

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 927 100**

51 Int. Cl.:

C07D 217/14 (2006.01)

A61P 13/12 (2006.01)

A61K 31/472 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.05.2020** **PCT/US2020/031999**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.11.2020** **WO20231770**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.05.2020** **E 20729401 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.08.2022** **EP 3921308**

54 Título: **Compuestos inhibidores del intercambiador de sodio-hidrógeno 3**

30 Prioridad:

16.05.2019 US 201962848652 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

02.11.2022

73 Titular/es:

ELI LILLY AND COMPANY (100.0%)
Lilly Corporate Center
Indianapolis, IN 46206-6288, US

72 Inventor/es:

GAVARDINAS, KOSTAS;
JADHAV, PRABHAKAR;
WANG, XIAOJUN y
WETTERAU, JOHN ROWLEY

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 927 100 T3

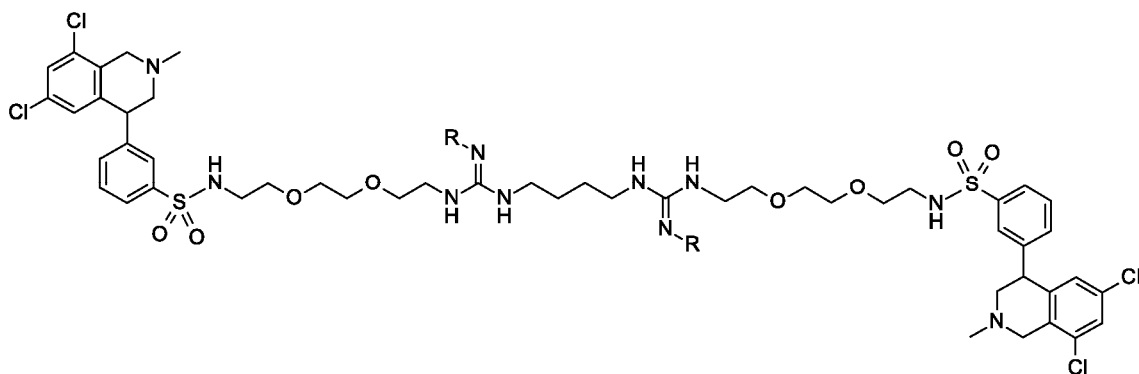
Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Compuestos inhibidores del intercambiador de sodio-hidrógeno 3

