 0-99 % (p/p) de polímeros controladores de la liberación (por ejemplo, retardantes) (dependiendo de la dosis). Los recubrimientos de película de la tableta o cápsula habitualmente contienen 0-10 % (p/p) de polímeros, 0-3 % (p/p) de pigmentos y/o 0-2 % (p/p) de plastificantes.

La composición puede ser una composición parenteral. Las formulaciones

parenterales pueden contener 0-20 % (p/p) de amortiguadores, 0-50 % (p/p) de cosolventes y/o 0-99 % (p/p) de Agua para inyección (WFI) (dependiendo de la dosis y si se liofiliza). Las formulaciones para depósitos intramusculares también pueden contener 0-99 % (p/p) de aceites.

La composición puede estar en una forma adecuada para administración intranasal o intrabronquial. Estas composiciones deben ser adecuadas para la atomización, lo que permite la inhalación a través de la boca y facilita la absorción a través de la membrana mucosa delgada que recubre las fosas nasales.

Muchos fármacos que se administran por vía oral también se pueden administrar por vía rectal como un supositorio. La composición puede estar en una forma adecuada para administración rectal. En esta forma, la composición puede comprender una sustancia cerosa que se disuelve o licua después de insertarse en el recto. Estas composiciones se pueden prescribir para personas que no pueden tomar un fármaco por vía oral porque tienen náuseas, no pueden tragar o tienen restricciones para comer, como es el caso antes y después de muchas operaciones quirúrgicas.

Las formulaciones farmacéuticas se pueden presentar a un paciente en "envases para pacientes" que contienen un ciclo completo de tratamiento en un envase individual, generalmente un envase tipo blíster.

Los compuestos de la Fórmula (1) generalmente se presentarán en forma de dosificación unitaria y, como tal, habitualmente contendrán suficiente compuesto para proporcionar un nivel deseado de actividad biológica. Por ejemplo, una formulación puede contener de 1 nanogramo a 2 gramos de ingrediente activo, por ejemplo, de 1 nanogramo a 2 miligramos de ingrediente activo. Dentro de estos intervalos, los subintervalos particulares del compuesto son 0,1 miligramos a 2 gramos de ingrediente activo (más generalmente de 10 miligramos a 1 gramo, por ejemplo, 50 miligramos a 500 miligramos), o 1 microgramo a 20 miligramos (por ejemplo, 1 microgramo a 10 miligramos, por ejemplo, 0,1 miligramos a 2 miligramos de ingrediente activo).

Para composiciones orales, una forma de dosificación unitaria puede contener de 1 miligramo a 2 gramos, más habitualmente de 10 miligramos a 1 gramo, por ejemplo de 50 miligramos a 1 gramo, por ejemplo de 100 miligramos a 1 gramo, de compuesto activo.

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden una forma

cristalina de ácido libre del Compuesto A o sal de trometamina del Compuesto A. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden una forma cristalina de ácido libre del Compuesto A. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden una forma cristalina de sal de trometamina del del Compuesto A.

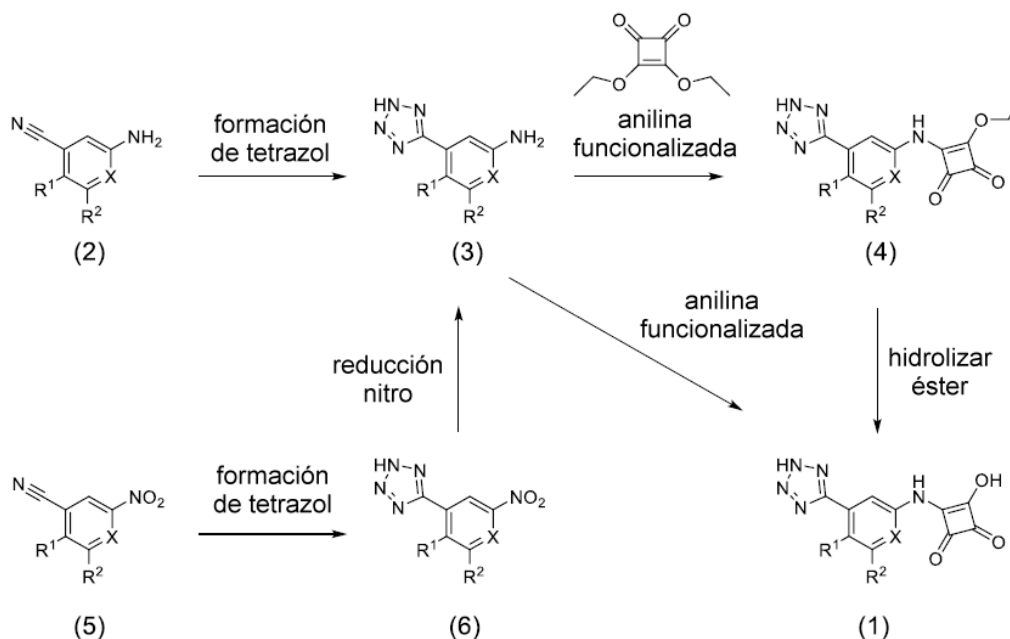
En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden la sal de trometamina del Compuesto A Hidrato I. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden la sal de trometamina del Compuesto A Hidrato II. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden la sal de trometamina del Compuesto A Hidrato I y la sal de trometamina del Compuesto A Hidrato I.

El compuesto activo se administrará a un paciente en necesidad del mismo (por ejemplo, un paciente humano o animal) en una cantidad suficiente para lograr el efecto terapéutico deseado (cantidad efectiva). Las cantidades precisas de compuesto administrado se pueden determinar por un médico supervisor de acuerdo con los procedimientos estándar.

Métodos para la preparación de compuestos de la Fórmula (1)

Los compuestos de la fórmula (1) se pueden preparar de acuerdo con métodos sintéticos como se describe en la presente, algunos de los cuales serán conocidos por el experto en la técnica. La invención proporciona un proceso para la preparación de un compuesto como se define en la fórmula (1) anterior.

Los compuestos de la fórmula (1) se pueden preparar como se describe en el Esquema de Reacción 1 a continuación.

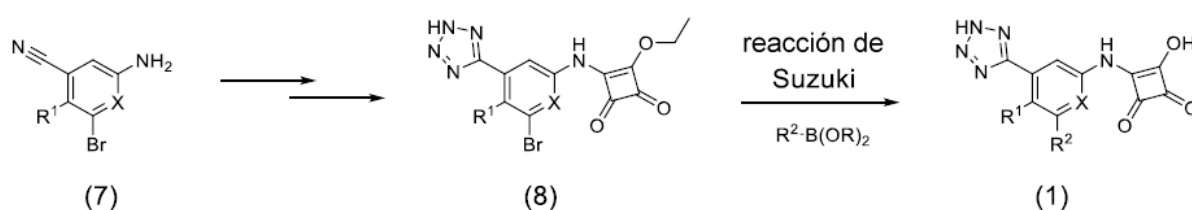


Esquema de Reacción 1

Por lo tanto, los nitrilos amino aromáticos sustituidos de la fórmula (2), que están comercialmente disponibles o son fácilmente accesibles a partir de materiales comerciales, se convierten en compuestos intermedios de tetrazol de la fórmula (3), habitualmente en la presencia de azida de sodio y cloruro de amonio o cloruro de zinc, en solventes tal como DMF, DMSO o 2-propanol, y se calientan a temperaturas en el intervalo de 110-130 °C. De manera alternativa, se puede acceder a los tetrazoles de la fórmula (3) a partir de 3-nitrobenzonitrilos sustituidos de la fórmula (5), que están comercialmente disponibles o son fácilmente accesibles a partir de materiales comerciales. La conversión de la función nitrilo para proporcionar los tetrazoles correspondientes de la fórmula (6) se realiza como anteriormente, y la posterior reducción del grupo nitro se ve afectada habitualmente por el polvo de zinc en presencia de cloruro de amonio en 1,4-dioxano y agua mientras se calienta a reflujo. El grupo anilina de los compuestos de la fórmula (3) se funcionaliza luego por reacción con escualato de dietilo en la presencia de una base, habitualmente trietilamina, en solventes tal como EtOH o DCM. La función éster de los escualatos de la fórmula (4) luego se hidroliza, habitualmente realizada en una mezcla de HCl acuoso y THF a temperaturas suaves, habitualmente 60 °C, para dar los Ejemplos de la fórmula (1). Alternativamente, las anilinas sustituidas de la fórmula (3) se pueden convertir directamente en Ejemplos de la fórmula (1) mediante tratamiento con ácido escuárico, con condiciones que comprenden habitualmente agua a reflujo.

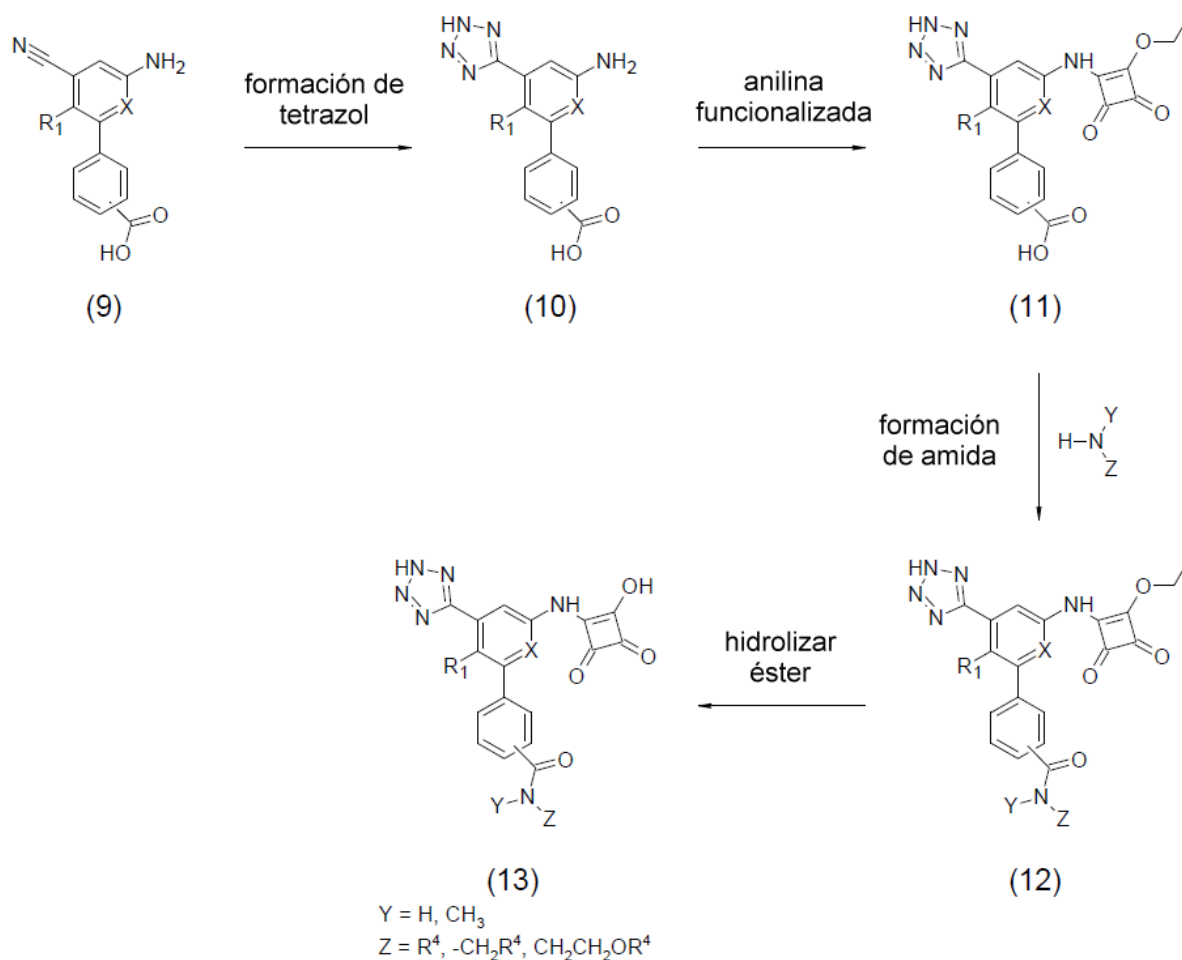
De manera alternativa, los compuestos de la fórmula (1) se pueden preparar como se

describe en el Esquema de Reacción 2 a continuación. Los compuestos intermedios de bromuro de arilo de la fórmula (8) se pueden preparar a partir de amino anilinas de la fórmula (7) como se describe en el Esquema de Reacción 1. La reacción de Suzuki posterior entre bromuros de arilo de la fórmula (8) y un compañero de acoplamiento de ácido borónico o éster borónico adecuado ($R = H$ o alquilo) obtiene los Ejemplos de la fórmula (1). La reacción de Suzuki se lleva a cabo habitualmente bajo irradiación de microondas en la presencia de una base, tal como K_2CO_3 , y una fuente catalítica de paladio, tal como [1,1'-Bis(di-terc-butilfosfino)ferroceno]dicloropaldio(II), en un sistema solvente adecuado, habitualmente una combinación de MeCN y H_2O .



Esquema de Reacción 2

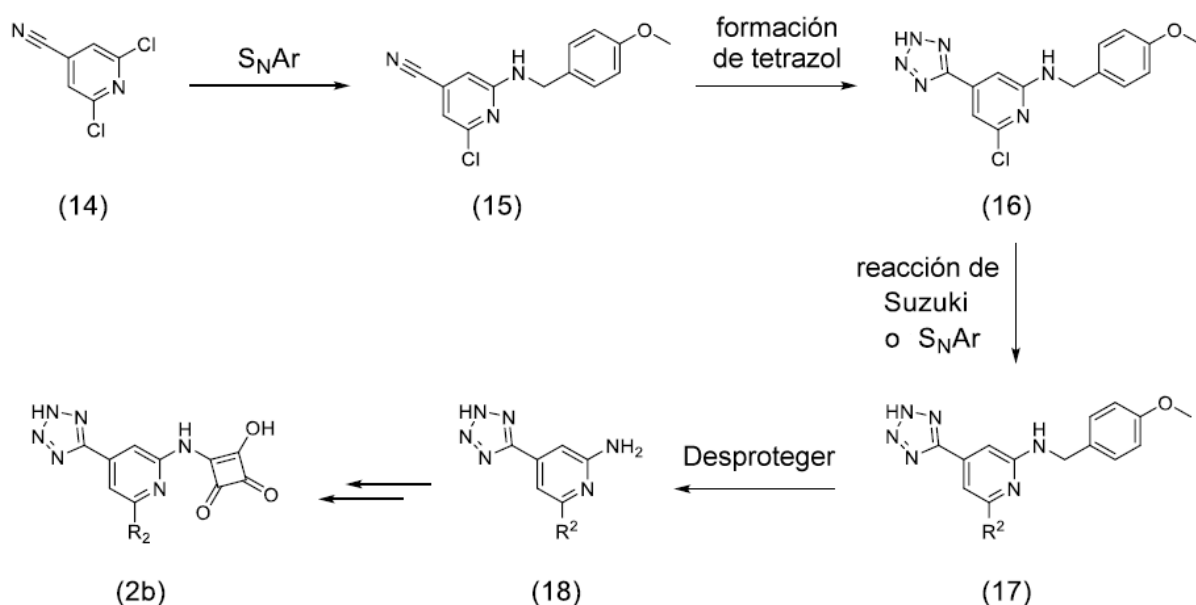
El Esquema de Reacción 3 muestra una variación para la preparación de compuestos de la fórmula (1), mediante el cual R^2 es un fenilo opcionalmente sustituido con $-CONHCH_2R^4$, $-CONHCH_2CH_2OR^4$, $-CONHR^4$ o $-CON(CH_3)R^4$. Los compuestos de ácido biaril carboxílico de la fórmula (9) son fácilmente accesibles a partir de 3-amino-5-bromobenzonitrilo comercial (7) y se convierten en los compuestos de tetrazol correspondientes de la fórmula (10) como se describe en el Esquema de Reacción 1. El grupo anilina de los compuestos intermedios de la fórmula (10) luego se funcionalizan como se describe en el Esquema de Reacción 1. El grupo ácido carboxílico de los compuestos de la fórmula (11) luego se convierte en amidas en la presencia de una amina adecuada, agente de acoplamiento tal como hexafluorofosfato de 3-óxido de 1-[bis(dimetilamino)metilen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio, una base tal como N,N-diisopropiletilamina y un solvente tal como DMF. La función éster de ciclobut-3-eno-1,2-dionas de la fórmula (12) luego se hidroliza para obtener Ejemplos de la fórmula (13) (correspondiente a la fórmula (1) mediante la cual R^2 es un fenilo opcionalmente sustituido con $-CONHCH_2R^4$, $-CONHCH_2CH_2OR^4$, $-CONHR^4$ o $-CON(CH_3)R^4$).



Esquema de Reacción 3

En circunstancias mediante las cuales X es N y R^1 es H , los compuestos de la fórmula (2b) se pueden preparar como se describe en el Esquema de Reacción 4. Por consiguiente, el 2,6-dicloroisonicotinonitrilo comercial (14) se somete a una reacción de $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$ con (4-metoxifenil)metanamina en un solvente tal como NMP con calentamiento a temperaturas en el intervalo de 110-120 °C. La función nitrilo de los compuestos intermedios de la fórmula (15) se convierte luego en grupos tetrazol como se describe en el Esquema de Reacción 1. Cuando R^2 es un grupo alcoxi o fenoxi, el grupo cloro de la piridina (16) se desplaza por un alcohol o alcóxido metálico adecuado (por ejemplo, NaOMe) en presencia o ausencia de una base tal como K_2CO_3 , en un solvente tal como DMSO y a temperaturas que varían de temperatura ambiente a 120 °C para dar compuestos sustituidos con alcoxi o fenoxi (17). Alternativamente, cuando R^2 es fenilo, una reacción de Suzuki entre el cloruro de piridilo de la fórmula (16) y el ácido o éster fenil borónico apropiado obtiene el compuesto intermedio (17). La reacción de Suzuki se lleva a cabo habitualmente en la presencia de una base tal como K_2CO_3 , y una

fuelle catalítica de paladio, habitualmente [1,1'-Bis(difenilfosfino)ferroceno]dicloropaladio(II), en un solvente tal como 1,4-dioxano, a temperaturas de 120 °C. Se entenderá por el experto en la técnica que el orden de los pasos como se establece en el Esquema 4 se puede completar en una secuencia diferente a la mostrada, sin afectar el éxito general de la síntesis del compuesto deseado de la fórmula (2b). La desprotección de la función amino de compuestos de la fórmula (17) se logra luego mediante tratamiento con ácido, habitualmente TFA a 70 °C. La conversión de los Compuesto Intermedios de la Fórmula (18) para dar los Ejemplos de la Fórmula (2b) se logra luego como se describe en el Esquema de Reacción 1.



Esquema de Reacción 4

En ciertas reacciones descritas anteriormente, puede ser necesario proteger uno o más grupos para evitar que la reacción tenga lugar en una ubicación indeseable en la molécula. Se pueden encontrar ejemplos de grupos protectores y métodos de protección y desprotección de grupos funcionales en *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*, Quinta edición, Editor: Peter G. M. Wuts, John Wiley, 2014, (ISBN:9781118057483).

Los compuestos elaborados mediante los métodos anteriores se pueden aislar y purificar mediante cualquiera de una variedad de métodos bien conocidos por los expertos en la técnica y los ejemplos de estos métodos incluyen técnicas de recristalización y cromatografía tal como cromatografía en columna (por ejemplo, cromatografía ultrarrápida), HPLC y SFC.

Procedimientos generales

Cuando no se incluyen vías preparativas, el compuesto intermedio correspondiente está comercialmente disponible. Los reactivos comerciales se usaron sin purificación adicional. Los compuestos finales y los compuestos intermedios se nombran usando ChemDraw Professional, Versión 17.0.0.206 (121). La temperatura ambiente (TA) se refiere a aproximadamente 20-27 °C. Los espectros de RMN ¹H se registraron a 400 o 500 MHz en un instrumento Bruker, Varian o Jeol. Los valores de cambio químico se expresan en partes por millón (ppm), es decir, valores de (δ)- en relación con los siguientes solventes: cloroformo-*d* = 7,26 ppm, DMSO-*d*6 = 2,50 ppm, metanol-*d*4 = 3,31 ppm. Se usan las siguientes abreviaturas para la multiplicidad de las señales de RMN: s=singlete, br=ancho, d=doblete, t=triplete, q=cuartete, m=multiplete. Las constantes de acoplamiento se listan como valores *J*, medidos en Hz. Los resultados de RMN y espectroscopia de masas se corrigieron para tener en cuenta los picos de fondo. La cromatografía se refiere a la cromatografía en columna realizada usando 60 – 120 malla o 40 – 633 μm, gel de sílice de 60 Å y ejecutada bajo condiciones de presión de nitrógeno (cromatografía instantánea). Las reacciones mediadas por microondas se realizaron en reactores de microondas Biotage Initiator o CEM Discover.

Análisis de LCMS

El análisis de LCMS de los compuestos se realizó bajo condiciones de electropulverización usando los instrumentos y métodos que se dan a continuación:

LCMS Método A

Instrumentos: HP 1100 con G1315A DAD, Micromass ZQ; Columna: Phenomenex Gemini-NX C-18, 3 micras, 2,0 x 30 mm; Gradiente [tiempo (min)/solvente B en A (%)] : 0,00/2, 0,10/2, 2,50/95, 3,50/95; Solventes: solvente A = 2,5 L H₂O + 2,5 mL amoníaco al 28% en solución de H₂O; solvente B = 2,5 L MeCN + 135 mL H₂O + 2,5 mL amoníaco al 28% en solución de H₂O. Volumen de inyección 1 μL; Detección UV 230 a 400 nm; Detección de masa 130 a 800 AMU; temperatura de la columna 45 °C; Velocidad de flujo 1,5 mL/min.

LCMS Método B

Instrumentos: Agilent 1260 Infinity LC con Detector de matriz de diodos, Agilent 6120B Single Quadrupole MS con fuente API-ES; Columna: Phenomenex Gemini-NX C-18, 3 micras, 2,0 x 30 mm; Gradiente [tiempo (min)/solvente B en A (%)] : 0,00/5, 2,00/95, 2,50/95, 2,60/5, 3,00/5; Solventes: solvente A = 2,5 L H₂O + 2,5 mL 28 % NH₃ en H₂O; solvente B = 2,5 L MeCN + 129 mL H₂O + 2,7 mL de (28 % NH₃ en H₂O); volumen de inyección 0,5 μL; detección

UV 190 a 400 nm; detección de masa 130 a 800 AMU; temperatura de columna 40 °C; Velocidad de flujo 1,5 mL/min.

LCMS Métodos C y D

Instrumentos: Agilent 1260 Infinity LC con Detector de matriz de diodos, Agilent 6120B Single Quadrupole MS con fuente API-ES; Columna: Restek, Penta Fluoro Fenil Propilo, 3 micras, 2,1 x 30 mm. Gradiente [tiempo (min)/solvente B en A (%)]: **Método C:** 0,00/5, 2,00/95, 2,50/95, 2,60/5, 3,00/5 o **Método D:** 0,00/2, 0,1/2, 8,4/95, 10/95, 10,1/2, 12/2; Solventes: solvente A = agua (2,5 L) con 2,5 mL de ácido fórmico; Solvente B = MeCN (2,5 L) con 125 mL de agua y 2,5 mL de ácido fórmico. Volumen de inyección 0,5 µL; detección UV 190 a 400 nm; detección de masa 130 a 800 AMU; temperatura de la columna 40 °C; Velocidad de flujo 1,5 mL/min.

LCMS Método E

Instrumentos: Waters Acquity Clase H, Matriz de fotodiodos, SQ Detector; Columna: BEH C18, 1,7 micras, 2,1 x 50 mm; Gradiente [tiempo (min)/solvente B en A (%)]: 0,00/5, 0,40/5, 0,8/35, 1,20/55, 2,50/100, 3,30/100 4,00/5; Solventes: solvente A = acetato de amonio 5 mM y ácido fórmico al 0,1 % en H₂O; solvente B = ácido fórmico al 0,1 % en MeCN; Volumen de inyección 2 µL; detección UV 200 a 400 nm; detección de masas 100 a 1200 AMU; columna a temperatura ambiente; Velocidad de flujo 0,55 mL/min.

LCMS Método F

Instrumentos: Serie Agilent 1100 con DAD/ELSD, espectrómetro de masas Agilent LCMSD VL (G1956A), SL (G1956B); Columna: Zorbax SB-C18, 1,8 micras, 4,6 x 15 mm; Gradiente [tiempo (min)/solvente B en A (%)]: 0,0/0, 1,5/100, 1,8/100, 1,81/0; Solventes: solvente A = agua y ácido fórmico al 0,1 %; solvente B = MeCN y ácido fórmico al 0,1 %; Volumen de inyección 1 µL; Detección UV de 200 a 400 nm; Detección de masa 80-1000 AMU; columna a temperatura ambiente; Velocidad de flujo 3,0 mL/min.

LCMS Método G

Instrumentos: Waters 2690 con Detector PDA 996, espectrómetro de masas Acquity QDA; Columna: X-BRIDGE C18, 5,0 micras, 4,6 x 100 mm; Gradiente [tiempo (min)/solvente B en A (%)]: 0,0/10, 1,0/10, 5,0/100, 7,0/100, 7,50/10, 8,0/10; Solventes: solvente A = ácido fórmico al 0,1 % y bicarbonato de amonio 10 mM en agua; solvente B = MeCN; volumen de

inyección 1 µL; detección UV 190 a 800 nm; detección de masas 30-1250 AMU; temperatura de la columna 35 °C; Velocidad de flujo 1,2 mL/min.

LCMS Método H

Instrumentos: Waters Acquity Clase H con matriz de fotodiodos, espectrómetro de masas SQ Detector; Columna: BEH C18, 1,7 micras, 2,1 x 50 mm; Gradiente [tiempo (min)/solvente B en A (%)]: 0,0/5, 0,4/5, 0,8/35, 1,2/55, 2,5/100, 3,3/100, 3,31/5, 4,0/5; solventes: solvente A = ácido fórmico al 0,1 % y acetato de amonio 5 mM en agua; solvente B = ácido fórmico al 0,1 % en MeCN; volumen de inyección 1 µL; detección UV de 200 a 400 nm; detección de masas 100-1200 AMU; columna a temperatura ambiente; Velocidad de flujo 0,55 mL/min.

LCMS Métodos I Y J

Instrumentos para el **Método I**: Shimadzu Nexera con matriz de fotodiodos, espectrómetro de masas LCMS-2020 o instrumentos para el **método J**: Agilent 1290 RRLC con Matriz de fotodiodos, espectrómetro de masas Agilent 6120; Columna: X-BRIDGE C18, 3,5 micras, 4,6 x 50 mm; Gradiente [tiempo (min)/solvente B en A (%)]: 0,0/5, 5,0/90, 5,8/95, 7,20/95, 7,21/5, 10,0/5; Solventes: solvente A = amoníaco al 0,1 % en agua; solvente B = amoníaco al 0,1 % en MeCN; volumen de inyección 1 µL; detección UV 200 a 400 nm; detección de masas 60-1000 AMU; columna a temperatura ambiente; Velocidad de flujo 1,0 mL/min.

LCMS Método K

Instrumentos: Waters 2690 con Detector PDA 996, espectrómetro de masas Acquity QDA; Columna: X-BRIDGE C18, 5,0 micras, 4,6 x 100 mm; Gradiente [tiempo (min)/solvente B en A (%)]: 0,0/10, 3,0/10, 6,0/100, 7,0/100, 7,01/10, 10,0/10; Solventes: solvente A = ácido fórmico al 0,1 % en agua; solvente B = MeOH; Volumen de inyección 1 µL; Detección UV 190 a 800 nm; Detección de masa 30-1250 AMU; temperatura de la columna 35 °C; Velocidad de flujo 1,0 mL/min.

LCMS Método L

Instrumentos: Shimadzu LCMS-2010 EV con Shimadzu SPD-M20A PDA, espectrómetro de masas de un cuadrupolo individual; Columna: Atlantis C18, 3,0 micras, 4,6 x 50 mm; Gradiente [tiempo (min)/solvente B en A (%)]: 0,0/30, 3,0/90, 6,0/90, 6,1/30;

Solventes: solvente A = ácido fórmico al 0,1 % en agua; solvente B = MeCN; volumen de inyección 1 µL; detección UV 254 nm; detección de masas 80-800 AMU; temperatura de la columna 40 °C; Velocidad de flujo 0,8 mL/min.

LCMS Método M

Instrumentos: Shimadzu LCMS-2010 EV con Shimadzu SPD-M20A PDA, espectrómetro de masas de un cuadrupolo individual; Columna: Envase Capcell C18, 3,0 micras, 4,6 x 150 mm; Gradiente [tiempo (min)/solvente B en A (%]): 0,0/30, 5,0/98, 9,5/98, 11,5/3, 12/3; Solventes: solvente A = ácido fórmico al 0,1 % en agua; solvente B = MeCN; volumen de inyección 1 µL; detección UV 254 nm; detección de masas 80-800 AMU; temperatura de la columna 40 °C; Velocidad de flujo 0,8 mL/min.

Abreviaturas

Bn = bencilo

CDI = carbonildiimidazol

DCM = diclorometano

DIPEA = N,N-diisopropiletilamina

DMF = dimetilformamida

DMSO = dimetil sulfóxido

ESI = ionización por electropulverización

EtOAc = acetato de etilo

EtOH = etanol

h = hora(s)

HATU = hexafluorofosfato de 3-óxido de 1-[Bis(dimetilamino)metilen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio

H₂O = agua

HCl = cloruro de hidrógeno, ácido clorhídrico

HPLC (prep) = cromatografía líquida de alto rendimiento (preparativa)

IPA = propan-2-ol

K_2CO_3 = carbonato de potasio

LC = cromatografía líquida

MeCN = acetonitrilo

MeOH = metanol

min(s) = minuto(s)

MS = espectrometría de masa

nm = nanómetro(s)

NMP = N-metil-2-pirrolidona

RMN = resonancia magnética nuclear

$POCl_3$ = oxiclورو de fósforo

TA = temperatura ambiente

sat. = saturado(a)

SFC = cromatografía de fluidos supercríticos

TEA = trietilamina

TFA = ácido trifluoroacético

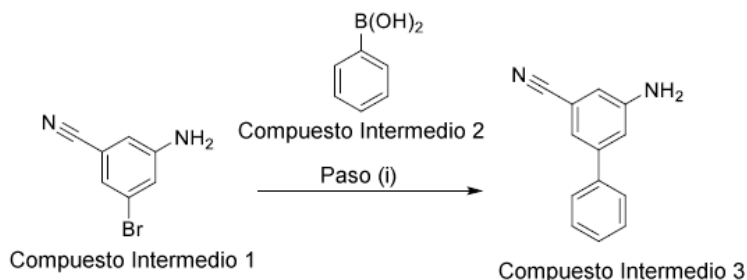
THF = tetrahidrofurano

TLC = cromatografía de capa fina

Procedimientos sintéticos generales para los compuestos intermedios

Vía 1

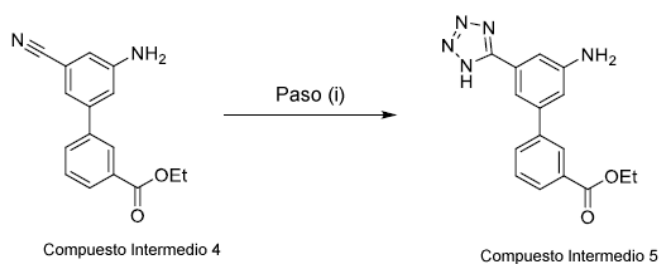
Procedimiento para la preparación del Compuesto Intermedio 3,5-amino-[1,1'-

bifenil]-3-carbonitrilo

Paso (i): Una solución del **Compuesto Intermedio 1**, 3-amino-5-bromobenzonitrilo (200 mg, 1,02 mmol), **Compuesto Intermedio 2**, ácido fenilborónico (161 mg, 1,32 mmol), K_2CO_3 (281 mg, 2,03 mmol) y $\text{Pd}(\text{Ph}_3\text{P})_4$ (60 mg, 0,05 mmol) en 1,4-dioxano (4 mL) y agua (1 mL) se calentó a 100 °C bajo irradiación de microondas durante 3 horas, después de lo cual se diluyó con EtOAc y agua. Los orgánicos se separaron, se lavaron con salmuera, se secaron mediante el paso a través de una frita hidrófoba y se concentraron. El material crudo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida (fase normal, sílice) bajo un gradiente de EtOAc (0 % a 45 %) en PE para obtener el **Compuesto Intermedio 3**, 5-amino-[1,1'-bifenil]-3-carbonitrilo (165 mg, 0,85 mmol, 85 % de rendimiento) como un sólido naranja. Datos disponibles en la Tabla 2.

Vía 2

Procedimiento para la preparación del Compuesto Intermedio 5, 3'-amino-5'-(1H-tetrazol-5-il)-[1,1'-bifenil]-3-carboxilato de etilo

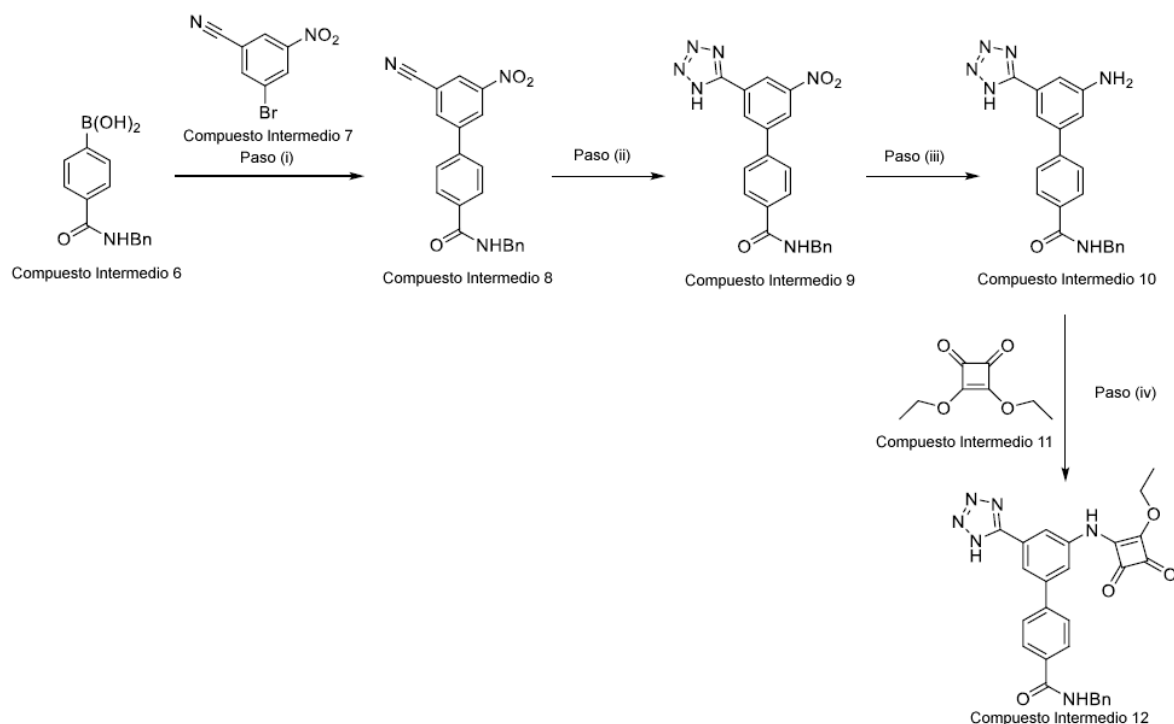


Paso (i): A una solución del **Compuesto Intermedio 4**, 3'-amino-5'-ciano-[1,1'-bifenil]-3-carboxilato de etilo (73 mg, 0,27 mmol) en DMF (0,5 mL) se adicionó NaN_3 (36 mg, 0,55 mmol) y NH_4Cl (30 mg, 0,55 mmol). La mezcla se calentó a 130 °C durante 3 horas, después de lo cual se enfrió a TA y se acidificó a pH 3-4 con HCl 1 M (ac.). El precipitado se recolectó por filtración y se secó bajo vacío para obtener el **Compuesto Intermedio 5**, 3'-amino-5'-(1H-tetrazol-5-il)-[1,1'-bifenil]-3-carboxilato de etilo (76 mg, 0,25 mmol, 91 % de rendimiento) como

un sólido de color melocotón. Datos disponibles en la Tabla 2.

Vía 3

Procedimiento para la preparación del Compuesto Intermedio 12, N-bencil-3'-((2-etoxi-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)-5'-(1H-tetrazol-5-il)-[1,1'-bifenil]-4-carboxamida



Paso (i): Una mezcla del **Compuesto Intermedio 7**, 3-Bromo-5-nitrobenzonitrilo (1,0 g, 4,41 mmol), **Compuesto Intermedio 6**, ácido 4-(N-bencilaminocarbonyl)fenilborónico (1,24 g, 4,85 mmol), K_2CO_3 (1,22 g, 8,81 mmol) y $\text{Pd}(\text{Ph}_3\text{P})_4$ (0,15 g, 0,130 mmol) en 1,4-Dioxano (17 mL) y Agua (2 mL) se calentó a 100 °C bajo irradiación de microondas durante 1 hora. Después de este tiempo, la mezcla se diluyó con EtOAc, se lavó con agua y luego con salmuera, se secó mediante el paso a través de una frita hidrófoba y se concentró. El material crudo se trituró con Et_2O y el sólido resultante se recolectó por filtración para obtener el **Compuesto Intermedio 8**, N-bencil-3'-ciano-5'-nitro-[1,1'-bifenil]-4-carboxamida (1,12 g, 3,13 mmol, 71 % de rendimiento) como un sólido color canela. Datos disponibles en la Tabla 2.

Paso (ii): Una mezcla del **Compuesto Intermedio 8**, N-bencil-4-(3-ciano-5-nitrofenil)benzamida (1,03 g, 2,87 mmol), NaN_3 (373 mg, 5,74 mmol) y NH_4Cl (307 mg, 5,74 mmol) en DMF (22 mL) se calentó a 130 °C durante 2 horas. La mezcla se enfrió a TA y se acidificó a pH 2 con HCl 1 M (acuoso). El sólido se recolectó por filtración, se suspendió en tolueno y

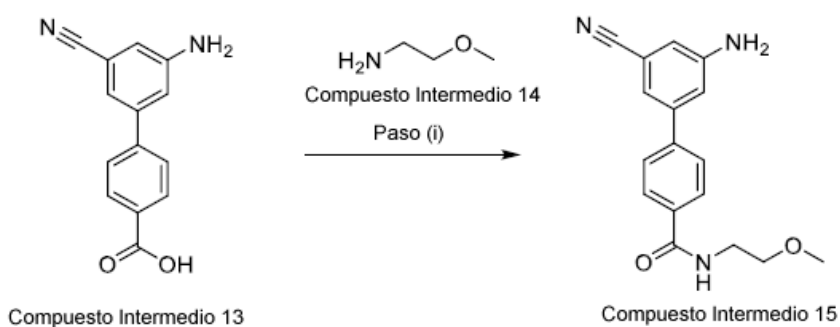
se concentró (x2) para obtener el **Compuesto Intermedio 9**, N-bencil-4-[3-nitro-5-(1H-tetrazol-5-il)fenil]benzamida (950 mg, 2,37 mmol, 83 % de rendimiento) como un sólido color canela. Datos disponibles en la Tabla 2.

Paso (iii): Una mezcla del **Compuesto Intermedio 9**, N-bencil-4-[3-nitro-5-(1H-tetrazol-5-il)fenil]benzamida (630 mg, 1,57 mmol), polvo de zinc (412 mg, 6,29 mmol) y NH_4Cl (842 mg, 15,7 mmol) en 1,4-dioxano (44 mL) y agua (6,3 mL) se calentó a reflujo durante 4 horas. La mezcla se enfrió a TA y se filtró a través de un lecho de Celite (lavando con MeOH). El filtrado se concentró y el residuo se disolvió en HCl (ac.) 1 M (20 mL). El pH se ajustó a ~6 mediante la adición de NaOH 1 M (ac). El precipitado se recolectó por filtración, se lavó con agua, luego se suspendió en tolueno y se concentró para obtener el **Compuesto Intermedio 10**, 4-[3-amino-5-(1H-tetrazol-5-il)fenil] -N-bencil-benzamida (575 mg, 1,55 mmol, 99 % de rendimiento) como un sólido color canela. Datos disponibles en la Tabla 2.

Paso (iv): Se agitó una suspensión del **Compuesto Intermedio 10**, 4-[3-amino-5-(1H-tetrazol-5-il)fenil]-N-bencil-benzamida (575 mg, 1,55 mmol), **Compuesto Intermedio 11**, escuarato de dietilo (423 mg, 2,48 mmol) y TEA (0,44 mL, 3,1 mmol) en EtOH a TA durante 24 horas, después de lo cual se adicionó HCl 1 M (ac.). El precipitado se recolectó por filtración, se suspendió en tolueno y se concentró para dar el **Compuesto Intermedio 12**, N-bencil-3'-((2-etoxi-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)-5'-(1H-tetrazol-5-il)-[1,1'-bifenil]-4-carboxamida (635 mg, 1,28 mmol 83 % de rendimiento) como un sólido color canela. Datos disponibles en la Tabla 2.

Vía 4

Procedimiento para la preparación del Compuesto Intermedio 15, 3'-amino-5'-ciano-N-(2-metoxietil)-[1,1'-bifenil]-4-carboxamida

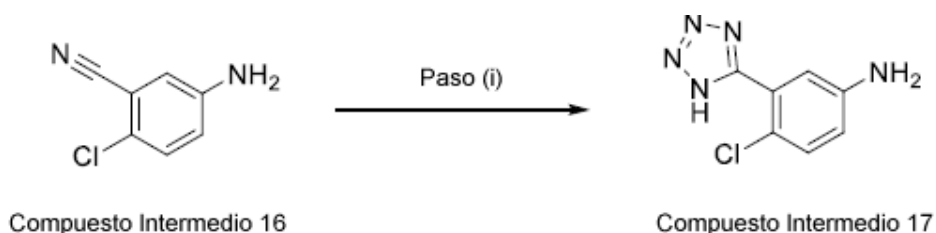


Paso (i): A una solución del **Compuesto Intermedio 13**, ácido 3'-amino-5'-ciano-[1,1'-

bifenil]-4-carboxílico (400 mg, 1,68 mmol), **Compuesto Intermedio 14**, 2-metoxietan-1-amina (0,3 mL, 3,36 mmol) y DIPEA (0,88 mL, 5,04 mmol) en DMF (4,8 mL) se adicionó HATU (768 mg, 2,02 mmol). La mezcla se agitó a TA durante 1 hora después de lo cual se diluyó con EtOAc, se lavó con agua y salmuera, se secó mediante el paso a través de una frita hidrófoba y se concentró. El material crudo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida (fase inversa, C18) bajo un gradiente de MeCN (10 % a 50 %) en agua (que contiene HCOOH al 0,1 % v/v) para obtener el **Compuesto Intermedio 15**, 3'-amino-5'-ciano-N-(2-metoxietil)-[1,1'-bifenil]-4-carboxamida (317 mg, 1,07 mmol, 64 % de rendimiento) como un sólido color canela. Datos disponibles en la Tabla 2.

Vía 5

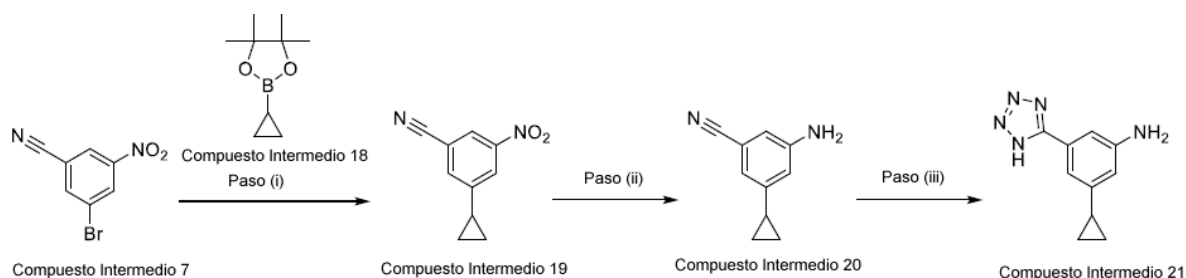
Procedimiento para la preparación del Compuesto Intermedio 17, 4-cloro-3-(1H-tetrazol-5-il)anilina



Paso (i): Una solución del **Compuesto Intermedio 16**, 5-amino-2-clorobenzonitrilo (400 mg, 2,63 mmol), NaN₃ (342 mg, 5,26 mmol), NH₄Cl (281 mg, 5,88 mmol) en DMF (3 mL) se calentó a 130 °C durante 3 días. La mezcla se enfrió y el material insoluble se removió por filtración, lavando con MeCN. La solución se concentró bajo presión reducida, el residuo se disolvió en EtOAc y se lavó con agua. La capa orgánica se secó y el solvente se evaporó. El residuo se cristalizó a partir de DCM para obtener el **Compuesto Intermedio 17**, 4-cloro-3-(1H-tetrazol-5-il)anilina. Datos disponibles en la Tabla 2.

Vía 6

Procedimiento para la preparación del Compuesto Intermedio 21, 3-ciclopropil-5-(1H-tetrazol-5-il)anilina



Paso (i): Compuesto Intermedio 7, 3-bromo-5-nitrobenzonitrilo (3,00 g, 13,3 mmol), **Compuesto Intermedio 18**, (2-ciclopropil-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolano) (3,34 g, 19,9 mmol) y K_2CO_3 (3,68g, 26,62mmol) se suspendieron en 1,4-dioxano (22 mL) y agua (8 mL) a temperatura ambiente y se desgasificaron con N_2 durante 15 min. Después de esto, se adicionó $PdCl_2(dppf)$ (0,97 g, 1,32 mmol) y la mezcla se calentó a 100 °C durante 4 horas. La mezcla se enfrió y se dividió entre agua (300 mL) y EtOAc (200 mL). La capa orgánica se separó y la capa acuosa se extrajo adicionalmente con EtOAc (2 x 100 mL). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na_2SO_4 y se concentraron. El material crudo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida (fase normal, sílice) bajo un gradiente de EtOAc (0 % a 5 %) en PE para obtener el **Compuesto Intermedio 19**, 3-ciclopropil-5-nitrobenzonitrilo (1,30 g, 6,91 mmol, 52 % de rendimiento) como un sólido amarillo. Datos disponibles en la Tabla 2.

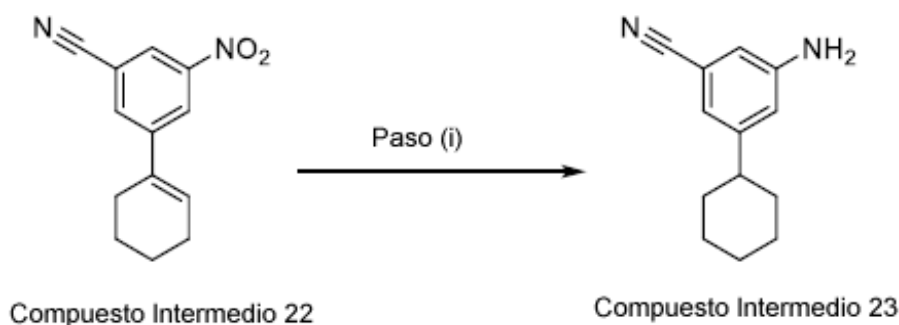
Paso (ii): Compuesto Intermedio 19, 3-ciclopropil-5-nitrobenzonitrilo (1,30 g, 6,91 mmol) se disolvió en MeOH (7mL) y se adicionó una suspensión de NH_4Cl (2,01 g, 37,2 mmol) y polvo de zinc (2,43g, 37,22mmol) en agua (7mL). La reacción se agitó a TA durante 30 min, después de lo cual se filtró a través de Celite. El filtrado se concentró y el residuo se dividió entre $NaHCO_3$ y EtOAc ac., sat.,. La capa orgánica se separó y la capa acuosa se extrajo adicionalmente con EtOAc (x2). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na_2SO_4 y se concentraron. El material crudo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida (fase normal, sílice) bajo un gradiente de EtOAc (0 % a 30 %) en PE para obtener el **Compuesto Intermedio 20**, 3-amino-5-ciclopropilbenzonitrilo (1,01 g, 6,39 mmol, 93 % de rendimiento) como un líquido amarillo. Datos disponibles en la Tabla 2.

Paso (iii): Una suspensión del **Compuesto Intermedio 20**, 3-amino-5-ciclopropilbenzonitrilo (1,01 g, 6,39 mmol), NaN_3 (2,07 g, 31,9 mmol) y $ZnCl_2$ (4,35 g, 31,9 mmol) en 2-propanol se calentó a 130 °C durante 16 horas. La mezcla se enfrió, filtró a través de Celite y el filtrado se concentró. El residuo se dividió entre agua y EtOAc. La capa orgánica se separó y la capa acuosa se extrajo adicionalmente con EtOAc (x2). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na_2SO_4 y se concentraron. El material crudo se purificó por

cromatografía en columna ultrarrápida (fase inversa, C18) bajo un gradiente de HCOOH 0,1 N ac. (0 % a 30 %) en MeCN para obtener el **Compuesto Intermedio 21**, 3-ciclopropil-5-(1H-tetrazol-5-il)anilina (800 mg, 3,98 mmol, 62 % de rendimiento). Datos disponibles en la Tabla 2.

Vía 7

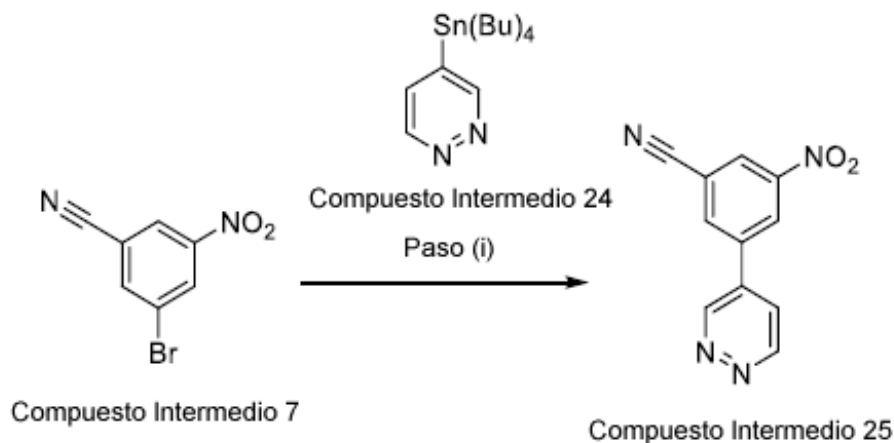
Procedimiento para la preparación del Compuesto Intermedio 23, 3-amino-5-ciclohexilbenzonitrilo



Paso (i): Se agitó una solución del **Compuesto Intermedio 22**, 5-nitro-2',3',4',5'-tetrahydro-[1,1'-bifenil]-3-carbonitrilo (3,00 g, 13,2 mmol) y Pd/C al 10 %, humedad al 50 % (3,00 g) en MeOH (30 mL) bajo una atmósfera de gas H₂ a TA durante 5 horas. Después de este tiempo, la mezcla se filtró a través de Celite y se concentró. El material crudo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida (fase normal, sílice) bajo un gradiente de EtOAc (0 % a 25 %) en DCM para obtener el **Compuesto Intermedio 23**, 3-amino-5-ciclohexilbenzonitrilo (1,20 g, 6,0 mmol, 45 % de rendimiento) como un líquido amarillo. Datos disponibles en la Tabla 2.

Vía 8

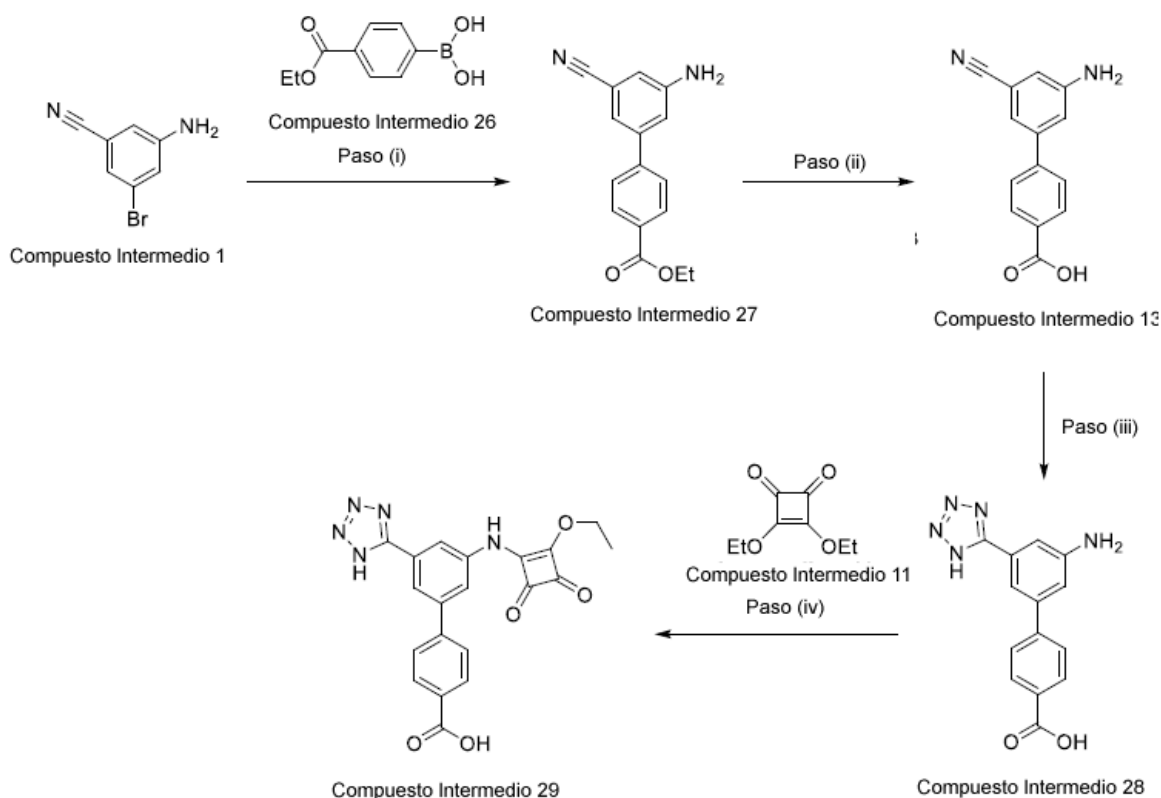
Procedimiento para la preparación del Compuesto Intermedio 25, 3-nitro-5-(piridazin-4-il)benzonitrilo



Paso (i): Se desgasificó una suspensión del **Compuesto Intermedio 7**, 3-bromo-5-nitrobenzonitrilo (0,35 g, 1,55 mmol), **Compuesto Intermedio 24**, 4-(tributylestannil)piridazina (0,57 g, 1,55 mmol) y CsF (0,47 g, 3,10 mmol) en MeCN con N₂ durante 15 minutos, después de lo cual se adicionó Pd(Ph₃P₄) (0,09 g, 0,80 mmol) y yoduro de cobre (I) (0,06 g, 0,31 mmol). La mezcla se calentó a 40 °C durante 4 horas, después de lo cual se enfrió y se dividió entre EtOAc y agua. Los orgánicos se separaron y la capa acuosa se extrajo con EtOAc. Los orgánicos combinados se secaron sobre Na₂SO₄ y se concentraron. El material crudo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida (fase normal, sílice) bajo un gradiente de EtOAc (0 % a 40 %) en hexano para obtener el **Compuesto Intermedio 25**, 3-nitro-5-(piridazin-4-il)benzonitrilo (0,25 g, 1,10 mmol, 71 %) como un sólido amarillo. Datos disponibles en la Tabla 2.

Vía 9

Procedimiento para la preparación del Compuesto Intermedio 29, ácido 3'-((2-etoxi-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)-5'-(1H-tetrazol-5-il)-[1,1'-bifenil]-4-carboxílico



Paso (i): Una solución del **Compuesto Intermedio 1**, 3-amino-5-bromobenzonitrilo (20,0 g, 101,5 mmol), **Compuesto Intermedio 26**, ácido (4-(etoxicarbonil)fenil)borónico (23,6 g, 121,8 mmol), K_2CO_3 (28,0 g, 203 mmol) y $Pd(Ph_3P)_4$ (2,34 g, 2,03 mmol) en en 1,4-Dioxano (200 mL) y agua (30 mL) se calentó a 90 °C durante 16 horas, después de lo cual se enfrió y se repartió entre EtOAc y agua. Los orgánicos se separaron, se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na_2SO_4 y se concentraron. El producto crudo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida (fase normal, sílice) bajo un gradiente de EtOAc (0 % a 16 %) en hexano para obtener el **Compuesto Intermedio 27**, 3'-amino-5'-ciano-[1,1'-bifenil]-4-carboxilato de etilo (23,0 g, 86,5 mmol, 85 % de rendimiento) como un sólido blanquecino. Datos disponibles en la Tabla 2.

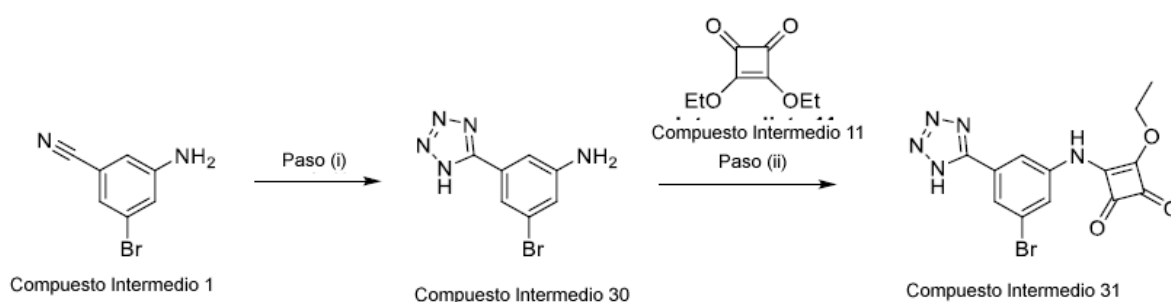
Paso (ii): A una solución del **Compuesto Intermedio 27**, 3'-amino-5'-ciano-[1,1'-bifenil]-4-carboxilato de etilo (23,0 g, 86,5 mmol) en THF (130 mL) y agua (130 mL) se adicionó hidróxido de litio monohidratado (6,22 g, 259,3 mmol). La mezcla se agitó a TA durante 6 horas, después de lo cual se concentró a sequedad. Se adicionó HCl (ac.) 1 N y el precipitado resultante se recolectó por filtración. El sólido se secó bajo vacío para obtener el **Compuesto Intermedio 13**, ácido 3'-amino-5'-ciano-[1,1'-bifenil]-4-carboxílico (17,0 g, 71,4 mmol, 83 % de rendimiento) como un sólido blanquecino. Datos disponibles en la Tabla 2.

Paso (iii): Una solución del **Compuesto Intermedio 13**, ácido 3'-amino-5'-ciano-[1,1'-bifenil]-4-carboxílico (16,0 g, 67,2 mmol), NaN_3 (8,74 g, 134,4 mmol) y NH_4Cl (7,19 g, 134,4 mmol) en DMF (80 mL) se calentó a 130 °C durante 16 horas, después de lo cual se enfrió y acidificó a pH 3 mediante la adición de HCl 1 N (ac.). El precipitado resultante se recolectó por filtración y se secó bajo vacío para obtener el **Compuesto Intermedio 28**, ácido 3'-amino-5'-(1H-tetrazol-5-il)-[1,1'-bifenil]-4-carboxílico (13,0 g, 46,3 mmol, 69 % de rendimiento) como un sólido blanquecino. Datos disponibles en la Tabla 2.

Paso (iv): A una solución del **Compuesto Intermedio 28**, ácido 3'-amino-5'-(1H-tetrazol-5-il)-[1,1'-bifenil]-4-carboxílico (12,5 g, 44,4 mmol) en EtOH (120 mL) se adicionó TEA (12,4 mL, 88,9 mmol) y el **Compuesto Intermedio 11**, escuarato de dietilo (7,50 g, 44,4 mmol). La mezcla se agitó a TA durante 16 horas, después de lo cual se acidificó con HCl 1 N (ac.). El precipitado resultante se recolectó por filtración y se secó bajo vacío para obtener el **Compuesto Intermedio 29**, ácido 3'-((2-etoxi-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)-5'-(1H-tetrazol-5-il)-[1,1'-bifenil]-4-carboxílico (15,0 g, 37,0 mmol, 83 % de rendimiento) como un sólido marrón. Datos disponibles en la Tabla 2.

Vía 10

Procedimiento para la preparación del Compuesto Intermedio 31, 3'-((3-bromo-5-(1H-tetrazol-5-il)fenil)amino)-4-etoxiciclobut-3-eno-1,2-diona



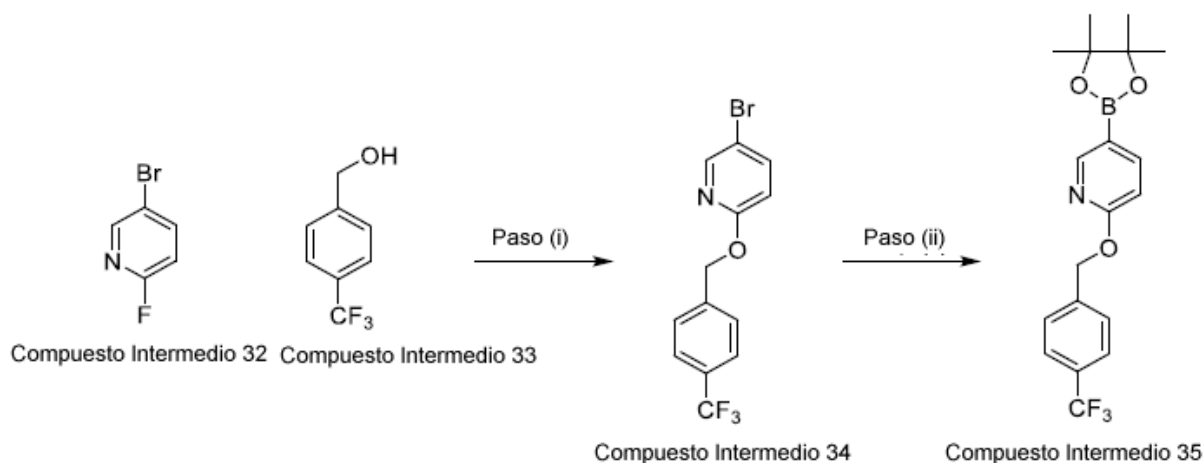
Paso (i): A una suspensión del **Compuesto Intermedio 1**, 3-amino-5-bromobenzonitrilo (26,0 g, 132 mmol) en 2-propanol (500 mL) se adicionó NaN_3 (43,1 g, 663,3 mmol) y ZnCl_2 (90,4 g, 663,3 mmol). La mezcla se agitó a 130 °C durante 4 horas, después de lo cual se filtró a través de Celite. El filtrado se concentró y el residuo se dividió entre EtOAc y NaHCO_3 ac., sat. La capa orgánica se separó, la capa acuosa se extrajo adicionalmente con EtOAc (x3) y los orgánicos combinados se secaron sobre Na_2SO_4 y se concentraron para obtener el **Compuesto Intermedio 30**, 3-bromo-5-(1H-tetrazol-5-il)anilina (26,8 g, 112,2 mmol, 85 % de rendimiento) como un sólido amarillo que se usó sin purificación adicional.

Datos disponibles en la Tabla 2.

Paso (ii): A una solución del **Compuesto Intermedio 30**, 3-bromo-5-(1H-tetrazol-5-il)anilina (10,0 g, 27,5 mmol) en DCM (100 mL) se adicionó TEA (11,7 mL, 83,6 mmol). La mezcla se agitó durante 10 minutos, después de lo cual se adicionó el **Compuesto Intermedio 11**, escuarato de dietilo (6,18 mL, 41,8 mmol). La mezcla se agitó a TA durante 4 horas después de lo cual se concentró bajo presión reducida. El producto crudo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida (fase normal, sílice) bajo un gradiente de MeOH (0 % a 15 %) en DCM para obtener el **Compuesto Intermedio 31**, 3-((3-bromo-5-(1H-tetrazol-5-il)fenil)amino)-4-etoxiciclobut-3-eno-1,2-diona (3,80 g, 10,4 mmol, 38 % de rendimiento) como un sólido blanquecino. Datos disponibles en la Tabla 2.

Vía 11

Procedimiento para la preparación del Compuesto Intermedio 35, (5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-2-((4-(trifluorometil)bencil)oxi)piridina)



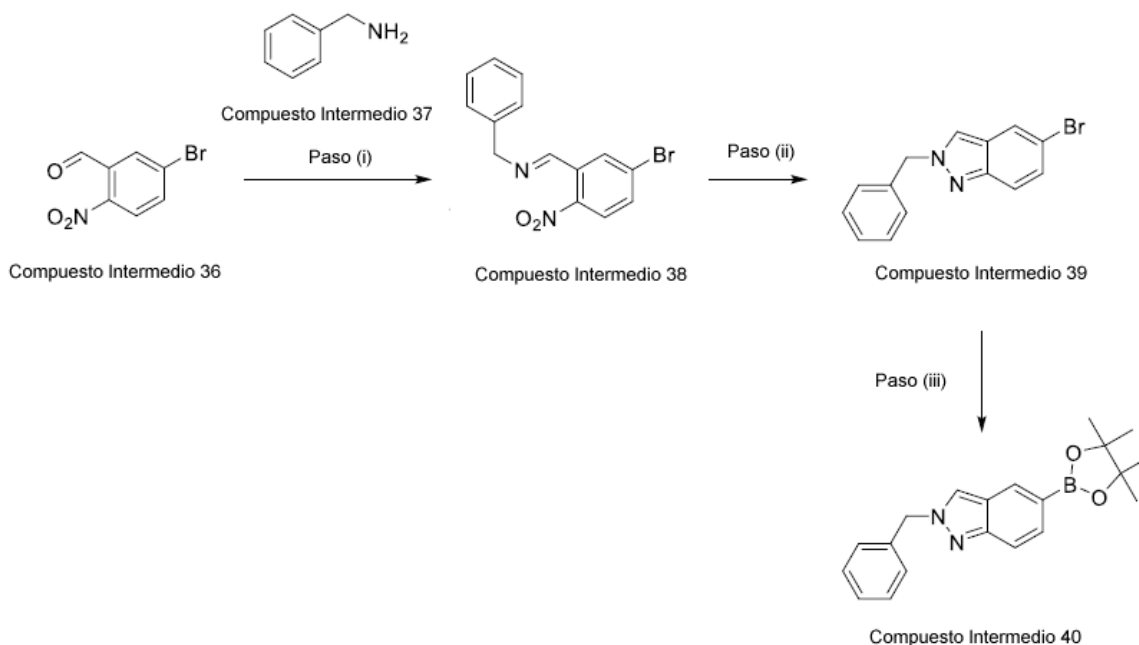
Paso (i): A una solución del **Compuesto Intermedio 33**, [4-(trifluorometil)fenil]metanol (3,00 g, 17,0 mmol) en DMF (30 mL) se adicionó K_2CO_3 (3,53 g, 20,2 mmol) a TA. La mezcla se agitó durante 10 minutos después de lo cual se adicionó el **Compuesto Intermedio 32**, 5-bromo-2-fluoropiridina (2,99 g, 17,0 mmol). La mezcla se calentó a 80 °C durante 2 horas, después de lo cual se enfrió y se dividió entre EtOAc y agua. La capa acuosa se extrajo adicionalmente con EtOAc y los orgánicos combinados se secaron sobre Na_2SO_4 y se concentraron. El producto crudo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida (fase normal, sílice) bajo un gradiente de EtOAc (0 % a 5 %) en hexano para obtener el **Compuesto Intermedio 34**, (5-bromo-2- ((4-(trifluorometil)bencil)oxi)piridina) (2,00 g, 6,02 mmol, 35 % de

rendimiento) como un sólido blanquecino. Datos disponibles en la Tabla 2.

Paso (ii): Una solución del **Compuesto Intermedio 34**, (5-bromo-2-((4-(trifluorometil)bencil)oxi)piridina (1,20 g, 3,61 mmol), KOAc (1,06 g, 10,9 mmol), bis(pinacolato)diboro (2,76 g, 10,9 mmol) y PdCl₂(dppf) (0,13 g, 0,18 mmol) en 1,4-dioxano (20 mL) bajo nitrógeno se calentó a 80 °C durante 4 horas después de lo cual se enfrió y se dividió entre EtOAc y agua. La capa acuosa se extrajo adicionalmente con EtOAc y los orgánicos combinados se secaron sobre Na₂SO₄ y se concentraron. El producto crudo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida (fase normal, sílice) bajo un gradiente de EtOAc (0 % a 8 %) en hexano para obtener el **Compuesto Intermedio 35**, (5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-2-((4-(trifluorometil)bencil)oxi)piridina (1,20 g, 3,17 mmol, 87 %) como un semisólido blanco. Datos disponibles en la Tabla 2.

Vía 12

Procedimiento para la preparación del Compuesto Intermedio 40, 2-bencil-5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-2H-indazol



Paso (i): Una mezcla del **Compuesto Intermedio 36**, 5-bromo-2-nitrobenzaldehído (3,00 g, 13,1 mmol) y el **Compuesto Intermedio 37**, bencilamina (1,82 g, 17,0 mmol) en tolueno (30 mL) se calentó a 80 °C durante 4 horas. La reacción se enfrió a temperatura ambiente y se concentró para dar el **Compuesto Intermedio 38** crudo, N-bencil-1-(5-bromo-

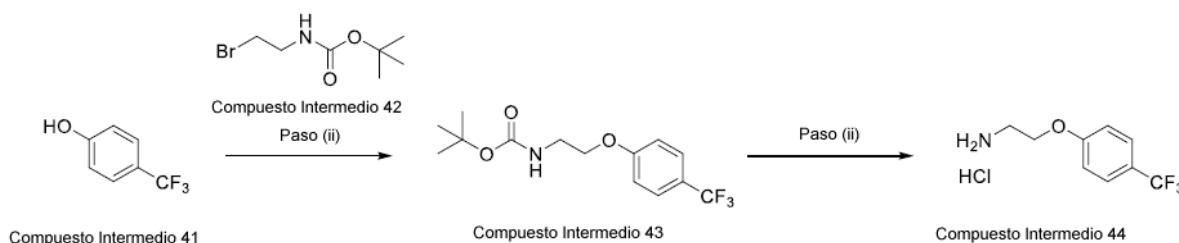
2-nitrofenil)metanimina (2,10 g) como un líquido marrón oscuro. Datos disponibles en la Tabla 2.

Paso (ii): Compuesto Intermedio 38, se disolvió N-bencil-1-(5-bromo-2-nitrofenil)metanimina (2,10 g, 6,60 mmol) en fosfito de trietilo (3,40 mL, 19,8 mmol) y la mezcla se calentó a 210 °C durante 5 minutos bajo irradiación de microondas. La mezcla se dividió entre EtOAc y agua, luego se separó. La capa acuosa se extrajo con EtOAc (x2) y los orgánicos combinados se secaron sobre Na₂SO₄, luego se concentraron. El material crudo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida (fase normal, sílice) bajo un gradiente de EtOAc (0 % a 20 %) en hexano para obtener el **Compuesto Intermedio 39**, 2-bencil-5-bromo-2*H*-indazol (1,30 g, 4,54 mmol, 35 % de rendimiento en 2 pasos) como una goma marrón. Datos disponibles en la Tabla 2.

Paso (iii): Compuesto Intermedio 39, se disolvió 2-bencil-5-bromo-2*H*-indazol (1,30 g, 4,54 mmol), KOAc (1,34 g, 13,6 mmol), bis(pinacolato)diboro (3,46 g, 13,6 mmol) y PdCl₂(dppf) (0,17 g, 0,22 mmol) en 1,4-dioxano (15 mL) bajo una atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se agitó a 80 °C durante 4 horas, después de lo cual se enfrió a temperatura ambiente y se dividió entre EtOAc y agua. Los orgánicos se separaron y la capa acuosa se extrajo adicionalmente con EtOAc. Los orgánicos combinados se secaron sobre Na₂SO₄ y se concentraron para obtener el **Compuesto Intermedio 40**, 2-bencil-5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-2*H*-indazol (1,0 g, 2,99 mmol, 66 % de rendimiento) como una goma marrón que se usó sin purificación adicional. Datos disponibles en la Tabla 2.

Vía 13

Procedimiento para la preparación del Compuesto Intermedio 44, 2-(4-(trifluorometil)fenoxi)etan-1-amina, sal de clorhidrato



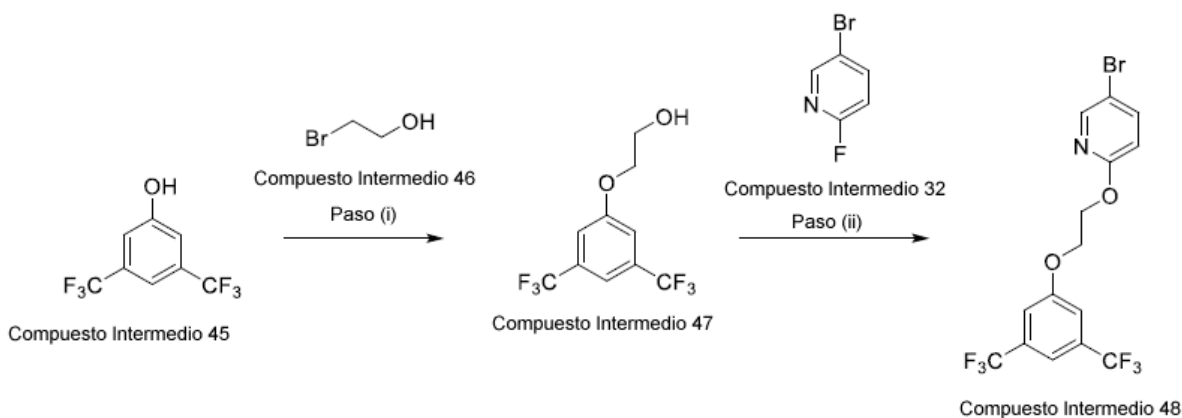
Paso (i): A una solución del **Compuesto Intermedio 42**, (2-bromoetil)carbamato de terc-butilo (876 mg, 3,9 mmol) en DMF (10 mL) se adicionó el **Compuesto Intermedio 41**, 4-(trifluorometil)fenol (422 mg, 2,6 mmol) y Cs₂CO₃ (1,25 g, 3,8 mmol). La mezcla se calentó a

90 °C durante 4 horas, después de lo cual se enfrió y vertió en agua. La mezcla se extrajo con EtOAc, y los orgánicos se lavaron con salmuera, se secaron a través del paso a través de una frita hidrófoba y se concentraron. El material crudo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida (fase normal, sílice) bajo un gradiente de EtOAc (0 % a 50 %) en éter de petróleo para obtener el **Compuesto Intermedio 43**, (2-(4-(trifluorometil)fenoxi) etil)carbamato de terc-butilo (793 mg, 2,6 mmol, 100 % de rendimiento) como un aceite amarillo. Datos disponibles en la Tabla 2.

Paso (ii): A una solución del **Compuesto Intermedio 43**, (2-(4-(trifluorometil)fenoxi) etil)carbamato de terc-butilo (793 mg, 2,6 mmol) en 1,4-dioxano (2 mL) se adicionó una solución de HCl 4 M en 1,4-dioxano (2 mL). La mezcla se agitó durante 18 horas, después de lo cual se adicionó MeOH (1 mL). La mezcla se agitó durante 30 minutos adicionales y luego se concentró para obtener el **Compuesto Intermedio 44**, 2-(4-(trifluorometil)fenoxi)etan-1-amina, sal de clorhidrato (596 mg, 2,5 mmol, 95 % de rendimiento) como un sólido amarillo pálido. Datos disponibles en la Tabla 2.

Vía 14

Procedimiento para la preparación del Compuesto Intermedio 48, 2-(2-(3,5-bis(trifluorometil)fenoxi)etoxi)-5-bromopiridina



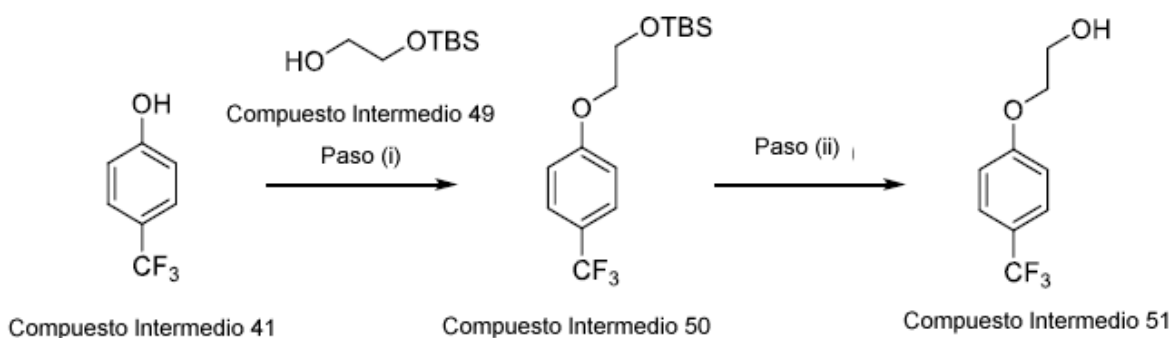
Paso (i): A una solución del **Compuesto Intermedio 45**, 3,5-bis(trifluorometil)fenol (5,00 g, 21,7 mmol) en DMF (50 mL) se adicionó K₂CO₃ (8,99 g, 65,2 mmol). La mezcla se agitó a TA durante 20 minutos, después de lo cual se adicionó el **Compuesto Intermedio 46**, 2-bromoetan-1-ol (9,25 mL, 130 mmol). La mezcla se calentó a 80 °C durante 4 horas, después de lo cual se enfrió y se dividió entre EtOAc y agua. La capa acuosa se extrajo adicionalmente con EtOAc y los orgánicos combinados se secaron sobre Na₂SO₄ y se

concentraron. El producto crudo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida (fase normal, sílice) bajo un gradiente de EtOAc (0 % a 20 %) en hexano para obtener el **Compuesto Intermedio 47**, 2-(3, 5-bis (trifluorometil)fenoxi)etan-1-ol (3,90 g, 14,2 mmol, 66 % de rendimiento) como un aceite. Datos disponibles en la Tabla 2.

Paso (ii): A una suspensión de NaH (60 % en aceite mineral) (0,77 g, 19,2 mmol) en DMF (25 mL) a 0 °C se adicionó el **Compuesto Intermedio 47**, 2-(3,5-bis(trifluorometil)fenoxi)etan-1-ol (3,00 g, 11,0 mmol). La mezcla se calentó a TA durante 15 minutos, después de lo cual se adicionó el **Compuesto Intermedio 32**, 5-bromo-2-fluoropiridina (2,30 g, 13,1 mmol). La reacción se agitó a TA durante 1 hora, después de lo cual se dividió entre EtOAc y agua. La capa acuosa se extrajo adicionalmente con EtOAc y los orgánicos combinados se secaron sobre Na₂SO₄ y se concentraron. El producto crudo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida (fase normal, sílice) bajo un gradiente de EtOAc (0 % a 12 %) en hexano para obtener el **Compuesto Intermedio 48**, 2-(2-(3,5-bis(trifluorometil)fenoxi)etoxi)-5-bromopiridina (3,60 g, 8,37 mmol, 77 % de rendimiento) como un semisólido amarillo. Datos disponibles en la Tabla 2.

Vía 15

Procedimiento para la preparación del Compuesto Intermedio 51, 2-(4-(trifluorometil)fenoxi)etan-1-ol



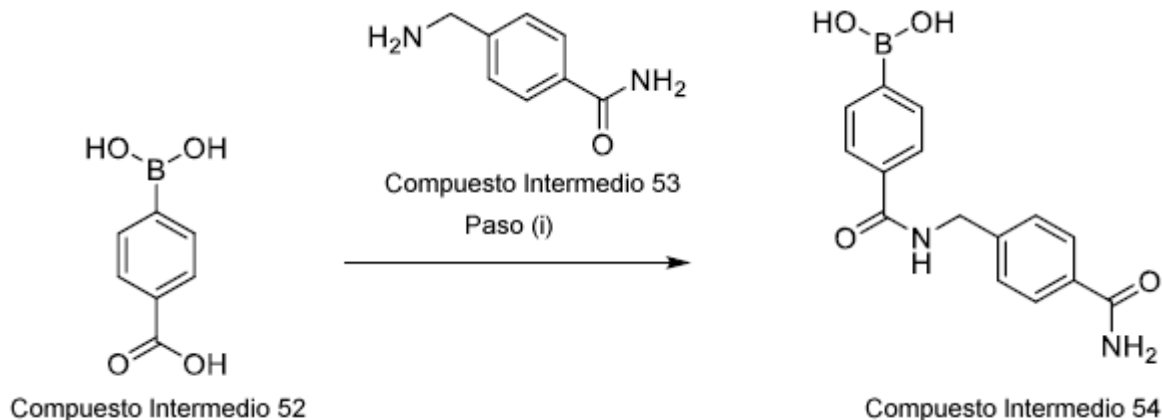
Paso (i): A una solución del **Compuesto Intermedio 41**, 4-(trifluorometil) fenol (2,80 g, 17,3 mmol), **Compuesto Intermedio 49**, 2-((terc-butildimetilsilil)oxi)etan-1-ol (4,00 g, 22,5 mmol) y trifenilfosfina (5,89 g, 22,5 mmol) en tolueno (30 mL) a 0 °C se adicionó DIAD (4,40 mL, 22,5 mmol) gota a gota. La mezcla se agitó a TA durante 16 horas, después de lo cual se dividió entre EtOAc y agua. La capa acuosa se extrajo adicionalmente con EtOAc y los orgánicos combinados se secaron sobre Na₂SO₄ y se concentraron. El material crudo se

purificó por cromatografía en columna ultrarrápida (fase normal, sílice) bajo un gradiente de EtOAc (0 % a 2 %) en hexano para obtener el **Compuesto Intermedio 50**, terc-butildimetil(2-(4-(trifluorometil)fenoxi)etoxi)silano (3,40 g, 10,6 mmol, 61 % de rendimiento) como un líquido amarillo. Datos disponibles en la Tabla 2.

Paso (ii): A una solución del **Compuesto Intermedio 50**, terc-butildimetil(2-(4-(trifluorometil)fenoxi)etoxi)silano (3,40 g, 10,6 mmol) en THF (30 mL) a 0 °C se adicionó HCl 1 N (ac.), (30 mL). La mezcla se agitó a TA durante 1 hora, después de lo cual se dividió entre NaHCO₃ y EtOAc ac., sat.,. Los orgánicos se separaron, se secaron sobre Na₂SO₄ y se concentraron. El material crudo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida (fase normal, sílice) bajo un gradiente de EtOAc (0 % a 30 %) en hexano para obtener el **Compuesto Intermedio 51**, 2-(4-(trifluorometil)fenoxi)etan-1-ol (2,50g, 12,1 mmol, supuesto cuantitativo) como un líquido amarillo. Datos disponibles en la Tabla 2.

Vía 16

Procedimiento para la preparación del Compuesto Intermedio 54, ácido (4-((4-carbamoilbencil)carbamoil)fenil)borónico

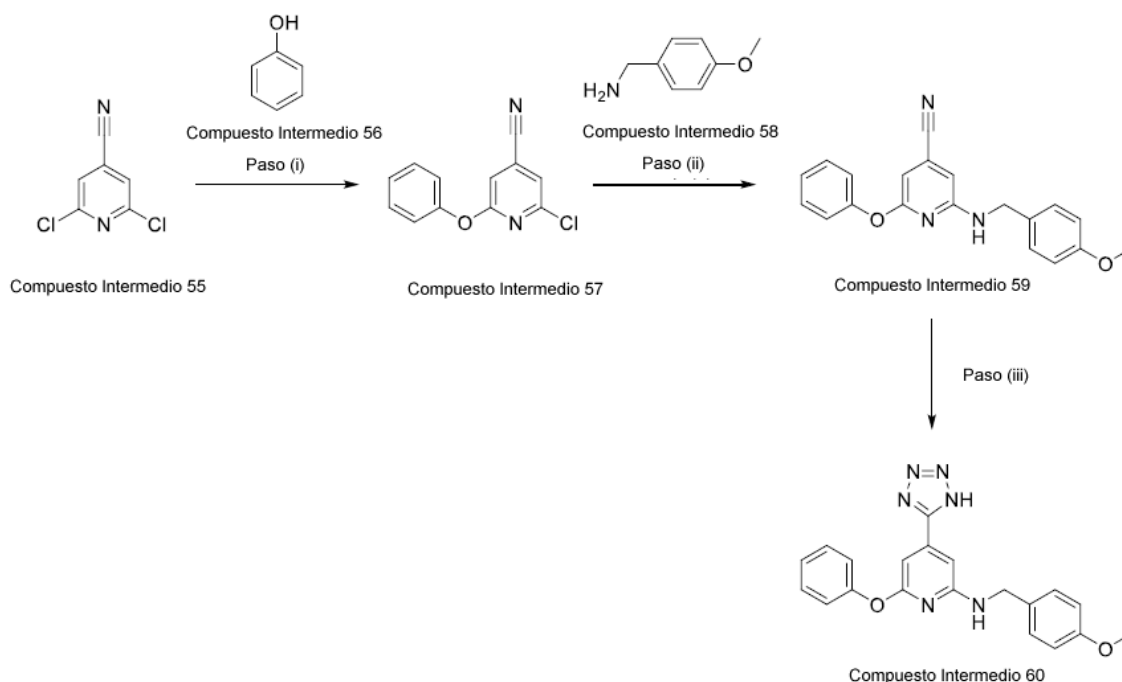


Paso (i): A una solución del **Compuesto Intermedio 52**, ácido 4-boronobenzoico (795 mg, 4,79 mmol) en DMF (5 mL) bajo enfriamiento con hielo se adicionó HATU (2,27 g, 5,99 mmol). La mezcla se agitó a la misma temperatura durante 10 minutos después de lo cual se adicionó el **Compuesto Intermedio 53**, 4-(aminometil) benzamida (600 mg, 3,99 mmol) y DIPEA (2,02 mL, 11,98 mmol) secuencialmente. La mezcla se calentó a TA y se agitó durante 6 horas, después de lo cual se dividió entre EtOAc y agua. Los orgánicos se separaron y la capa acuosa se lavó con EtOAc. Los orgánicos combinados se secaron sobre Na₂SO₄ y se concentraron para obtener el **Compuesto Intermedio 54**, ácido (4-((4-carbamoilbencil)carbamoil)fenil)borónico

carbamoilbencil)carbamoil)fenil)borónico (0,350 g, 1,17 mmol, 29 % de rendimiento) como un sólido amarillo. Datos disponibles en la Tabla 2.

Vía 17

Procedimiento para la preparación del Compuesto Intermedio 60, N-(4-metoxibencil)-6-fenoxi-4-(1H-tetrazol-5-il)piridin-2-amina



Paso (i): A una solución del **Compuesto Intermedio 56**, fenol (1,31 g, 14,0 mmol) en DMSO (40 mL) se adicionó K_2CO_3 (2,4 g, 17,4 mmol). La mezcla se agitó a TA durante 30 minutos, después de lo cual se adicionó el **Compuesto Intermedio 55**, 2,6-dicloroisonicotinonitrilo (2,0 g, 11,6 mmol). La mezcla se agitó a TA durante 24 horas, después de lo cual se vertió en agua y se extrajo con EtOAc (x 3). Los orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na_2SO_4 y se concentraron. El material crudo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida (fase normal, sílice) bajo un gradiente de EtOAc (0 % a 20 %) en éter de petróleo para obtener el **Compuesto Intermedio 57**, 2-cloro-6-fenoxiisonicotinonitrilo (2,5 g, 10,9 mmol, 94 % de rendimiento) como un líquido amarillo. Datos disponibles en la Tabla 2.

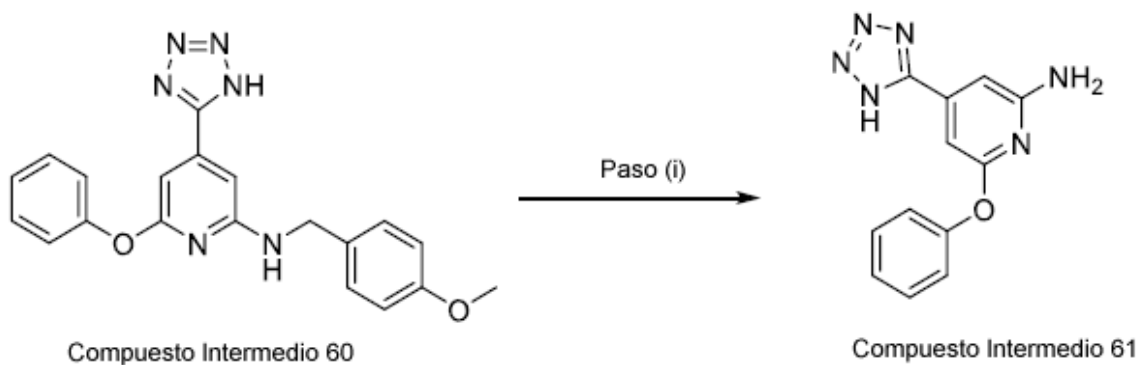
Paso (ii): Una solución del **Compuesto Intermedio 57**, 2-cloro-6-fenoxiisonicotinonitrilo (2,5 g, 10,8 mmol) y el **Compuesto Intermedio 58**, 4-metoxibencilamina (1,63 g, 11,9 mmol) en NMP (26 mL) se calentó a 120 °C durante 3 horas,

después de lo cual la mezcla se enfrió y se vertió en agua. El precipitado se filtró y el material crudo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida (fase normal, sílice) bajo un gradiente de EtOAc (10 % a 50 %) en éter de petróleo para obtener el **Compuesto Intermedio 59**, 2-((4-metoxibencil)amino)-6-fenoxiisonicotinonitrilo (1,7 g, 5,1 mmol, 47 % de rendimiento) como un sólido blanquecino. Datos disponibles en la Tabla 2.

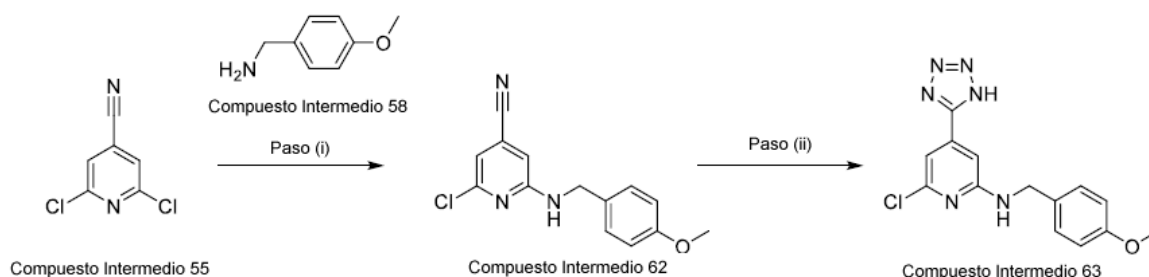
Paso (iii): Una solución del **Compuesto Intermedio 59**, 2-((4-metoxibencil)amino)-6-fenoxiisonicotinonitrilo (1,7 g, 5,13 mmol), NaN_3 (1,33 g, 20,5 mmol) y NH_4Cl (1,1 g, 20,5 mmol) en DMF (9,2 mL) se calentó a 130 °C durante 2 horas. La mezcla se enfrió y se vertió en agua. La mezcla acuosa se acidificó a pH 1 usando HCl 1 N (ac.) y se agitó durante 30 minutos, después de lo cual se extrajo con EtOAc (x 3). Los orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na_2SO_4 y se concentraron. El material crudo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida (fase normal, sílice) bajo un gradiente de MeOH (0 % a 5 %) en DCM para obtener el **Compuesto Intermedio 60**, N-(4-metoxibencil)-6-fenoxi-4-(1H-tetrazol-5-il)piridin-2-amina (1,6 g, 4,27 mmol, 83 % de rendimiento) como una goma marrón. Datos disponibles en la Tabla 2.

Vía 18

Procedimiento para la preparación del Compuesto Intermedio 61, 6-fenoxi-4-(1H-tetrazol-5-il)piridin-2-amina



Paso (iv): Una solución del **Compuesto Intermedio 60**, N-(4-metoxibencil)-6-fenoxi-4-(1H-tetrazol-5-il)piridin-2-amina (1,6 g, 4,27 mmol) en TFA (16 mL) se calentó a 70 °C durante 24 horas en un tubo sellado, después de lo cual la mezcla se enfrió y se concentró hasta sequedad. La trituración del material crudo con DCM obtuvo el **Compuesto Intermedio 61**, 6-fenoxi-4-(1H-tetrazol-5-il)piridin-2-amina (0,75 g, 3,91 mmol, 93 % de rendimiento) como un sólido marrón. Datos disponibles en la Tabla 2.

Vía 19**Procedimiento para la preparación del Compuesto Intermedio 63, 6-cloro-N-(4-metoxibencil)-4-(1H-tetrazol-5-il)piridin-2-amina**

Paso (i): Una solución del **Compuesto Intermedio 55**, 2,6-dicloroisonicotinonitrilo (4,5 g, 26,2 mmol), y el **Compuesto Intermedio 58**, 4-metoxibencilamina (3,6 g, 26,2 mmol) en NMP (45 mL) se calentó a 110 °C durante 3 horas. La mezcla se enfrió y se vertió en agua con hielo (500 mL). El precipitado resultante se filtró, se lavó con agua y se secó bajo vacío para obtener el **Compuesto Intermedio 62**, 2-cloro-6-((4-metoxibencil)amino)isonicotinonitrilo (3,6 g, 13,2 mmol, 50 % de rendimiento) como un sólido blanquecino. Datos disponibles en la Tabla 2.

Paso (ii): Una solución del **Compuesto Intermedio 62**, 2-cloro-6-((4-metoxibencil)amino) isonicotinonitrilo (1,36 g, 5 mmol), NaN₃ (650 mg, 10 mmol) y NH₄Cl (535 mg, 10 mmol) en DMF (9 mL) se calentó a 130 °C durante 2 horas. La mezcla se enfrió y se vertió en agua. La mezcla acuosa se acidificó hasta pH 1 usando HCl 1 N (ac.), y el precipitado resultante se filtró, se lavó con agua y se secó bajo vacío para obtener el **Compuesto Intermedio 63**, 6-cloro-N-(4-metoxibencil)-4-(1H-tetrazol-5-il)piridin-2-amina (960 mg, 3,04 mmol, 61 % de rendimiento) como un sólido blanquecino. Datos disponibles en la Tabla 2.

Vía 20**Procedimiento para la preparación del Compuesto Intermedio 64, 6-metoxi-N-(4-metoxibencil)-4-(1H-tetrazol-5-il)piridin-2-amina**

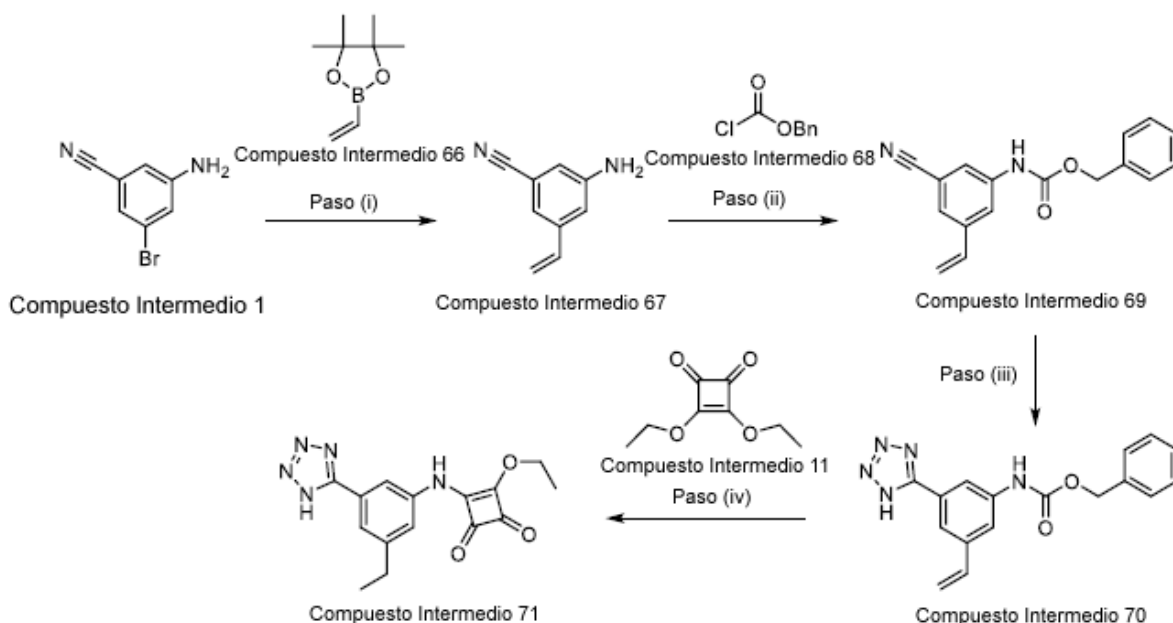
Compuesto Intermedio 63
 Compuesto Intermedio 65

59

columna ultrarrápida (fase normal, sílice) bajo un gradiente de MeOH (0 % a 8 %) en cloroformo para obtener el **Compuesto Intermedio 65**, N-(4-metoxibencil)-6-fenil-4-(1H-tetrazol-5-il)piridin-2-amina (810 mg, 2,26 mmol, 72 % de rendimiento) como un sólido blanquecino. Datos disponibles en la Tabla 2.

Vía 22

Procedimiento para la preparación del Compuesto Intermedio 71, 3-etoxi-4-[3-etil-5-(1H-tetrazol-5-il)anilino]ciclobut-3-eno-1,2-diona



Paso (i): Una solución del **Compuesto Intermedio 1**, 3-amino-5-bromobenzonitrilo (1,0 g, 5,08 mmol), **Compuesto Intermedio 66**, 4,4,5,5-tetrametil-2-vinil-1,3,2-dioxaborolano (1,29 mL, 7,61 mmol), K_2CO_3 (1,40 g, 10,2 mmol) y $Pd(Ph_3P)_4$ (0,118 g, 0,10 mmol) en 1,4-dioxano (24 mL) y agua (6 mL) se calentó a 80 °C durante 18 horas, después de lo cual se enfrió a TA y se dividió entre EtOAc y agua. Los orgánicos se separaron, se lavaron con salmuera, se secaron mediante el paso a través de una frita hidrófoba y se concentraron. El material crudo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida (fase normal, sílice) bajo un gradiente de EtOAc (0 % a 25 %) en isohexano para obtener el **Compuesto Intermedio 67**, 3-amino-5-vinilbenzonitrilo (695 mg, 4,82 mmol, 95 % de rendimiento) como un sólido naranja. Datos disponibles en la Tabla 2.

Paso (ii): A la solución del **Compuesto Intermedio 67**, 3-amino-5-vinilbenzonitrilo (640 mg, 4,44 mmol) y K_2CO_3 (927 mg, 6,7 mmol) en THF (37 mL) se adicionó el **Compuesto**

Intermedio 68, cloroformiato de bencilo (0,95 mL, 6,7 mmol). La mezcla se agitó a TA durante 18 horas, después de lo cual se dividió entre EtOAc y agua. Los orgánicos se separaron, se lavaron con salmuera, se secaron mediante el paso a través de una frita hidrófoba y se concentraron. El material crudo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida (fase normal, sílice) bajo un gradiente de Et₂O (0 % a 60 %) en isohexano para obtener el **Compuesto Intermedio 69**, (3-ciano-5-vinilfenil)carbamato de bencilo (944 mg, 3,40 mmol, 76 % de rendimiento) como un sólido blanquecino. Datos disponibles en la Tabla 2.

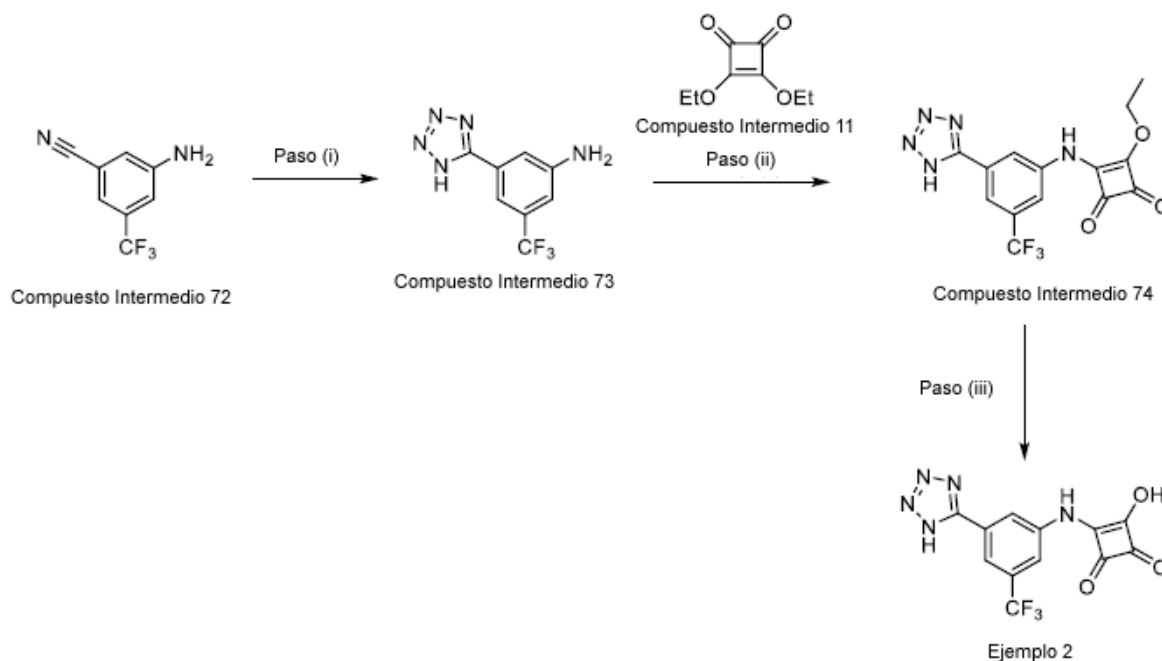
Paso (iii): Una solución del **Compuesto Intermedio 69**, (3-ciano-5-vinilfenil)carbamato de bencilo (614 mg, 2,2 mmol), NaN₃ (287 mg, 4,4 mmol) y NH₄Cl (235 mg, 4,4 mmol) en DMF (6 mL) se calentó a 130 °C durante 2 horas. Después de este tiempo, la mezcla se enfrió y se dividió entre HCl 1 M (ac.) y EtOAc. Los orgánicos se separaron, se lavaron con salmuera, se secaron mediante el paso a través de una frita hidrófoba y se concentraron. El material crudo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida (fase inversa, C18) bajo un gradiente de MeCN (10 % a 60 %) en agua (HCOOH al 0,1 % v/v) para obtener el **Compuesto Intermedio 70**, (3-(1H-tetrazol-5-il)-5-vinilfenil)carbamato de bencilo (355 mg, 1,12 mmol, 50 % de rendimiento) como un sólido beige. Datos disponibles en la Tabla 2.

Paso (iv): Se agitó una mezcla del **Compuesto Intermedio 70**, (3-(1H-tetrazol-5-il)-5-vinilfenil)carbamato de bencilo (270 mg, 0,84 mmol), TEA (0,12 mL, 0,84 mmol) y Pd/C al 10 % (60 mg) en MeOH (4 mL) bajo una atmósfera de gas hidrógeno durante 3,5 horas. La mezcla se filtró a través de Celite (lavando con EtOAc) y se concentró. El residuo se disolvió en EtOH (4 mL) y se adicionó el **Compuesto Intermedio 11**, escuarato de dietilo (0,12 mL, 0,84 mmol). Esta mezcla se agitó a TA durante 3 horas, después de lo cual se concentró. El material crudo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida (fase inversa, C18) bajo un gradiente de MeCN (10 % a 80 %) en agua (HCOOH al 0,1 % v/v) para obtener el **Compuesto Intermedio 71**, 3-etoxi-4-[3-etil-5-(1H-tetrazol-5-il)anilino]ciclobut-3-eno-1,2-diona (203 mg, 0,65mmol, 77 % de rendimiento) como un sólido color crema. Datos disponibles en la Tabla 2.

Procedimientos sintéticos generales para los ejemplos

Vía A

Procedimiento para la preparación del Ejemplo 2, 3-((3-(1H-tetrazol-5-il)-5-(trifluorometil)fenil)amino)-4-hidrox ciclobut-3-eno-1,2-diona



Paso (i): A una solución del **Compuesto Intermedio 72**, 3-amino-5-(trifluorometil)benzonitrilo (150 mg, 0,81 mmol) en DMF (3 mL) se adicionó NaN_3 (65 mg, 1,62 mmol) y NH_4Cl (53,5 mg, 1,62 mmol). La mezcla se calentó a 130 °C durante 20 horas, después de lo cual se enfrió a TA y se acidificó a pH 1 con HCl 1 M (ac.). La mezcla se extrajo con EtOAc y los orgánicos se lavaron con agua y salmuera, se secaron mediante el paso a través de una frita hidrófoba y se concentraron. El material crudo se purificó por cromatografía ultrarrápida en fase inversa (sílice C18) bajo un gradiente de MeCN (0-50 %) en agua modificada (que contiene HCOOH al 0,1% v/v) para obtener el producto **Compuesto Intermedio 73**, 3-(1H-tetrazol-5-il)-5-(trifluorometil)anilina (144 mg, 0,63 mmol, 77 % de rendimiento). Datos disponibles en la Tabla 2.

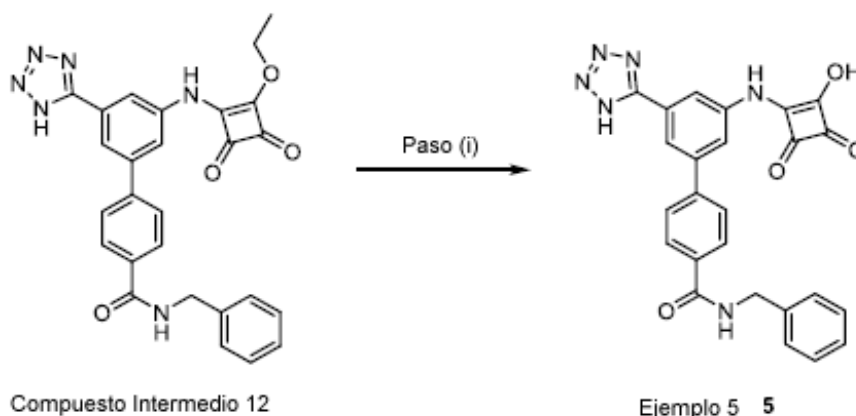
Paso (ii): A una solución del **Compuesto Intermedio 73**, 3-(1H-tetrazol-5-il)-5-(trifluorometil)anilina (77 mg, 0,34 mmol) en EtOH (1,4 mL) se adicionó el **Compuesto Intermedio 11**, escuarato de dietilo (0,05 mL, 0,34 mmol) y TEA (0,05 mL, 0,38 mmol). La mezcla se agitó a TA durante 1 hora, después de lo cual se concentró a sequedad. El material crudo se purificó por cromatografía ultrarrápida de fase inversa (sílice C18) bajo un gradiente de MeCN (0-60 %) en agua modificada (HCOOH al 0,1 % v/v) para obtener el producto **Compuesto Intermedio 74**, 3-((3-(1H-tetrazol-5-il)-5-(trifluorometil)fenil)amino)-4-etoxiciclobut-3-eno-1,2-diona (51,6 mg, 0,15 mmol, 44 % de rendimiento). Datos disponibles en la Tabla 2.

Paso (iii): **Compuesto Intermedio 74**, 3-((3-(1H-tetrazol-5-il)-5-

(trifluorometil)fenil)amino)-4-etoxiciclobut-3-eno-1,2-diona (39 mg, 0,11 mmol) se disolvió en una mezcla 10:1 de THF y HCl 1 M (ac.) (0,55 mL) y se calentó a 60 °C durante 3 horas, después de lo cual se concentró. El material crudo se purificó por HPLC preparativa [fase inversa (Kinetex C18, 100 × 30 mm, 5 µm, 30 mL por min, gradiente de Solvente B en Solvente A: 5 % a 95 % de Solvente B (durante 10 min), 100 % de Solvente B (durante 2 min); Solvente A: TFA al 0,1 % en agua. Solvente B: MeCN] para obtener el **Ejemplo 2**, 3-((3-(1H-tetrazol-5-il)-5-(trifluorometil)fenil)amino)-4-hidroxiciclobut-3-eno-1,2-diona (15,3 mg, 0,047 mmol, 43 % de rendimiento). Datos disponibles en la Tabla 3.

Vía B

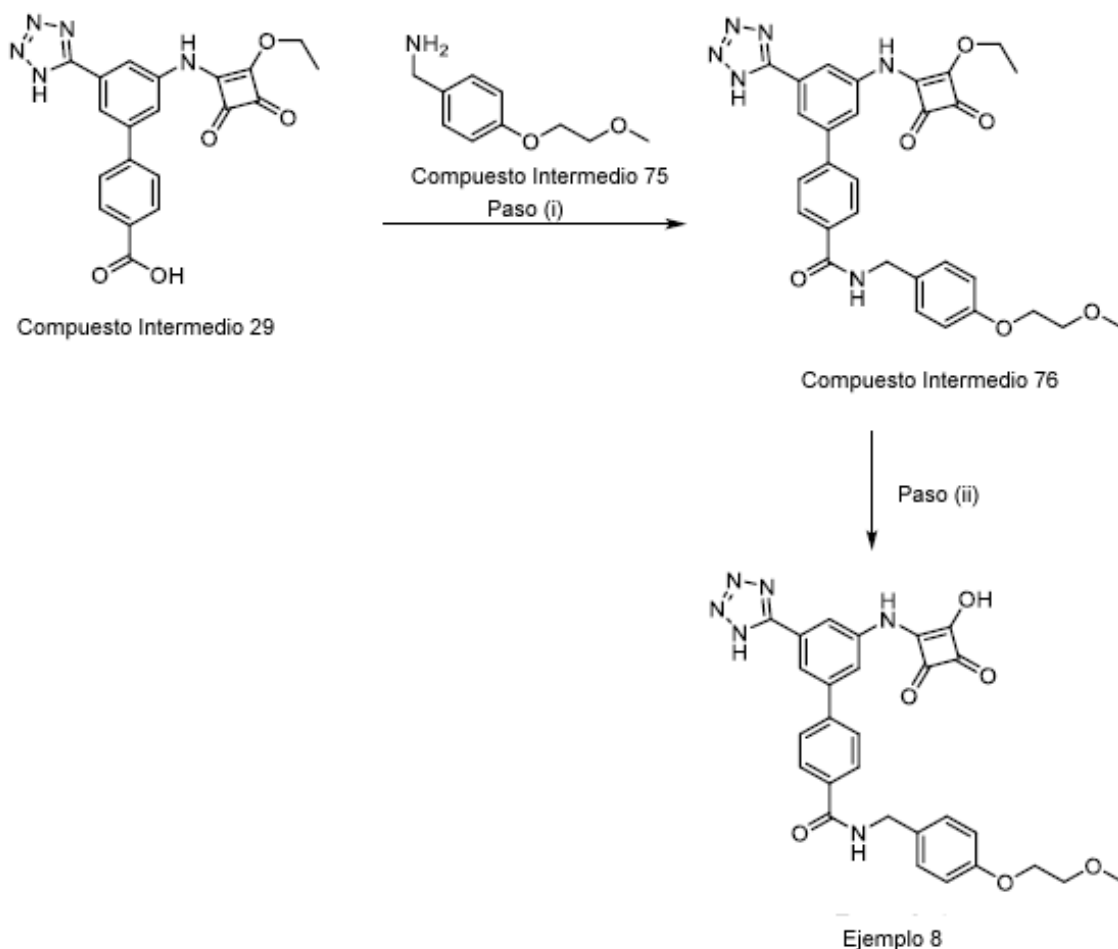
Procedimiento para la preparación del Ejemplo 5, N-bencil-3'-((2-hidroxi-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)-5'-(1H-tetrazol-5-il)-[1,1'-bifenil]-4-carboxamida



Paso (i): Una suspensión del **Compuesto Intermedio 12**, N-bencil-3'-((2-etoxi-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)-5'-(1H-tetrazol-5-il)-[1,1'-bifenil]-4-carboxamida (1,43 g, 2,89 mmol) en THF (15 mL) y HCl 1 M (ac.) (1,5 mL) se calentó a 60 °C durante 24 horas, después de lo cual la mezcla se concentró. El material crudo se purificó por HPLC preparativa [fase inversa (Gemini-NX C18, 100 × 30 mm, 5 µm, 30 mL por min, gradiente de Solvente B en Solvente A: 5 % a 35 % de Solvente B (durante 10 min), 100 % de Solvente B (durante 2 min); Solvente A: agua que contiene 0,2 % v/v de solución de amoníaco al 28 %. Solvente B: MeCN]. El sólido resultante se suspendió en HCl 1 M (acuoso) y se agitó vigorosamente durante 2 horas, después de lo cual se recolectó por filtración. El sólido húmedo se suspendió en tolueno y se concentró para obtener el **Ejemplo 5**, N-bencil-3'-((2-hidroxi-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)-5'-(1H-tetrazol-5-il)-[1,1'-bifenil]-4-carboxamida (720 mg, 1,55 mmol, 53 % de rendimiento) como un sólido verde claro. Datos disponibles en la Tabla 3.

Vía C

Procedimiento para la preparación del Ejemplo 8, 3'-((2-hidroxi-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)-N-(4-(2-metoxietoxi)bencil)-5'-(1H-tetrazol-5-il)-[1,1'-bifenil]-4-carboxamida



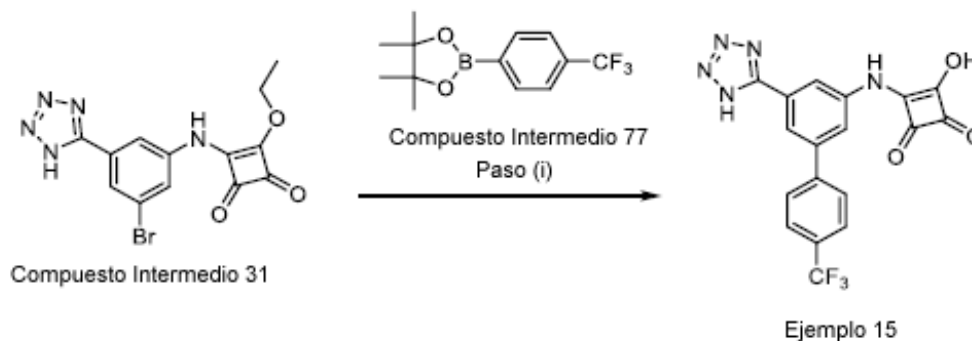
Paso (i): A una solución del **Compuesto Intermedio 29**, ácido 3'-((2-etoxi-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)-5'-(1H-tetrazol-5-il)-[1,1'-bifenil]-4-carboxílico (60 mg, 0,15 mmol) y DIPEA (0,08 mL) en DMF (0,7 mL) se adicionó HATU (68,4 mg, 0,18 mmol), seguido del **Compuesto Intermedio 75**, (4-(2-metoxietoxi)fenil)metanamina (29,5 mg, 0,17 mmol). La mezcla se agitó a TA durante 1 hora, después de lo cual se diluyó con DMSO y se purificó por HPLC preparativa [fase inversa (Kinetex C18, 100 × 30 mm, 5 µm, 30 mL por min, gradiente de Solvente B en Solvente A: 40 % a 70 % de Solvente B (durante 10 min), 100 % de Solvente B (durante 2 min); Solvente A: agua que contiene TFA al 0,1 %. Solvente B: MeCN] para obtener el **Compuesto Intermedio 76**, 3'-((2-etoxi-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)-N-(4-(2-

metoxietoxi)bencil)-5'-(1H-tetrazol-5-il)-[1,1'-bifenil]-4-carboxamida (36,3 mg, 0,064 mmol, 43 % de rendimiento) como un sólido verde pálido. Datos disponibles en la Tabla 2.

Paso (ii): Una suspensión del **Compuesto Intermedio 76**, 3'-((2-etoxi-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)-N-(4-(2-metoxietoxi)bencil)-5'-(1H-tetrazol-5-il)-[1,1'-bifenil]-4-carboxamida (36,3 mg, 0,064 mmol) en THF (1 mL) y HCl 1 M (ac.) (0,1 mL) se calentó a 60 °C durante 13 horas, después de lo cual se concentró a sequedad. El material crudo se purificó por HPLC preparativa [fase inversa (Kinetex C18, 100 × 30 mm, 5 µm, 30 mL por min, gradiente de Solvente B en Solvente A: 40 % a 30 % de Solvente B (durante 10 min), 100 % de Solvente B (durante 2 min); Solvente A: agua que contiene TFA al 0,1 %. Solvente B: MeCN] para obtener el **Ejemplo 8**, 3'-((2-hidroxi-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)-N-(4-(2-metoxietoxi)bencil)-5'-(1H-tetrazol-5-il)-[1,1'-bifenil]-4-carboxamida (16 mg, 0,03 mmol, 46 % de rendimiento) como un sólido verde pálido. Datos disponibles en la Tabla 3.

Vía D

Procedimiento para la preparación del Ejemplo 15, 3-((5-(1H-tetrazol-5-il)-4'-(trifluorometil)-[1,1'-bifenil]-3-il)amino)-4-hidroxociclobut-3-eno-1,2-diona

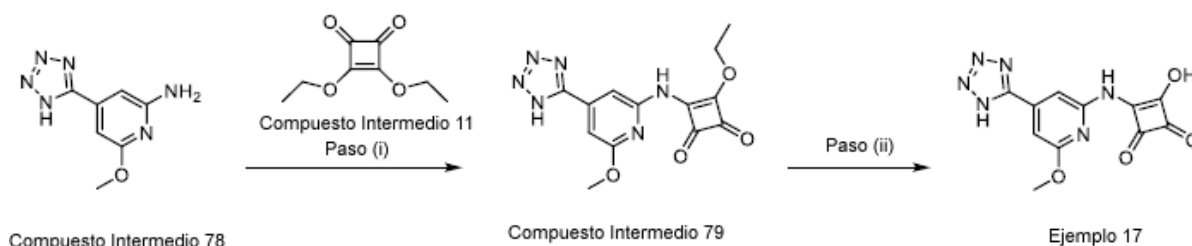


Paso (i): Se desgasificó una suspensión del **Compuesto Intermedio 31**, 3-((3-bromo-5-(1H-tetrazol-5-il)fenil) amino)-4-etoxiciclobut-3-eno-1,2-diona (0,50 g, 1,37 mmol), **Compuesto Intermedio 77**, 4,4,5,5-tetrametil-2-(4-(trifluorometil)fenil)-1,3,2-dioxaborolano (0,56 g, 2,06 mmol) y K₂CO₃ (0,38 g, 2,75 mmol) en MeCN (5 mL) y agua (5 mL) con N₂ durante 15 minutos. Se adicionó PdCl₂(dtbpf) (0,089g, 0,13mmol) y la mezcla se calentó a 100 °C bajo irradiación de microondas durante 1 hora. Después de este tiempo, los solventes se removieron bajo presión reducida y el material crudo se purificó por HPLC preparativa [fase inversa (puente X C18, 250 × 30 mm, 5 µm, 27 mL por min, gradiente de solvente B en solvente A: 10 % a 98 % de Solvente B (durante 59 min), 10 % de Solvente B (durante 2 min); Solvente A: NH₄HCO₃ 10 mM en agua. Solvente B: MeCN] para obtener el **Ejemplo 15**, 3-((5-

(1H-tetrazol-5-il)-4'-(trifluorometil)-[1,1'-bifenil]-3-il)amino)-4-hidroxiciclobut-3-eno-1,2-diona (0,35 g, 0,87 mmol, 64 % de rendimiento) como un sólido marrón. Datos disponibles en la Tabla 3.

Vía E

Procedimiento para la preparación del Ejemplo 17, 3-hidroxi-4-((6-metoxi-4-(1H-tetrazol-5-il)piridin-2-il)amino)ciclobut-3-eno-1,2-diona



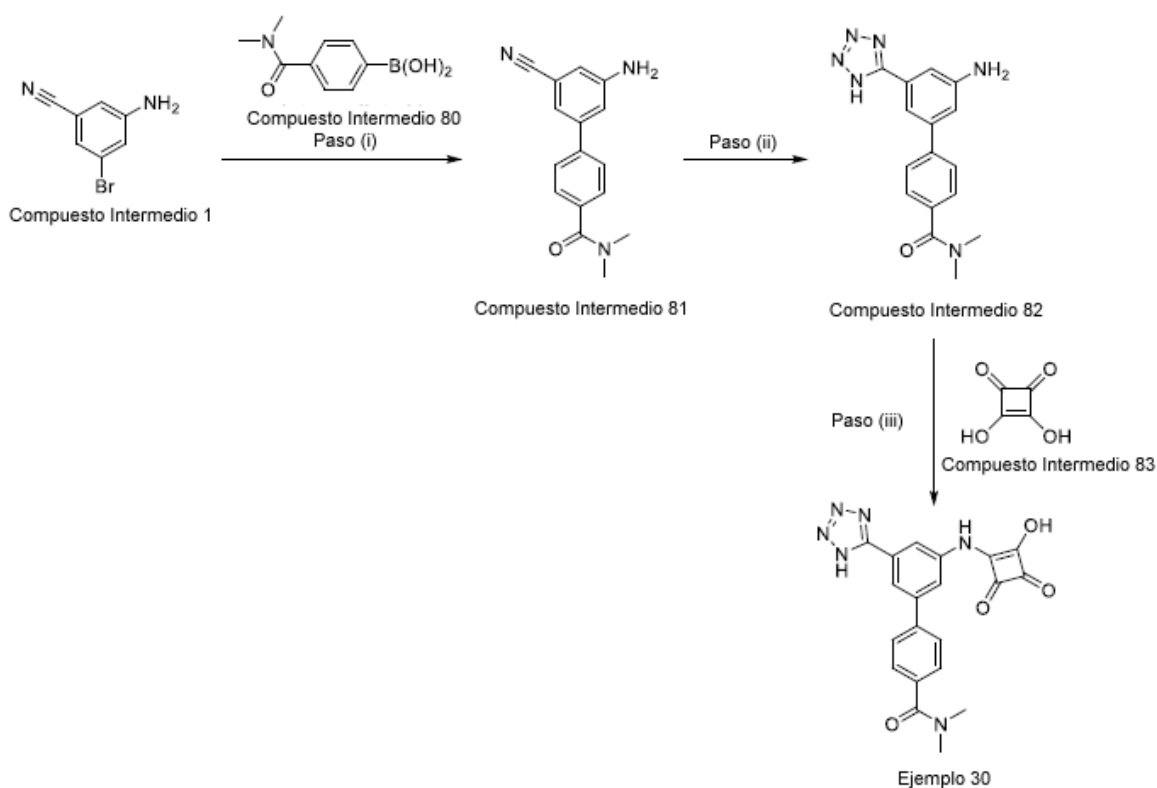
Paso (i): A una suspensión helada del **Compuesto Intermedio 78**, 6-metoxi-4-(1H-tetrazol-5-il)piridin-2-amina (510 mg, 2,56 mmol) en EtOH (10 mL) se adicionó TEA (1,00 mL, 7,69 mmol). La mezcla se agitó a la misma temperatura durante 15 minutos después de lo cual se adicionó gota a gota el **Compuesto Intermedio 11**, escuarato de dietilo (479 mg, 2,82 mmol) y la reacción se agitó a TA durante 16 horas. La mezcla se concentró y el residuo se dividió entre EtOAc y agua. Los orgánicos se removieron y la capa acuosa se acidificó a pH 1-2 usando HCl 1 N ac., y se agitó durante 30 minutos. El precipitado resultante se recolectó por filtración, que se lavó con agua con hielo y luego se secó bajo alto vacío para obtener el **Compuesto Intermedio 79**, 3-etoxi-4-((6-metoxi-4-(1H-tetrazol-5-il)piridin-2-il)amino)ciclobut-3-eno-1,2-diona (350 mg, 1,11 mmol, 43 % de rendimiento) como un sólido amarillo. Datos disponibles en la Tabla 2.

Paso (ii): Una suspensión del **Compuesto Intermedio 79**, 3-etoxi-4-((6-metoxi-4-(1H-tetrazol-5-il)piridin-2-il)amino)ciclobut-3-eno-1,2-diona (350 mg, 1,11 mmol) en THF (5,5 mL) y Se calentó HCl (0,55 mL) a 60 °C durante 24 horas, después de lo cual la mezcla se concentró a sequedad. El residuo se trituró a partir de EtOAc para obtener el **Ejemplo 17**, 3-hidroxi-4-((6-metoxi-4-(1H-tetrazol-5-il)piridin-2-il)amino)ciclobut-3-eno-1,2-diona (170 mg, 0,59 mmol, 53 % de rendimiento) como un sólido amarillo. Datos disponibles en la Tabla 3.

Vía F

Procedimiento para la preparación del Ejemplo 30, 3'-((2-hidroxi-3,4-

dioxociclobut-1-en-1-il)amino)-N,N-dimetil-5'-(1H-tetrazol-5-il)-[1,1'-bifenil]-4-carboxamida



Paso (i): Una solución del **Compuesto Intermedio 1**, 3-amino-5-bromobenzonitrilo (500 mg, 2,53 mmol), **Compuesto Intermedio 80**, ácido (4-(dimetilcarbamoil)fenil)borónico (587 mg, 3,04 mmol), K_2CO_3 (700 mg, 5,07 mmol) y $Pd(Ph_3P)_4$ (59 mg, 0,050 mmol) en 1,4-dioxano (8 mL) y agua (2 mL) se calentó a 90 °C durante 16 horas. La mezcla se enfrió y se dividió entre EtOAc y agua. Los orgánicos se separaron y la capa acuosa se lavó con EtOAc. Los orgánicos combinados se secaron sobre Na_2SO_4 y se concentraron. El material crudo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida (fase normal, sílice) bajo un gradiente de EtOAc (0 % a 16 %) en hexano para obtener el **Compuesto Intermedio 81**, 3'-amino-5'-ciano-N,N-dimetil-[1,1'-bifenil]-4-carboxamida (210 mg, 0,79 mmol, 31 % de rendimiento) como una goma marrón. Datos disponibles en la Tabla 2.

Paso (ii): Una solución del **Compuesto Intermedio 81**, 3'-amino-5'-ciano-N,N-dimetil-[1,1'-bifenil]-4-carboxamida (200 mg, 0,754 mmol), NaN_3 (79,9 mg, 1,50 mmol) y NH_4Cl (98 mg, 1,50 mmol) en DMF (2 mL) se calentó a 130 °C durante 16 horas. La mezcla se enfrió y acidificó a pH 1 con HCl 1 M (ac.). El precipitado resultante se recolectó por filtración y se purificó por HPLC preparativa [fase inversa (Sunfire C18, 250 × 19 mm, 5 μ m, 15 mL por min,

gradiente de Solvente B en Solvente A: 8 % a 25 % de Solvente B (durante 22 min), 22 % a 25 % de Solvente B (durante 5 min), 100 % de Solvente B (durante 2 min), 100 % a 8 % de Solvente B (durante 3 min); Solvente A: HCOOH al 0,1% en agua. Solvente B: MeCN] para obtener el **Compuesto Intermedio 82**, 3'-amino-N,N-dimetil-5'-(1H-tetrazol-5-il)-[1,1'-bifenil]-4-carboxamida (22 mg, 0,071 mmol, 9 % de rendimiento) como un sólido blanco. Datos disponibles en la Tabla 2.

Paso (iii): Una solución del **Compuesto Intermedio 82**, 3'-amino-N,N-dimetil-5'-(1H-tetrazol-5-il)-[1,1'-bifenil]-4-carboxamida (22 mg, 0,071 mmol) y el **Compuesto Intermedio 83**, ácido escuárico (8,1 mg, 0,071 mmol) en agua (1 mL) se calentó a 125 °C en un tubo sellado durante 6 horas. La mezcla se enfrió y el sólido se recolectó por filtración para obtener el **Ejemplo 30**, 3'-((2-hidroxi-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)-N,N-dimetil-5'-(1H-tetrazol-5-il)-[1,1'-bifenil]-4-carboxamida (10 mg, 0,025 mmol, 35 % de rendimiento) como un sólido amarillo. Datos disponibles en la Tabla 3.

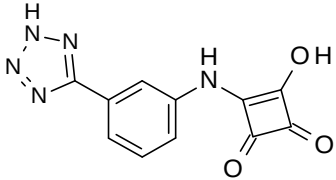
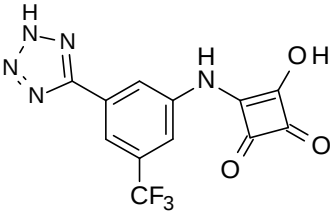
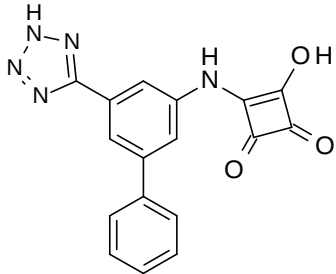
EJEMPLOS

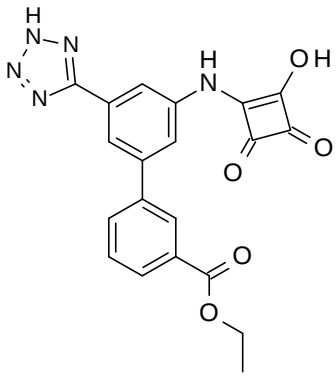
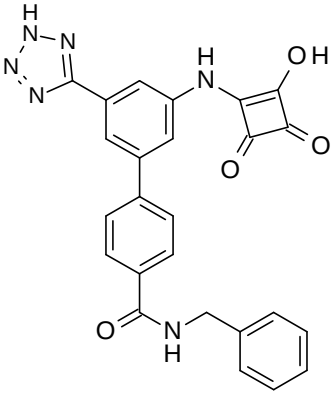
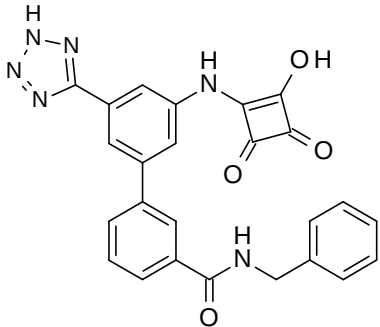
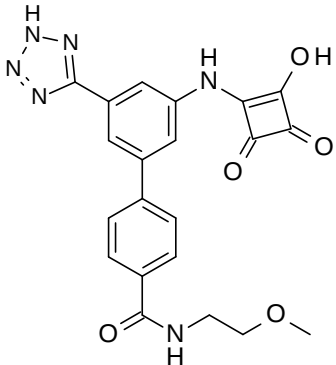
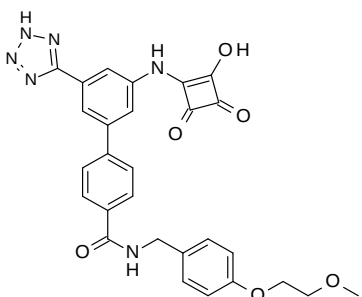
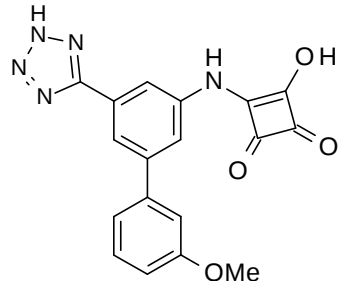
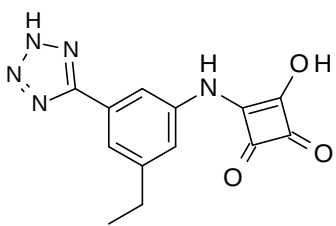
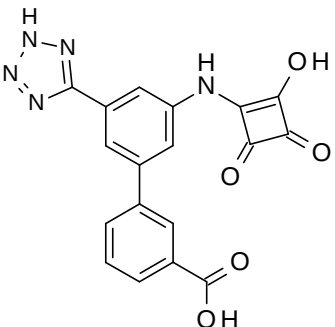
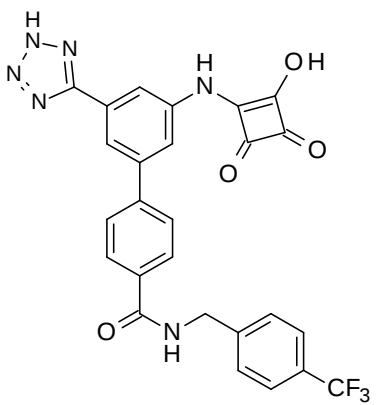
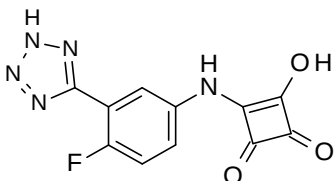
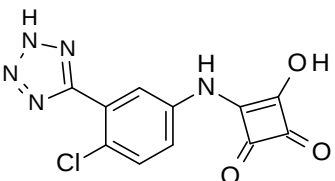
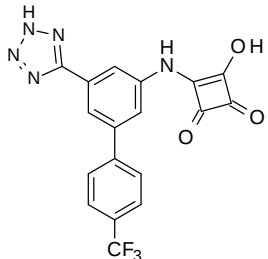
La invención ahora se ilustrará, pero no se limitará, por referencia a los siguientes ejemplos.

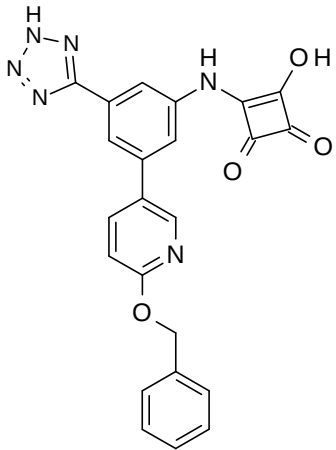
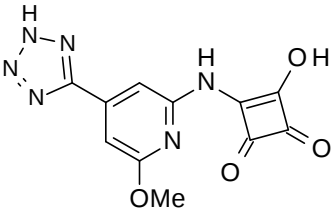
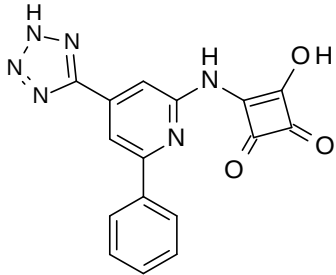
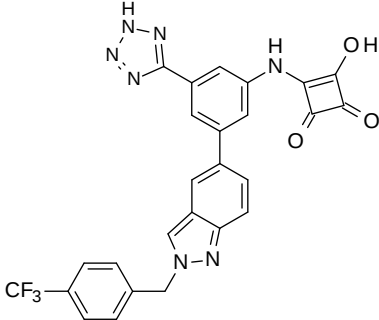
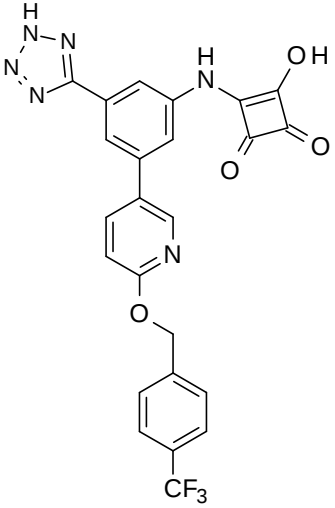
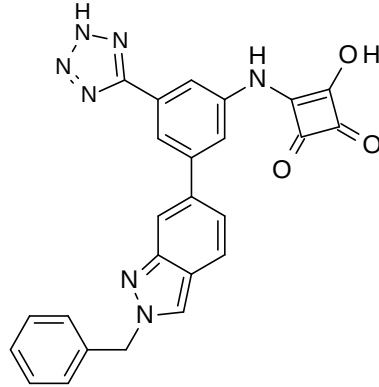
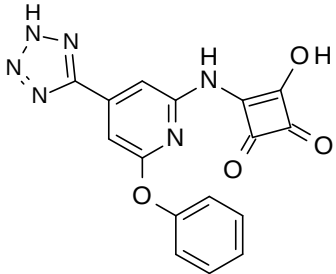
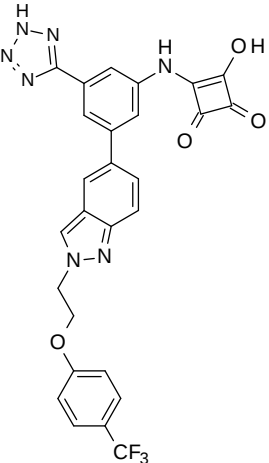
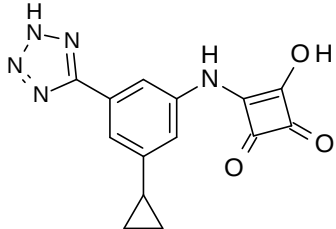
EJEMPLOS 1 A 31

Se han preparado los compuestos de los Ejemplos 1 a 31 que se muestran en la Tabla 1 a continuación. Sus propiedades de RMN y LCMS y los métodos usados para prepararlas se exponen en la Tabla 3. Los materiales de partida para cada uno de los Ejemplos se listan en la Tabla 2.

Tabla 1 – Compuestos de ejemplo

 Ejemplo 1	 Ejemplo 2	 Ejemplo 3
--	---	--

 Ejemplo 4	 Ejemplo 5	 Ejemplo 6
 Ejemplo 7	 Ejemplo 8	 Ejemplo 9
 Ejemplo 10	 Ejemplo 11	 Ejemplo 12
 Ejemplo 13	 Ejemplo 14	 Ejemplo 15

		
Ejemplo 16	Ejemplo 17	Ejemplo 18
		
Ejemplo 19	Ejemplo 20	Ejemplo 21
		
Ejemplo 22	Ejemplo 23	Ejemplo 24

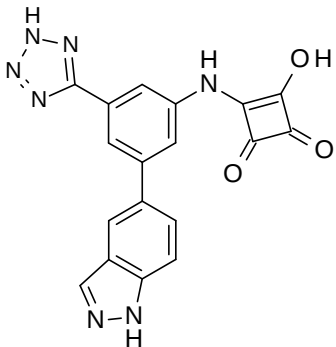
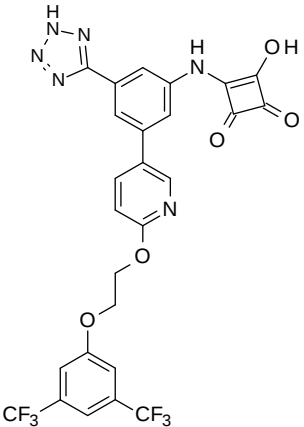
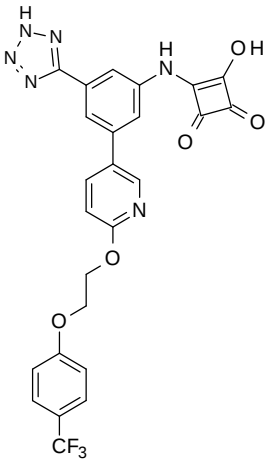
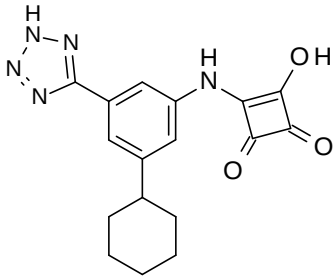
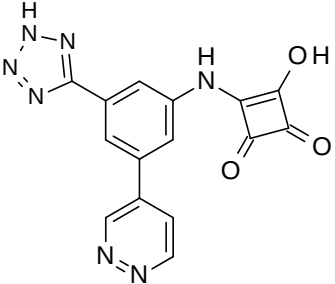
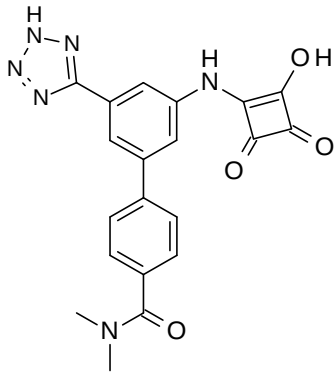
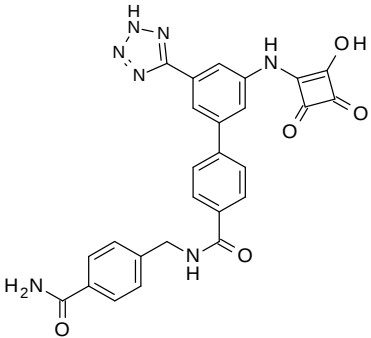
 Ejemplo 25	 Ejemplo 26	 Ejemplo 27
 Ejemplo 28	 Ejemplo 29	 Ejemplo 30
 Ejemplo 31		

Tabla 2 - Compuestos Intermedios

Tabla 2			
Compuesto Intermedio	Vía	Nombre	Datos
1		3-amino-5-bromobenzonitrilo	Comercialmente

			disponible, CAS: 49674-16-0
2		ácido fenilborónico	Comercialmente disponible, CAS: 98-80-6
3	Vía 1	5-amino-[1,1'-bifenil]-3-carbonitrilo	(LC/MS Método A): m/z 193 [M-H] ⁻ (ES ⁻), a 2,01 min, UV activo.
4	Vía 9, paso (i), Compuesto Intermedio 1 y 84	3'-amino-5'-ciano-[1,1'-bifenil]-3-carboxilato de etilo	(LC/MS Método B): m/z 267 [M+H] ⁺ (ES ⁺), a 1,36 min, UV activo.
5	Vía 2	3'-amino-5'-(1H-tetrazol-5-il)-[1,1'-bifenil]-3-carboxilato de etilo	(LC/MS Método C): m/z 308 [M-H] ⁻ (ES ⁻), a 1,17 min, UV activo.
6		ácido 4-(N-bencilaminocarbonil)fenilborónico	Comercialmente disponible, CAS: 252663-47-1
7		3-Bromo-5-nitrobenzonitrilo	Comercialmente disponible, CAS: 17601-94-4
8	Vía 3	N-bencil-3'-ciano-5'-nitro-[1,1'-bifenil]-4-carboxamida	(LC/MS Método A): m/z 356 [M-H] ⁻ (ES ⁻), a 2,26 min, UV activo.
9	Vía 3	N-bencil-4-[3-nitro-5-(1H-tetrazol-5-il)fenil]benzamida	(LC/MS Método A): m/z 399 [M-H] ⁻ (ES ⁻), a 1,50 min, UV activo.
10	Vía 3	4-[3-amino-5-(1H-tetrazol-5-il)fenil]-N-bencil-benzamida	(LC/MS Método A): m/z 369 [M-H] ⁻

			(ES ⁻), a 1,26 min, UV activo.
11		Escuarato de dietilo	Comercialmente disponible, CAS: 5231-87-8
12	Vía 3	N-bencil-3'-((2-etoxi-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)-5'-(1H-tetrazol-5-il)-[1,1'-bifenil]-4-carboxamida	(LC/MS Método A): m/z 493 [M-H] ⁻ (ES ⁻), a 1,43 min, UV activo.
13	Vía 9	ácido 3'-amino-5'-ciano-[1,1'-bifenil]-4-carboxílico	(LC/MS Método H): m/z 239 [M+H] ⁺ (ES ⁺), a 1,60 min, UV activo.
14		2-metoxietan-1-amina	Comercialmente disponible, CAS: 109-85-3
15	Vía 4	3'-amino-5'-ciano-N-(2-metoxietil)-[1,1'-bifenil]-4-carboxamida	(LC/MS Método A): m/z 294 [M-H] ⁻ (ES ⁻), a 1,74 min, UV activo.
16		5-amino-2-clorobenzonitrilo	Comercialmente disponible, CAS: 5922-60-1
17	Vía 5	4-cloro-3-(1H-tetrazol-5-il)anilina	(LC/MS Método F): m/z 213 [M+NH ₄] ⁺ (ES ⁺), a 0,42 min, UV activo.
18		(2-ciclopropil-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolano)	Comercialmente disponible, CAS: 126689-01-8
19	Vía 6	3-ciclopropil-5-nitrobenzonitrilo	(400 MHz, DMSO-d ₆) δ: 0,88–0,95

			(m, 2H), 1,07–1,16 (m, 2H), 2,16–2,26 (m, 1H), 7,99–8,02 (m, 1H), 8,24–8,26 (m, 1H), 8,46–8,48 (m, 1H).
20	Vía 6	3-amino-5-ciclopropilbenzonitrilo	(LC/MS Método G): m/z 159 [M+H] ⁺ (ES ⁺), a 2,04 min, UV activo.
21	Vía 6	3-ciclopropil-5-(1H-tetrazol-5-il)anilina	(LC/MS Método G): m/z 202 [M+H] ⁺ (ES ⁺), a 1,47 min, UV activo.
22	Vía 6, paso (i), compuestos intermedios 7 y 85	5-nitro-2',3',4',5'-tetrahidro-[1,1'-bifenil]-3-carbonitrilo	(400 MHz, DMSO-d ₆) δ: 1,56–1,65 (m, 2H), 1,69–1,78 (m, 2H), 2,19–2,28 (m, 2H), 2,37–2,46 (m, 2H), 6,51–6,58 (m, 1H), 8,33–8,36 (m, 1H), 8,39–8,42 (m, 1H), 8,56–8,59 (m, 1H)
23	Vía 7	3-amino-5-ciclohexilbenzonitrilo	(LC/MS Método G): m/z 201 [M+H] ⁺ (ES ⁺), a 2,59 min, UV activo.

24		4-(tributylestannil)piridazina	Comercialmente disponible, CAS: 194865-89-9
25	Vía 8	3-nitro-5-(piridazin-4-il)benzonitrilo	(LC/MS Método G): m/z 227 [M+H] ⁺ (ES ⁺), a 1,66 min, UV activo.
26		ácido(4-(etoxicarbonil)fenil)borónico	Comercialmente disponible, CAS: 4334-88-7
27	Vía 9	3'-amino-5'-ciano-[1,1'-bifenil]-4-carboxilato de etilo	(LC/MS Método H): m/z 267 [M+H] ⁺ (ES ⁺), a 2,07 min, UV activo.
28	Vía 9	ácido 3'-amino-5'-(1H-tetrazol-5-il)-[1,1'-bifenil]-4-carboxílico	(LC/MS Método H): m/z 282 [M+H] ⁺ (ES ⁺), a 1,42 min, UV activo.
29	Vía 9	ácido 3'-((2-etoxi-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)-5'-(1H-tetrazol-5-il)-[1,1'-bifenil]-4-carboxílico	(LC/MS Método I): m/z 406 [M+H] ⁺ (ES ⁺), a 1,61 min, UV activo.
30	Vía 10	3-bromo-5-(1H-tetrazol-5-il)anilina	(LC/MS Método K): m/z 242 [M+H] ⁺ (ES ⁺), a 2,94 min, UV activo.
31	Vía 10	3-((3-bromo-5-(1H-tetrazol-5-il)fenil)amino)-4-etoxiciclobut-3-eno-1,2-diona	(LC/MS Método K): m/z 381 [M+NH ₄] ⁺ (ES ⁺), a 3,89 min, UV

			activo.
32		5-bromo-2-fluoropiridina	Comercialmente disponible, CAS: 766-11-0
33		[4-(trifluorometil)fenil]metanol	Comercialmente disponible, CAS: 349-95-1
34	Vía 11	(5-bromo-2-((4-(trifluorometil)bencil)oxi)piridina)	(LC/MS Método G): m/z 331 [M+H] ⁺ (ES ⁺), a 2,98 min, UV activo.
35	Vía 11	(5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-2-((4-(trifluorometil)bencil)oxi)piridina)	(LC/MS Método G): m/z 381 [M+H] ⁺ (ES ⁺), a 3,15 min, UV activo.
36		5-bromo-2-nitrobenzaldehído	Comercialmente disponible, CAS: 20357-20-4
37		bencilamina	Comercialmente disponible, CAS: 100-46-9
38	Vía 12	N-bencil-1-(5-bromo-2-nitrofenil)metanimina	(LC/MS Método K): m/z 320 [M+H] ⁺ (ES ⁺), a 4,87 min, UV activo.
39	Vía 12	2-bencil-5-bromo-2H-indazol	(LC/MS Método G): m/z 288 [M+H] ⁺ (ES ⁺), a 2,45 min, UV activo.
40	Vía 12	2-bencil-5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-2H-indazol	(LC/MS Método G): m/z 335

			[M+H] ⁺ (ES ⁺), a 2,75 min, UV activo.
41		4-(trifluorometil)fenol	Comercialmente disponible, CAS: 402-45-9
42		(2-bromoetil)carbamato de terc-butilo	Comercialmente disponible, CAS: 39684-80-5
43	Vía 13	(2-(4-(trifluorometil)fenoxi)etil)carbamato de terc-butilo	(LC/MS Método A): m/z 206 [M+H-Boc] ⁺ (ES ⁺), a 2,42 min, UV activo
44	Vía 13	2-(4-(trifluorometil)fenoxi)etan-1-amina, sal de clorhidrato	(LC/MS Método A): m/z 206 [M+H-Boc] ⁺ (ES ⁺), a 1,92 min, UV activo
45		3,5-bis(trifluorometil)fenol	Comercialmente disponible, CAS: 349-58-6
46		2-bromoetan-1-ol	Comercialmente disponible, CAS: 540-51-2
47	Vía 14	2-(3, 5-bis (trifluorometil)fenoxi)etan-1-ol	(LC/MS Método G): m/z 275 [M+H] ⁺ (ES ⁺), a 2,31 min, UV activo.
48	Vía 14	2-(2-(3,5-bis(trifluorometil)fenoxi)etoxi)-5-bromopiridina	(LC/MS Método G): m/z 431 [M+H] ⁺ (ES ⁺), a 3,20 min, UV activo.
49		2-((terc-butildimetilsilil)oxi)etan-1-ol	Comercialmente disponible,

			CAS: 102229-10-7
50	Vía 15	terc-butildimetil(2-(4-(trifluorometil)fenoxi)etoxi)silano	RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz): δ (ppm) 0,12 (s, 6H), 0,93 (s, 9H), 3,98 – 4,03 (m, 2H), 4,08 – 4,12 (m, 2H), 6,99 (d, J=8,4 Hz, 2H), 7,56 (d, J=8,2 Hz, 1H).
51	Vía 15	2-(4-(trifluorometil)fenoxi)etan-1-ol	(LC/MS Método A): m/z 207 [M+H-Boc] ⁺ (ES ⁺), a 2,09 min, UV activo
52		ácido 4-boronobenzoico	Comercialmente disponible, CAS: 14047-29-1
53		4-(aminometil) benzamida	Comercialmente disponible, CAS: 369-53-9
54	Vía 16	ácido (4-((4-carbamoylbencil)carbamoyl)fenil)borónico	(LC/MS Método H): m/z 299 [M+H] ⁺ (ES ⁺), a 1,24 min, UV activo.
55		2,6-dicloroisonicotinonitrilo	Comercialmente disponible, CAS: 32710-65-9
56		Fenol	Comercialmente disponible, CAS: 108-95-2
57	Vía 17	2-cloro-6-fenoxiisonicotinonitrilo	(LC/MS Método L): m/z 231 [M+H] ⁺ (ES ⁺), a

			3,61 min, UV activo.
58		4-metoxibencilamina	Comercialmente disponible, CAS: 2393-23-9
59	Vía 17	2-((4-metoxibencil)amino)-6-fenoxiisonicotinonitrilo	(LC/MS Método L): m/z 332 [M+H] ⁺ (ES ⁺), a 3,95 min, UV activo.
60	Vía 17	N-(4-metoxibencil)-6-fenoxi-4-(1H-tetrazol-5-il)piridin-2-amina	(LC/MS Método L): m/z 375 [M+H] ⁺ (ES ⁺), a 3,35 min, UV activo.
61	Vía 18	6-fenoxi-4-(1H-tetrazol-5-il)piridin-2-amina	(LC/MS Método L): m/z 255 [M+H] ⁺ (ES ⁺), a 2,08 min, UV activo.
62	Vía 19	2-cloro-6-((4-metoxibencil)amino)isonicotinonitrilo	(LC/MS Método L): m/z 274 [M+H] ⁺ (ES ⁺), a 3,65 min, UV activo.
63	Vía 19	6-cloro-N-(4-metoxibencil)-4-(1H-tetrazol-5-il)piridin-2-amina	(LC/MS Método L): m/z 317 [M+H] ⁺ (ES ⁺), a 3,05 min, UV activo.
64	Vía 20	6-metoxi-N-(4-metoxibencil)-4-(1H-tetrazol-5-il)piridin-2-amina	(LC/MS Método L): m/z 313 [M+H] ⁺ (ES ⁺), a 2,80 min, UV activo.

65	Vía 21	N-(4-metoxibencil)-6-fenil-4-(1H-tetrazol-5-il)piridin-2-amina	(LC/MS Método L): m/z 359 [M+H] ⁺ (ES ⁺), a 2,77 min, UV activo.
66		4,4,5,5-tetrametil-2-vinil-1,3,2-dioxaborolano	Comercialmente disponible, CAS: 75927-49-0
67	Vía 22	3-amino-5-vinilbenzonitrilo	(LC/MS Método A): m/z 143 [M-H] ⁻ (ES ⁺), a 1,68 min, UV activo.
68		cloroformiato de bencílo	Comercialmente disponible, CAS: 501-53-1
69	Vía 22	(3-ciano-5-vinilfenil)carbamato de bencilo	(LC/MS Método B): m/z 279 [M-H] ⁻ (ES ⁺), a 1,50 min, UV activo
70	Vía 22	(3-(1H-tetrazol-5-il)-5-vinilfenil)carbamato de bencilo	(LC/MS Método C): m/z 320 [M-H] ⁻ (ES ⁺), a 1,29 min, UV activo.
71	Vía 22	3-etoxi-4-((3-etil-5-(1H-tetrazol-5-il)fenil)amino)ciclobut-3-eno-1,2-diona	(LC/MS Método C): m/z 312 [M-H] ⁻ (ES ⁺), a 1,14 min, UV activo.
72		3-amino-5-(trifluorometil)benzonitrilo	Comercialmente disponible, CAS: 49674-28-4
73	Vía A	3-(1H-tetrazol-5-il)-5-(trifluorometil)anilina	(LC/MS Método C): m/z 227 [M-H] ⁻ (ES ⁻), a 1,01 min, UV activo.
74	Vía A	3-((3-(1H-tetrazol-5-il)-5-	(LC/MS Método

		(trifluorometil)fenil)amino)-4- etoxiciclobut-3-eno-1,2-diona	C): m/z 351 [M-H] ⁻ (ES ⁻), a 1,28 min, UV activo.
75		(4-(2-metoxietoxi)fenil)metanamina	Comercialmente disponible, CAS: 102196-20- 3
76	Vía C	3'-((2-etoxi-3,4-dioxociclobut-1-en-1- il)amino)-N-(4-(2-metoxietoxi)bencil)-5'- (1H-tetrazol-5-il)-[1,1'-bifenil]-4- carboxamida	(LC/MS Método C): m/z 567 [M-H] ⁻ (ES ⁻), a 1,25 min, UV activo.
77		4,4,5,5-tetrametil-2-(4- (trifluorometil)fenil)-1,3,2-dioxaborolano	Comercialmente disponible, CAS: 214360-65- 3
78	Vía 18, Compuesto Intermedio 64	6-metoxi-4-(1H-tetrazol-5-il)piridin-2- amina	(LC/MS Método L): m/z 193 [M+H] ⁺ (ES ⁺), a 1,01 min, UV activo.
79	Vía E	3-etoxi-4-((6-metoxi-4-(1H-tetrazol-5- il)piridin-2-il)amino)ciclobut-3-eno-1,2- diona	(LC/MS Método L): m/z 317 [M+H] ⁺ (ES ⁺), a 2,19 min, UV activo.
80		ácido (4-(dimetilcarbamoil)fenil)borónico	Comercialmente disponible, CAS: 405520-68- 5
81	Vía F	3'-amino-5'-ciano-N,N-dimetil-[1,1'- bifenil]-4-carboxamida	(LC/MS Método H): m/z 266 [M+H] ⁺ (ES ⁺), a 1,43 min, UV activo.
82	Vía F	3'-amino-N,N-dimetil-5'-(1H-tetrazol-5-	(LC/MS Método

		il)-[1,1'-bifenil]-4-carboxamida	H): m/z 309 [M+H] ⁺ (ES ⁺), a 1,40 min, UV activo.
83		ácido escuárico	Comercialmente disponible, CAS: 2892-51-5
84		ácido 3-etoxicarbonilfenilborónico	Comercialmente disponible, CAS: 4334-87-6
85		2-(1-ciclohexenil)-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolano	Comercialmente disponible, CAS: 141091-37-4
86		5-(3-aminofenil)tetrazol	Comercialmente disponible, CAS: 73732-51-1
87	Vía 9, Compuestos Intermedios 1 y 84	ácido 3'-((2-etoxi-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)-5'-(1H-tetrazol-5-il)-[1,1'-bifenil]-3-carboxílico	(LC/MS Método C): m/z 406 [M-H] ⁻ (ES ⁻), a 1,08 min, UV activo.
88	Vía 2, compuesto intermedio 15	3'-amino-N-(2-metoxietil)-5'-(1H-tetrazol-5-il)-[1,1'-bifenil]-4-carboxamida	(LC/MS Método A): m/z 337 [M-H] ⁻ (ES ⁻), a 1,54 min, UV activo.
89		3-Metoxifenilborónico	Comercialmente disponible, CAS: 10365-98-7
90		4-(trifluorometil)bencilamina	Comercialmente disponible, CAS: 3300-51-4
91	Vía 5, compuesto intermedio 92	4-fluoro-3-(1H-tetrazol-5-il)anilina	(LC/MS Método F): m/z no se alinea con la estructura, a 0,69

			min, UV activo.
92		5-amino-2-fluorobenzonitrilo	Comercialmente disponible, CAS: 53312-81-5
93		2-(benciloxi)-5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)piridina	Comercialmente disponible, CAS: 832735-54-3
94	Vía 18, Compuesto Intermedio 65	6-fenil-4-(1H-tetrazol-5-il) piridin-2-amina	(LC/MS Método L): m/z 239 [M+H] ⁺ (ES ⁺), a 1,32 min, UV activo.
95	Vía 12, Compuestos Intermedios 36 y 90	5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-2-(4-(trifluorometil)bencil)-2H-indazol	(LC/MS Método G): m/z 403 [M+H] ⁺ (ES ⁺), a 2,83 min, UV activo.
96	Vía 12, Compuestos Intermedios 36 y 44	5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-2-(2-(4-(trifluorometil)fenoxi)etil)-2H-indazol	(LC/MS Método G): m/z 433 [M+H] ⁺ (ES ⁺), a 2,94 min, UV activo.
97		5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-indazol	Comercialmente disponible, CAS: 862723-42-0
98	Vía 11, paso (ii), Compuesto Intermedio 48	2-(2-(3,5-bis(trifluorometil)fenoxi)etoxi)-5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il) piridina	(LC/MS Método G): m/z 478 [M+H] ⁺ (ES ⁺), a 3,42 min, UV activo (éster borónico); m/z 396 [M+H] ⁺ (ES ⁺), a 2,54 min, UV

			activo (ácido borónico)
99	Vía 11, paso (ii), Compuesto Intermedio 100	ácido (6-(2-(4-(trifluorometil)fenoxi)etoxi)piridin-3-il)borónico	(LC/MS Método G): m/z 328 [M+H] ⁺ (ES ⁺), a 2,32 min, UV activo.
100	Vía 14, paso (ii), Compuestos Intermedios 32 y 51	5-bromo-2-(2-(4-(trifluorometil)fenoxi)etoxi)piridina	(LC/MS Método G): m/z 363 [M+H] ⁺ (ES ⁺), a 3,01 min, UV activo.
101	Vía 6, Paso (iii), Compuesto Intermedio 23	3-ciclohexil-5-(1H-tetrazol-5-il)anilina	(LC/MS Método G): m/z 244 [M+H] ⁺ (ES ⁺), a 2,02 min, UV activo.
102	Vía 6, pasos (ii)-(iii), Compuesto Intermedio 25	3-(piridazin-4-il)-5-(1H-tetrazol-5-il)anilina	(LC/MS Método G): m/z 240 [M+H] ⁺ (ES ⁺), a 1,23 min, UV activo.

Tabla 3 – Compuestos de ejemplo

Tabla 3						
Ej. No.	Nombre	Compuesto Intermedio	Método sintético	¹H RMN	Método LCM S	Datos de LCMS
1	3-((3-(1H-tetrazol-5-il)fenil)amino)-4-hidroxiciclobut-3-eno-1,2-diona	86 y 11	Vía A, pasos (ii)-(iii)	(400 MHz, DMSO-d ₆) δ: 7,50-7,54 (m, 1H),	D	m/z 255 (M-H) ⁻ (ES ⁻)

				7,59-7,61 (m, 1H), 7,66-7,69 (m, 1H), 8,09-8,10 (m, 1H), 10,49 (s, 1H). <i>No se observaron dos protones ácidos.</i>		a 1,19 min, UV activo
2	3-((3-(1H-tetrazol-5-il)-5-(trifluorometil)fenil)amino)-4-hidroxiciclobut-3-eno-1,2-diona	72	Vía A	(400 MHz, DMSO-d ₆) δ: 7,85 (s, 1H), 8,20 (s, 1H), 8,37 (s, 1H), 10,54 (s, 1H). <i>No se observaron dos protones ácidos.</i>	D	m/z 324 (M-H) ⁻ (ES ⁻) a 2,12 min, UV activo
3	3-((5-(1H-tetrazol-5-il)-[1,1'-bifenil]-3-il)amino)-4-hidroxiciclobut-3-eno-1,2-diona	3	Vía A	(400 MHz, DMSO-d ₆) δ: 7,41-7,45 (m, 1H), 7,51-7,55 (m, 2H), 7,74-7,77 (m, 2H), 9,97-9,98 (m, 1H), 8,02-8,03 (m, 1H), 8,05-8,06 (m, 1H),	D	m/z 331 (M-H) ⁻ (ES ⁻) a 2,41 min, UV activo

				10,70 (s, 1H). No se observaron dos protones ácidos.		
4	3'-((2-hidroxi-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)-5'-(1H-tetrazol-5-il)-[1,1'-bifenil]-3-carboxilato de etilo	5 y 11	Vía A, pasos (ii)-(iii)	(400 MHz, DMSO-d ₆) δ: 1,35 (t, J = 7,1 Hz, 3H), 4,37 (q, J = 7,1 Hz, 2H), 7,67-7,71 (m, 1H), 7,95-7,96 (m, 1H), 8,00-8,05 (m, 2H), 8,11-8,12 (m, 1H), 8,14-8,15 (m, 1H), 8,32-8,33 (m, 1H), 10,51 (s, 1H). No se observaron dos protones ácidos.	D	m/z 404 (M-H) ⁻ (ES ⁻) a 2,74 min, UV activo
5	N-bencil-3'-((2-hidroxi-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)-5'-(1H-tetrazol-5-il)-[1,1'-bifenil]-4-carboxamida	12	Vía B	(400 MHz, DMSO-d ₆) δ: 4,51 (d, J = 6,0 Hz, 2H), 7,20-7,27 (m, 1H), 7,30-7,36	D	m/z 465 (M-H) ⁻ (ES ⁻) a 2,65 min, UV

				(m, 4H), 7,87 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H), 8,02–8,07 (m, 3H), 8,07–8,12 (m, 2H), 9,14 (t, $J = 6,0$ Hz, 1H), 10,74 (s, 1H). No se observaron dos protones ácidos.		activo
6	N-bencil-3'-((2-hidroxi-3,4- dioxociclobut-1-en-1- il)amino)-5'-(1H-tetrazol-5- il)-[1,1'-bifenil]-3- carboxamida	87 y 37	Vía C	(400 MHz, DMSO- d_6) δ : 4,51 (d, $J =$ 5,9 Hz, 2H), 7,20-7,25 (m, 1H), 7,30-7,35 (m, 4H), 7,60-7,64 (m, 1H), 7,90-7,95 (m, 3H), 8,08-8,09 (m, 1H), 8,15-8,16 (m, 1H), 8,27-8,28 (m, 1H), 9,17 (t, $J = 5,9$ Hz, 1H), 10,38 (s, 1H). No	D	m/z 465 (M-H) ⁻ (ES) ⁻ a 2,70 min, UV activo

				se observaron dos protones ácidos.		
7	3'-((2-hidroxi-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)-N-(2-metoxietil)-5'-(1H-tetrazol-5-il)-[1,1'-bifenil]-4-carboxamida	88 y 11	Vía A, pasos (ii)-(iii)	(400 MHz, DMSO-d ₆) δ: 3,23–3,29 (m, 3H), 3,45 (m, 4H), 7,81–7,88 (m, 2H), 7,90 (s, 1H), 7,96–7,99 (m, 2H), 8,07 (s, 1H), 8,27 (s, 1H), 8,56–8,63 (m, 1H), 10,24 (s, 1H). No se observaron dos protones ácidos.	D	m/z 433 (M-H) ⁻ (ES ⁻) a 2,08 min, UV activo
8	3'-((2-hidroxi-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)-N-(4-(2-metoxietoxi)bencil)-5'-(1H-tetrazol-5-il)-[1,1'-bifenil]-4-carboxamida	29 y 75	Vía C	(400 MHz, DMSO-d ₆) δ: 3,27–3,28 (m, 3H), 3,60–3,64 (m, 2H), 4,02–4,06 (m, 2H), 4,42 (d, J = 5,9 Hz, 2H), 6,89 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 7,24	D	m/z 539 (M-H) ⁻ (ES ⁻) a 2,72 min, UV activo

				(d, $J = 8,5$ Hz, 2H), 7,85 (d, $J = 8,3$ Hz, 2H), 7,93 (s, 1H), 8,02 (d, $J = 8,3$ Hz, 2H), 8,07 (s, 1H), 8,23 (s, 1H), 9,05 (t, $J = 5,9$ Hz, 1H), 10,35 (s, 1H). No se observaron dos protones ácidos.		
9	3-hidroxi-4-((3'-metoxi-5-(1H-tetrazol-5-il)-[1,1'-bifenil]-3-il)amino)ciclobut-3-eno-1,2-diona	31 y 89	Vía D	(400 MHz, DMSO- d_6) δ : 3,84 (s, 3H), 6,96-7,02 (m, 1H), 7,32-7,35 (m, 2H), 7,41-7,45 (m, 1H), 7,91-7,92 (m, 1H), 8,03-8,04 (m, 1H), 8,13-8,14 (m, 1H), 10,49 (s, 1H). No se observaron dos protones	D	m/z 362 (M-H) ⁻ (ES ⁻) a 2,51 min, UV activo

				<i>ácidos.</i>		
10	3-((3-etil-5-(1H-tetrazol-5-il)fenil)amino)-4-hidroxiciclobut-3-eno-1,2-diona	71	Vía A, paso (iii)	(400 MHz, DMSO-d ₆) δ: 1,23 (t, J = 7,3 Hz, 3H), 2,66 (q, J = 7,3 Hz, 2H), 7,50 (s, 1H), 7,54-7,55 (m, 1H), 7,88-7,90 (m, 1H), 10,46 (s, 1H). <i>No se observaron dos protones ácidos.</i>	D	m/z 284 (M-H) ⁻ (ES ⁻) a 1,97 min, UV activo
11	ácido 3'-((2-hidroxi-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)-5'-(1H-tetrazol-5-il)-[1,1'-bifenil]-3-carboxílico	87	Vía A, paso (iii)	(400 MHz, DMSO-d ₆) δ: 7,59-7,71 (m, 1H), 7,91-7,96 (m, 1H), 7,97-8,03 (m, 2H), 8,08-8,12 (m, 1H), 8,14-8,21 (m, 1H), 8,34 (s, 1H), 10,40 (s, 1H). <i>No se observaron tres protones ácidos.</i>	D	m/z 376 (M-H) ⁻ (ES ⁻) a 2,09 min, UV activo

12	3'-((2-hidroxi-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)-5'-(1H-tetrazol-5-il)-N-(4-(trifluorometil)bencil)-[1,1'-bifenil]-4-carboxamida	29 y 90	Vía C	(400 MHz, DMSO-d ₆) δ: 4,61 (d, <i>J</i> = 6,1 Hz, 2H), 7,58 (d, <i>J</i> = 8,1 Hz, 2H), 7,72 (d, <i>J</i> = 8,1 Hz, 2H), 7,81 (s, 1H), 7,90 (d, <i>J</i> = 8,2 Hz, 2H), 8,01–8,08 (m, 3H), 8,50 (s, 1H), 9,26 (t, <i>J</i> = 6,1 Hz, 1H), 9,65 (s, 1H). <i>No se observaron dos protones ácidos.</i>	E	m/z 533 (M-H) ⁻ (ES ⁻) a 1,68 min, UV activo
13	3-((4-fluoro-3-(1H-tetrazol-5-il)fenil)amino)-4-hidroxiciclobut-3-eno-1,2-diona	91 y 11	Vía A, pasos (ii)-(iii)	(400 MHz, DMSO-d ₆) δ: 7,24-7,35 (m, 1H), 7,64-7,73 (m, 1H), 8,07-8,16 (m, 1H), 10,62 (s, 1H). <i>No se observaron dos protones ácidos.</i>	F	m/z 276 (M+H) ⁺ (ES ⁺) a 0,69 min, UV activo
14	3-((4-cloro-3-(1H-tetrazol-5-il)fenil)amino)-4-	17 y 11	Vía A, pasos	(400 MHz, DMSO-d ₆) δ:	F	m/z 290

	hidroxiciclobut-3-eno-1,2-diona		(ii)-(iii)	7,61-7,75 (m, 2H), 7,88 (s, 1H), 10,60 (s, 1H). No se observaron dos protones ácidos.		(M-H) ⁻ (ES ⁻) a 0,78 min, UV activo
15	3-((5-(1H-tetrazol-5-il)-4'-(trifluorometil)-[1,1'-bifenil]-3-il)amino)-4-hidroxiciclobut-3-eno-1,2-diona	31 y 77	Vía D	(400 MHz, DMSO-d ₆) δ: 7,80-7,83 (m, 1H), 7,87 (d, J = 8,2 Hz, 2H), 7,99 (d, J = 8,2 Hz, 2H), 8,03-8,05 (m, 1H), 8,38-8,45 (m, 1H), 9,63 (s, 1H). No se observaron dos protones ácidos. Señal de amonio observada a 6,95-7,20 ppm.	K	m/z 402 (M+H) ⁺ (ES ⁺) a 3,79 min, UV activo
16	3-((3-(6-(benciloxi)piridin-3-il)-5-(1H-tetrazol-5-il)fenil)amino)-4-hidroxiciclobut-3-eno-1,2-diona	31 y 93	Vía D	(400 MHz, DMSO-d ₆) δ: 5,43 (s, 2H), 7,04 (d, J = 8,6 Hz, 1H),	K	m/z 441 (M+H) ⁺ (ES ⁺) a 3,93

				7,29-7,37 (m, 1H), 7,37-7,43 (m, 2H), 7,48-7,52 (m, 2H), 7,70-7,74 (m, 1H), 7,97-8,00 (m, 1H), 8,12 (dd, $J = 2,6$, 8,6 Hz, 1H), 8,36-8,46 (m, 1H), 8,59 (d, $J = 2,6$ Hz, 1H), 9,64 (s, 1H). No se observaron dos protones ácidos. Señal de amonio observada a 6,95-7,20 ppm.		min, UV activo
17	3-hidroxi-4-((6-metoxi-4-(1H-tetrazol-5-il)piridin-2-il)amino)ciclobut-3-eno-1,2-diona	78 y 11	Vía E	(400 MHz, DMSO-d_6) δ: 3,98 (s, 3H), 7,11 (d, $J = 1,2$ Hz, 1H), 7,56 (d, $J = 1,2$ Hz, 1H), 11,16 (s, 1H). No se	L	m/z 289 (M+H) ⁺ (ES ⁺) a 1,66 min, UV activo

				<i>observaron dos protones ácidos.</i>		
18	3-hidroxi-4-((6-fenil-4-(1H-tetrazol-5-il)piridin-2-il)amino)ciclobut-3-eno-1,2-diona	94 y 11	Vía E	(400 MHz, DMSO-d ₆) δ: 7,51-7,69 (m, 3H), 7,97 (d, J = 1,3 Hz, 1H), 8,01-8,04 (m, 2H), 8,05 (d, J = 1,3 Hz, 1H), 11,63 (s, 1H). <i>No se observaron dos protones ácidos.</i>	L	m/z 333 (M-H) ⁻ (ES ⁻) a 1,89 min, UV activo
19	3-((3-(1H-tetrazol-5-il)-5-(2-(4-(trifluorometil)bencil)-2H-indazol-5-il)fenil)amino)-4-hidroxiciclobut-3-eno-1,2-diona	31 y 95	Vía D	(400 MHz, DMSO-d ₆) δ: 5,82 (s, 2H), 7,47-7,56 (m, 2H), 7,68-7,79 (m, 4H), 7,81 (s, 1H), 8,01 (s, 1H), 8,13 (s, 1H), 8,42 (s, 1H), 8,69 (s, 1H), 9,64 (s, 1H). <i>No se observaron dos protones ácidos.</i>	K	m/z 532 (M+H) ⁺ (ES ⁺) a 4,42 min, UV activo

20	3-((3-(1H-tetrazol-5-il)-5-(6-((4-(trifluorometil)bencil)oxi)piridin-3-il)fenil)amino)-4-hidroxiciclobut-3-eno-1,2-diona	31 y 35	Vía D	(400 MHz, DMSO-d ₆) δ: 5,55 (s, 2H), 7,06 (d, <i>J</i> = 8,7 Hz, 1H), 7,70-7,75 (m, 3H), 7,77 (d, <i>J</i> = 8,3 Hz, 2H), 7,84-7,89 (m, 1H), 8,12 (dd, <i>J</i> = 2,5, 8,7 Hz, 1H), 8,24-8,32 (m, 1H), 8,55 (d, <i>J</i> = 2,5 Hz, 1H), 9,45 (s, 1H). No se observaron dos protones ácidos.	K	m/z 509 (M+H) ⁺ (ES ⁺) a 4,13 min, UV activo
21	3-((3-(2-bencil-2H-indazol-5-il)-5-(1H-tetrazol-5-il)fenil)amino)-4-hidroxiciclobut-3-eno-1,2-diona	31 y 40	Vía D	(400 MHz, DMSO-d ₆) δ: 5,69 (s, 2H), 7,24-7,59 (m, 5H), 7,69-7,74 (m, 2H), 7,79 (s, 1H), 7,98 (s, 1H), 8,10 (s, 1H), 8,38 (s, 1H), 8,62 (s, 1H), 9,59 (s, 1H). No	K	m/z 464 (M+H) ⁺ (ES ⁺) a 3,62 min, UV activo

				se observaron dos protones ácidos. Señal de amonio observada a 6,95-7,20 ppm.		
22	3-hidroxi-4-((6-fenoxi-4-(1H-tetrazol-5-il)piridin-2-il)amino)ciclobut-3-eno-1,2-diona	61 y 11	Vía E	(400 MHz, DMSO-d ₆) δ: 6,91 (s, 1H), 7,24-7,35 (m, 3H), 7,45-7,52 (m, 2H), 7,96 (s, 1H), 10,61 (s, 1H). No se observaron dos protones ácidos. Señal de amonio observada a 6,95-7,20 ppm.	M	m/z 349 (M-H) ⁻ (ES ⁻) 1,92 min, UV activo
23	3-((3-(1H-tetrazol-5-il)-5-(2-(2-(4-(trifluorometil)fenoxi)etil)-2H-indazol-6-il)fenil)amino)-4-hidroxiciclobut-3-eno-1,2-diona	31 y 96	Vía D	(400 MHz, DMSO-d ₆) δ: 4,64 (t, J = 5,1 Hz, 2H), 4,89 (t, J = 5,1 Hz, 2H), 7,16 (d, J = 8,6 Hz, 2H),	K	m/z 562 (M+H) ⁺ (ES ⁺) a 3,94 min, UV activo

				7,64 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H), 7,69-7,71 (m, 2H), 7,79-7,83 (m, 1H), 7,82-7,87 (m, 1H), 8,04-8,08 (m, 1H), 8,24-8,32 (m, 1H), 8,56 (s, 1H), 9,40 (s, 1H). No se observaron dos protones ácidos.		
24	3-((3-ciclopropil-5-(1H-tetrazol-5-il)fenil)amino)-4-hidroxiciclobut-3-eno-1,2-diona	21 y 11	Vía A, pasos (ii)-(iii)	(400 MHz, DMSO- d_6) δ : 0,74 (s, 2H), 0,95 (s, 2H), 1,88 (s, 1H), 7,21 (s, 1H), 7,61 (s, 1H), 7,78 (s, 1H), 9,36 (m, 1H). No se observaron dos protones ácidos. Señal de amonio observada a 6,95-7,20	K	m/z 298 (M+H) ⁺ (ES ⁺) a 2,95 min, UV activo

				<i>ppm.</i>		
25	3-((3-(1H-indazol-5-il)-5-(1H-tetrazol-5-il)fenil)amino)-4-hidroxiciclobut-3-eno-1,2-diona	31 y 97	Vía D	(400 MHz, DMSO-d ₆) δ: 7,66 (d, <i>J</i> = 8,9 Hz, 1H), 7,76-7,87 (m, 2H), 7,96 (s, 1H), 8,08-8,23 (m, 2H), 8,38 (s, 1H), 9,57 (s, 1H), 13,16 (s, 1H). <i>No se observaron dos protones ácidos. Señal de amonio observada a 6,95-7,20 ppm.</i>	K	m/z 372 (M-H) ⁻ (ES ⁻) a 1,47 min, UV activo
26	3-((3-(6-(2-(3,5-bis(trifluorometil)fenoxi)etoxi)piridin-3-il)-5-(1H-tetrazol-5-il)fenil)amino)-4-hidroxiciclobut-3-eno-1,2-diona	31 y 98	Vía D	(400 MHz, DMSO-d ₆) δ: 4,55-4,64 (m, 2H), 4,67-4,79 (m, 2H), 7,01 (d, <i>J</i> = 8,6 Hz, 1H), 7,66 (s, 1H), 7,72 (s, 3H), 8,00 (s, 1H), 8,13 (dd, <i>J</i> = 2,6, 8,6 Hz, 1H), 8,45 (s, 1H),	K	m/z 607 (M+H) ⁺ (ES ⁺) a 2,13 min, UV activo

				8,59-8,62 (m, 1H), 9,66 (s, 1H). No se observaron dos protones ácidos. Señal de amonio observada a 6,95-7,20 ppm.		
27	3-((3-(1H-tetrazol-5-il)-5-(6-(2-(4-(trifluorometil)fenoxi)etoxi)piridin-3-il)fenil)amino)-4-hidroxiciclobut-3-eno-1,2-diona	31 y 99	Vía D	(400 MHz, DMSO-d ₆) δ: 4,45-4,49 (m, 2H), 4,67-4,73 (m, 2H), 7,03 (d, J = 8,6 Hz, 1H), 7,21 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,68 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,73 (s, 1H), 7,99 (s, 1H), 8,10- 8,14 (m, 1H), 8,43 (s, 1H), 8,60 (s, 1H), 9,66 (s, 1H). No se observaron dos protones ácidos.	K	m/z 539 (M+H) ⁺ (ES ⁺) a 4,12 min, UV activo
28	3-((3-ciclohexil-5-(1H-	101 y 11	Vía A,	(400 MHz,	K	m/z

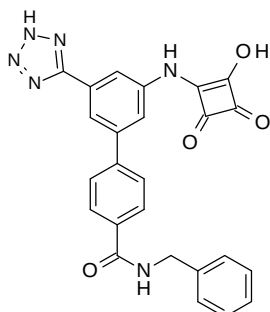
	tetrazol-5-il)fenil)amino)-4-hidroxiciclobut-3-eno-1,2-diona		pasos (ii)-(iii)	DMSO-d ₆) δ: 1,19-1,30 (m, 1H), 1,33-1,50 (m, 4H), 1,69-1,76 (m, 1H), 1,78-1,83 (m, 4H), 2,41-2,47 (m, 1H), 7,31-7,34 (m, 1H), 7,72-7,77 (m, 1H), 7,79-7,84 (m, 1H), 9,35 (s, 1H). No se observaron dos protones ácidos. Señal de amonio observada a 6,95-7,20 ppm.		357 (M+N a) ⁺ (ES ⁺) a 1,43 min, UV activo
29	3-hidroxi-4-((3-(piridazin-4-il)-5-(1H-tetrazol-5-il)fenil)amino)ciclobut-3-eno-1,2-diona	102 y 11	Vía A, pasos (ii)-(iii)	(400 MHz, D ₂ O) δ: 7,59 (s, 1H), 7,70-7,86 (m, 3H), 8,94 (s, 1H), 9,25 (s, 1H). No se observaron	K	m/z 336 (M+H) ⁺ (ES ⁺) a 2,73 min, UV activo

				<i>tres protones intercambiables.</i>		
30	3'-((2-hidroxi-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)-N,N-dimetil-5'-(1H-tetrazol-5-il)-[1,1'-bifenil]-4-carboxamida	1 y 80	Vía F	(400 MHz, DMSO-d ₆) δ: 3,01 (s, 6H), 7,54-7,56 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,83-7,93 (m, 3H), 8,07-8,13 (m, 2H), 8,21-8,24 (m, 1H), 9,93 (s, 1H). No se observaron dos protones ácidos.	J	m/z 405 (M+H) ⁺ (ES ⁺) a 1,69 min, UV activo
31	N-(4-carbamoilbencil)-3'-((2-hidroxi-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)-5'-(1H-tetrazol-5-il)-[1,1'-bifenil]-4-carboxamida	1 y 54	Vía F	(400 MHz, DMSO-d ₆) δ: 4,57-4,59 (m, 2H), 7,35-7,43 (m, 2H), 7,74-7,94 (m, 5H), 8,01-8,25 (m, 4H), 8,98-8,99 (m, 1H), 10,10 (s, 1H). No se observaron dos protones	I	m/z 508 (M-H) ⁻ (ES ⁻) a 1,71 min, UV activo

				ácidos y no se observaron dos protones de carboxamida primaria.		
--	--	--	--	---	--	--

COMPUESTOS CRISTALINOS

Preparación de la sal de trometamina del Compuesto A (Hidrato I) (no sembrada)



El compuesto A es el compuesto del Ejemplo 5 (estructura anterior). 2 mL de 97,6 % (THF:agua 3:1) : Se adicionaron DMSO al 2,4% a 50 mg del Compuesto A y la mezcla se calentó a 50 °C dando como resultado la disolución. Se adicionó 1 equivalente de trometamina acuosa 1M a la solución y se equilibró a 50 °C durante una hora antes de enfriarse a temperatura ambiente y se dejó agitando durante la noche. La solución luego se evaporó (hasta aproximadamente 25 % del volumen original) bajo nitrógeno hasta que se produjo la precipitación. El sólido resultante se filtró, se lavó con IPA y se secó bajo vacío a 45 °C.

Preparación de la sal de trometamina del Compuesto A (Hidrato I) (sembrada)

Compuesto A (1 p, escala en kg) se cargó a un recipiente bajo nitrógeno. Esto fue seguido por la adición de THF (6,08 vol) y luego una solución acuosa de trometamina (0,268 p de trometamina disuelta en 2,21 vol de agua). Luego se adicionó agua (1,84 vol) al recipiente. La mezcla se calentó hasta disolución a 60 °C. La solución se enfrió a 50 °C. Se adicionó acetonitrilo (1,29 vol) antes de que la reacción se sembrara con Hidrato I cristalino de la sal de trometamina del Compuesto A (0,0126 en peso). La mezcla se dejó equilibrar durante 1 hora. Luego se adicionó acetonitrilo (6,33 vol) a la suspensión durante 2 horas. La mezcla se enfrió a 5 °C y se agitó durante la noche. Los sólidos se lavaron con acetonitrilo

(3,96 vol) antes de secarse bajo vacío a 45 °C para obtener la sal de trometamina del Compuesto A (Hidrato I).

Propiedades de la Sal de Trometamina del Compuesto A (Hidrato I)

El patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) del Hidrato I anterior de la sal de trometamina del Compuesto A se muestra en la Figura 1 y un resumen del ángulo de difracción y los espaciados d se dan en la Tabla 4 (picos característicos) y la Tabla 5 (lista completa de picos). El análisis XRPD se realizó en un difractómetro PANalytical Xpert Pro sobre obleas de Si de fondo cero. Las condiciones de adquisición incluyen radiación Cu K α , tensión del generador: 40 kV, corriente del generador: 45 mA, tamaño del paso 0,02 ° 2 θ , ángulo inicial: 2,0° 2 θ , ángulo final: 40,0° 2 θ .

Tabla 4

Pos. [°2 θ]	d-espaciados [Å]
3,9 ± 0,2	22,8
7,7 ± 0,2	11,4
10,0 ± 0,2	8,8
15,8 ± 0,2	5,6

Tabla 5

Pos. [°2 θ]	d-espaciados [Å]	Pos. [°2 θ]	d-espaciados [Å]
3,9 ± 0,2	22,8	21,9 ± 0,2	4,1
7,7 ± 0,2	11,4	22,6 ± 0,2	3,9
10,0 ± 0,2	8,8	23,3 ± 0,2	3,8
11,6 ± 0,2	7,6	24,7 ± 0,2	3,6
12,4 ± 0,2	7,1	24,8 ± 0,2	3,6
13,0 ± 0,2	6,8	25,4 ± 0,2	3,5
13,6 ± 0,2	6,5	25,7 ± 0,2	3,5
14,7 ± 0,2	6,0	26,5 ± 0,2	3,4
14,8 ± 0,2	6,0	26,9 ± 0,2	3,3
15,8 ± 0,2	5,6	27,2 ± 0,2	3,3
16,7 ± 0,2	5,3	28,4 ± 0,2	3,1

17,2 ± 0,2	5,2	29,2 ± 0,2	3,1
18,0 ± 0,2	4,9	29,9 ± 0,2	3
18,4 ± 0,2	4,8	31,0 ± 0,2	2,9
18,9 ± 0,2	4,7	32,0 ± 0,2	2,8
19,7 ± 0,2	4,5	33,1 ± 0,2	2,7
20,1 ± 0,2	4,4	35,8 ± 0,2	2,5
20,6 ± 0,2	4,3	40,0 ± 0,2	2,3
21,3 ± 0,2	4,2		

Un termograma de calorimetría diferencial de barrido (DSC) de ejemplo del Hidrato I anterior de la sal de trometamina del Compuesto A se muestra en la Figura 2. El análisis de DSC se realizó con un calorímetro diferencial de barrido TA Instruments Q100 equipado con un muestreador automático y un sistema de enfriamiento refrigerado bajo una purga de 50 mL/min N₂. Los termogramas de DSC de las muestras se obtuvieron a 10 °C/min en una bandeja de Al sellada. El termograma de DSC exhibe una endoterma con una temperatura de inicio de aproximadamente 155 °C. Sin embargo, esto puede variar dependiendo de las condiciones experimentales y el nivel de cristalinidad.

En la Figura 3 se muestra un termograma de análisis termogravimétrico (TGA) de ejemplo del Hidrato I anterior de la sal de trometamina del Compuesto A. El análisis TGA se realizó en un analizador termogravimétrico TA Instruments Q5000 bajo un flujo de N₂ de 25 mL/min y una velocidad de calentamiento de 10 °C/min. El termograma de TGA de este hidrato habitualmente exhibe una pérdida de peso de entre 6-7 % de 30-120 °C, que corresponde a aproximadamente 2-2,5 equivalentes de agua por cada equivalente del Compuesto A, es decir, un hidrato variable.

Preparación de la Sal de trometamina del Compuesto A (Hidrato II) (no sembrada)

Se adicionó 2 mL de metanol a 100 mg de una forma amorfa de sal de trometamina del Compuesto A y la suspensión se equilibró a temperatura ambiente durante la noche. El sólido resultante se filtró y secó bajo vacío a 45 °C.

Preparación de la Sal de trometamina del Compuesto A (Hidrato II) (sembrada)

Se adicionó 60 mL de metanol a 3 g de Hidrato I de la sal de trometamina del Compuesto A en un recipiente con agitación superior. Se adicionaron 60 mg (2 % p/p de carga de semilla) del Hidrato II de la sal de trometamina del Compuesto A y la mezcla de reacción

se equilibró durante la noche a temperatura ambiente. La suspensión se espesó y se puso mucho más pálida durante la noche. El sólido resultante se filtró y secó bajo vacío a 45 °C.

El patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) del Hidrato II anterior de la sal de trometamina del Compuesto A se muestra en la Figura 4 y un resumen del ángulo de difracción y los espaciados d se proporcionan en la Tabla 6 (picos característicos) y la Tabla 7 (lista completa de picos). El análisis XRPD se realizó en un difractómetro PANalytical Xpert Pro sobre obleas de Si de fondo cero. Las condiciones de adquisición incluyen radiación Cu K α , tensión del generador: 45 kV, corriente del generador: 40 mA, tamaño del paso 0,03 ° 2 θ , ángulo inicial: 3,0° 2 θ , ángulo final: 35,0° 2 θ .

Tabla 6

Pos. [°2 θ]	d-espaciados [Å]
4,4 ± 0,2	20,2
14,4 ± 0,2	6,1
23,9 ± 0,2	3,7

Tabla 7

Pos. [°2 θ]	d-espaciados [Å]	Pos. [°2 θ]	d-espaciados [Å]
4,4 ± 0,2	20,2	22,4 ± 0,2	4
5,4 ± 0,2	16,3	22,6 ± 0,2	3,9
9,0 ± 0,2	9,8	23,0 ± 0,2	3,9
11,1 ± 0,2	7,9	23,9 ± 0,2	3,7
11,5 ± 0,2	7,7	25,7 ± 0,2	3,5
11,7 ± 0,2	7,6	26,1 ± 0,2	3,4
12,6 ± 0,2	7	26,8 ± 0,2	3,3
13,4 ± 0,2	6,6	27,2 ± 0,2	3,3
13,7 ± 0,2	6,5	27,9 ± 0,2	3,2
14,4 ± 0,2	6,1	28,5 ± 0,2	3,1
16,8 ± 0,2	5,3	29,2 ± 0,2	3,1
18,0 ± 0,2	4,9	29,9 ± 0,2	3
18,4 ± 0,2	4,8	30,4 ± 0,2	2,9
18,9 ± 0,2	4,7	32,0 ± 0,2	2,8

20,3 ± 0,2	4,4	32,8 ± 0,2	2,7
21,1 ± 0,2	4,2	34,0 ± 0,2	2,6
21,9 ± 0,2	4,1		

En la Figura 5 se muestra un ejemplo de termograma de calorimetría diferencial de barrido (DSC) del Hidrato II anterior de la sal de trometamina del Compuesto A. El análisis DSC se realizó con un calorímetro diferencial de barrido PerkinElmer Pyris 6000 equipado con un inyector automático y un sistema de enfriamiento refrigerado bajo una purga de N₂ de 20 mL/min. Los termogramas de DSC de las muestras se obtuvieron a 20 °C/min en una bandeja de Al de orificio de alfiler. El termograma de DSC exhibe una endoterma con una temperatura de inicio de aproximadamente 210 °C. Sin embargo, esto puede variar dependiendo de las condiciones experimentales y el nivel de cristalinidad.

En la Figura 6 se muestra un ejemplo de termograma de análisis termogravimétrico (TGA) del Hidrato II anterior de la sal de trometamina del Compuesto A. El análisis TGA se realizó en un analizador termogravimétrico PerkinElmer Pyris 1 bajo un flujo de N₂ de 20 mL/min y una velocidad de calentamiento de 20 °C/min. El termograma de TGA de este hidrato habitualmente exhibe una pérdida de peso de entre 1-3% de 30-150 °C, que corresponde a aproximadamente 0,3-1 equivalentes de agua por cada equivalente del Compuesto A, es decir, un hidrato variable.

Se realizaron estudios de actividad de agua para determinar la actividad crítica del agua en la que cada Hidrato I e Hidrato II es estable. Las suspensiones competitivas de Hidrato I e Hidrato II se llevaron a cabo a temperatura ambiente en un intervalo de mezclas de solventes acuosos con actividad de agua variable. Se aisló el Hidrato I de todas las mezclas con una actividad de agua mayor de 0,5. El equilibrio del Hidrato II solo confirmó la conversión al Hidrato I en mezclas de solventes con actividad de agua de 0,5 o mayor. Las suspensiones competitivas de Hidrato I e Hidrato II a temperatura ambiente en mezclas de solventes con una actividad de agua de 0,2 dieron como resultado una mezcla de sólidos de Hidrato I e Hidrato II.

Preparación del compuesto cristalino A (ácido libre) (patrón 3)

El Compuesto A crudo (ácido libre) se purificó por cromatografía en fase inversa aplicando condiciones básicas (pH alto) bajo un gradiente de acetonitrilo al 5 - 35 % en medios acuosos (0,2 % de hidróxido de amoníaco al 28 % en agua) en un método de 12,5 minutos a través de una columna Gemini-NX C18 (5 µm, 100 x 30 mm) en un Gilson Semi Preparative

HPLC, Bombas 332 y 331, manipulador de líquidos GX-271, software de triluación usando una velocidad de flujo de 30 mL/min y Detector de matriz de diodos 171 a 205 nm, 210 nm y 230 nm. Las fracciones deseadas se combinaron y luego se evaporaron en una máquina Biotage V10 para dar un residuo sólido blanco (4 g), una sal de diamonio.

La sal de diamonio (4 g, 7,99 mmol) se disolvió en DMSO (39,96 mL) y se agitó durante 30 minutos. Se adicionó HCl 1 N (59,94 mL, 59,94 mmol) y el precipitado resultante se recolectó por filtración, se lavó con agua enfriada con hielo (20 mL) y se secó para obtener el producto crudo que se resuspendió en EtOH (40 mL) y se agitó durante 3 horas. La suspensión se filtró para dar un sólido blanco seco que se molió hasta un polvo fino (2,94 g). RMN reveló que este polvo era el producto deseado; sin embargo, una gran cantidad de DMSO permaneció en la muestra. Por lo tanto, el sólido se resuspendió en EtOH (25 mL) y se agitó durante 18 h. La suspensión luego se filtró, y el sólido se recolectó, se molió a un polvo fino usando una mano de mortero y mortero para dar el ácido libre del Compuesto A (2,39 g, 5,12 mmol, 64,1% de rendimiento) como un sólido cristalino blanco. RMN del producto muestra que una pequeña cantidad de DMSO permaneció en la muestra con la relación de producto a DMSO siendo aproximadamente 1:0,05. El patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) del ácido libre del Compuesto A cristalino se muestra en la Figura 7, y este sólido cristalino se denomina "Patrón 3".

En la Figura 8 se muestra un ejemplo de termograma de análisis termogravimétrico (TGA) del Patrón 3 de ácido libre del Compuesto A anterior.

Preparación del compuesto cristalino A (ácido libre) (patrón 1)

Cuando el Patrón 3 de ácido libre del Compuesto A cristalino se secó calentando a 45 °C bajo vacío (aprox. 10-15 mbar) durante la noche, se obtuvo un sólido cristalino diferente, denominado "Patrón 1". El patrón de XRPD del Patrón 1 de ácido libre del Compuesto A se muestra en la Figura 9.

En la Figura 10 se muestra un ejemplo de termograma de análisis termogravimétrico (TGA) del Patrón 1 de ácido libre del Compuesto A anterior.

ACTIVIDAD BIOLÓGICA

EJEMPLO A

Unión a la isoforma GPR35a humana

Sobreexpresión de baculovirus GPR35a humano en células HEK293f a una densidad celular de $2,5 \times 10^6$ células/mL y una multiplicidad de infección de 2,5 durante 24 h en Pro293 (Lonza) + FBS al 5 %, Glutamax al 1 % y Pen/Strep al 0,4 %. Las células se cosecharon y centrifugaron A 2500 RPM durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se vertió y el sedimento se almacenó a -80 °C. El sedimento se descongeló y se resuspendió en 15 mL de amortiguador de homogeneización (HEPES 20 mM, EDTA 10 mM, pH 7,4). Luego homogeneizar en homogeneizador mecánico (VMR) durante 10 segundos. La membrana se centrifugó en tubos de centrífuga a 40.000 g durante 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante se vertió y se resuspendió en 15 mL de amortiguador de homogeneización. Homogeneizado durante 20 segundos. La membrana se centrifugó a 40.000 g durante 45 min a 4 °C. La membrana se resuspendió en 3 mL de amortiguador de almacenamiento (HEPES 20 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7,4) mezclando bien. Las membranas resultantes se almacenaron a -80 °.

Los homogeneizados de membrana celular GPR35 se resuspendieron en el amortiguador de unión (TRIS 50 mM + MgCl₂ 10 mM pH 7,4) a una concentración de ensayo final de 5 ug/pocillo. Los compuestos de prueba se diluyeron en dimetilsulfóxido (DMSO (Sigma Aldrich, Reino Unido)), para formar una curva de concentración de 10 puntos $\frac{1}{2}$ log. Los compuestos de prueba se adicionaron por placa, seguidos de 3H-27966 7 nM.

FAC 0,1 uM se adicionó Iodoxamida a fin de permitir que se calculara la unión no específica. Finalmente, se adicionó membrana a cada pocillo de la placa. Después de 60 min de incubación a temperatura ambiente, las membranas se filtraron en una microplaca blanca de 96 pocillos con un filtro GF/B unido, se empaparon previamente en ddH₂O, con un recolector de células TomTec y se lavaron 5 veces con agua destilada. Las placas se secaron antes de adicionar 50 ul/pocillo de centelleo, se sellaron y se midió la radiactividad usando un analizador MicroBeta. Los valores de IC₅₀ se derivaron de la curva de inhibición y los valores de constante de afinidad (K_i) se calcularon usando la ecuación de Cheng-Prusoff, donde;

$$pK_i = -\log_{10} K_i.$$

Ensayo funcional de DMR sin etiqueta

Las células HT-29 (ATCC HTB-38) se mantuvieron en cultivo continuo en McCoy's (Thermo 16600082) complementado con FBS al 10 %. Día antes del ensayo, las células se cosecharon con TrypLE (Gibco12604-013) y se colocaron en placas a 20k/pocillo en medio de cultivo en un volumen total de 50ul en placas Corning EPIC de 384 pocillos (5040) durante la noche a 37 °C con CO₂ al 5 %. En el día del ensayo, se removió el medio celular y se

reemplazó con amortiguador de ensayo (HBSS + HEPES 20 mM pH 7,4) y se reincubó durante 1 h. Los compuestos se prepararon en DMSO al 100 % en placas fuente ECHO LDV 384. Las placas de células se leyeron en un lector de placas EPIC a temperatura ambiente durante 15 minutos, la lectura se pausó y la placa de células se adicionó a LabCyte ECHO 550 para la adición de 50 nl por compuesto de pocillo por transferencia acústica. Las placas se volvieron a colocar inmediatamente en el lector EPIC, se leyeron sin pausa y se midió la redistribución dinámica de masa durante 60 minutos. Los datos sin procesar se analizaron mediante el software EPIC Analyser y se tomó el pico máximo por concentración para permitir la determinación de EC50. Todos los datos de DMR sin procesar se normalizaron a Lodoxamida y se corrigieron con amortiguador.

Tabla 8 - Actividad GPR35 y afinidad HT-29

Ejemplo	GPR35 Ki humano [nM]	HT-29 EC50 [nM]
1	9,81	8,68
2	0,48	0,90
3	0,35	2,27
4	3,83	2,50
5	0,08	0,52
6	1,82	0,62
7	2,77	4,20
8	1,47	0,66
9	0,46	0,83
10	2,75	2,34
11	6,24	4,31
12	0,31	0,03
13	0,99	2,39
14	0,60	4,90
15	0,16	2,02
16	0,06	0,27
17	7,85	9,25
18	2,65	5,18
19	0,36	0,08
20	1,06	7,68
21	0,91	0,14

22	3,66	1,39
23	0,46	0,12
24	15,21	8,19
25	0,37	0,44
26	0,36	1,04
27	0,75	0,54
28	12,50	6,65
29	0,74	1,05
30	5,99	2,64
31	1,61	11,31

Valores de K_i derivados del análisis de respuesta a la concentración en membranas celulares HEKf que sobreexpresan la isoforma GPR35a. Los valores de EC_{50} derivados del análisis de respuesta a la concentración en la línea celular HT-29 que expresa endógenamente GPR35 humano.

El Compuesto A mostró una potencia funcional aproximadamente 500 veces mayor para GPR35 que el estabilizador de mastocitos Cromolyn, que se ha usado clínicamente en dosis altas para trastornos gastrointestinales. El Compuesto A también mostró farmacología en especies preclínicas que incluyen secreción de líquido inducida por PGE₂, ileítis por indometacina y permeabilidad de barrera, modelo de dolor visceral de ratón TNBS y exposición aguda a LPS de rata y ratón. El Compuesto A mostró además una fuerte selectividad por GPR35 y no se han observado efectos fuera de diana. El Compuesto A tiene un potencial de interacción farmacológica muy bajo para los principales CYP humanos, incluido CYP3A4.