- 5 La presente invención se refiere a nuevos compuestos inhibidores del intercambiador de sodio-hidrógeno 3 (NHE3), a composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos y a los compuestos para su uso en el tratamiento de ciertas enfermedades asociadas con niveles elevados de sodio y/o fosfato. La presente invención se refiere además a nuevos compuestos de NHE3 para su uso en combinación con ciertos inhibidores del cotransportador de fosfato dependiente de sodio (NPT2b).
- 10 El NHE3 es un intercambiador de sodio-hidrógeno epitelial presente en el intestino delgado, colon, vesícula biliar, tubo proximal renal y ramas gruesas y delgadas del asa de Henle de mamíferos. En el intestino, la regulación de NHE3 se produce de forma aguda como parte de la digestión y se inhibe en el período posprandial inmediato. Los ratones nulos para NHE3 exhiben un equilibrio fluido-sodio alterado, destacando el papel de NHE3 en la preservación de la homeostasis del volumen e indicando que NHE3 es el principal contribuyente a la absorción intestinal de sodio. De manera adicional, en estudios *in vivo* recientes se ha demostrado que la inhibición de NHE3 provoca una disminución en la absorción intestinal de fosfato (Orlowski, J., *et al.*, Pflugers Arch. - Eur. J. Physiol., 2004, 447:549-565, King, A. J., *et al.*, Sci. Transl. Med., 2018, 10, 1-17).
- 15 El consumo excesivo de sodio, que es omnipresente en las dietas occidentales, está fuertemente asociado con la manifestación de hipertensión, que a su vez se asocia con un mayor riesgo de enfermedades cardiovasculares y renales. Mantener un nivel óptimo de ingesta de sodio puede ayudar a controlar la presión arterial y prevenir enfermedades cardiovasculares y renales (Weintraub, W.S., *et al.*, J. Am. Coll. Cardiol., 2015, 65 (10), 1042-1050).
- 25 El aclaramiento renal reducido en la nefropatía crónica (NPC) y la nefropatía en etapa terminal (NPET) conduce a un aumento de la carga de fosfato, que puede estimular el hiperparatiroidismo renal secundario y eventualmente dar como resultado hiperfosfatemia (Wolf M., J. Am. Soc. Nephrol., 2010, 21, 1427-1435). La NPC no es solo la causa más común de hiperfosfatemia en seres humanos, sino también en perros y gatos adultos (Kidder, A., *et al.*, J. Feline Med. Sur., 2009, 11, 913-924). Una consecuencia bien documentada de la hiperfosfatemia es la enfermedad cardiovascular (ECV), que puede manifestarse como calcificación vascular y de las válvulas cardíacas, hipertrofia ventricular izquierda, insuficiencia cardíaca, arritmia y muerte súbita cardíaca (Fujii, H., *et al.*, Clin. Exp. Nephrol., 2017, 21(S1), S53-S63). El hiperparatiroidismo secundario resultante del aumento de la carga de fosfato también puede conducir a una enfermedad ósea (Yuen, N.K., *et al.*, Perm. J., 2016, 20(3), 15-127).
- 30 La disminución efectiva de la absorción intestinal de fosfato a través de la restricción de fosfato en la dieta y el uso de un inhibidor de la absorción de fosfato disminuirá la carga de fosfato en la NPC y ayudará a disminuir las secuelas que contribuyen a la ECV, la enfermedad ósea y un mayor deterioro de la función renal.
- 35 El documento WO2010/078449 desvela compuestos y métodos para inhibir el antiporte mediado por NHE en el tratamiento de trastornos asociados con la retención de líquidos o la sobrecarga de sales y trastornos del tracto gastrointestinal. El documento WO2014/169094 desvela compuestos de unión a NHE3 y métodos para inhibir el transporte de fosfato.
- 40 En vista de lo anterior, se reconoce que la absorción excesiva de sodio y fosfato en el intestino contribuye a una mayor incidencia de enfermedades, tales como hipertensión, NPC, ECV, enfermedad ósea y mortalidad relacionada. En consecuencia, hay una necesidad de tratamientos alternativos para estas afecciones, en particular para tratamientos que inhiben el NHE3. En particular, existe la necesidad de compuestos que sean efectivos para reducir la absorción de sodio y fosfato *in vivo* mientras que posee un alto grado de selectividad para la inhibición de NHE3. Además, es deseable tener compuestos inhibidores de NHE3 que sean efectivos en combinación con compuestos inhibidores de NPT2b.
- 50

Por consiguiente, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula I:



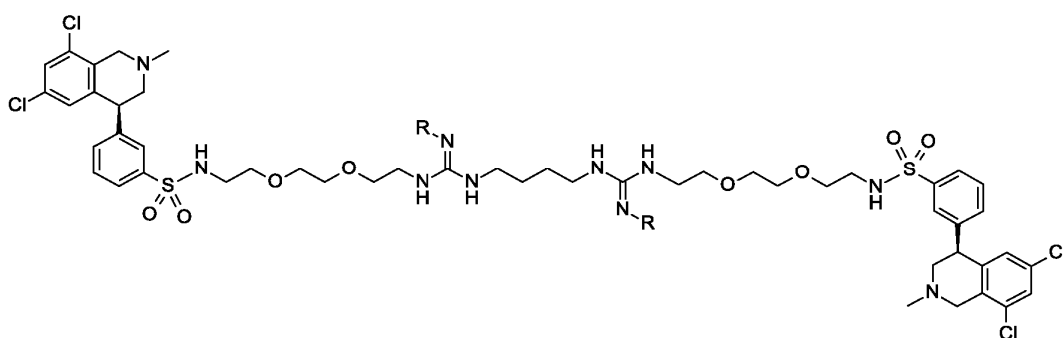
Fórmula I

5 en donde ambos R son CN o ambos R son C(O)NH₂, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una realización particular, ambos R son C(O)NH₂.

En una realización particular, el compuesto es un compuesto de la fórmula:

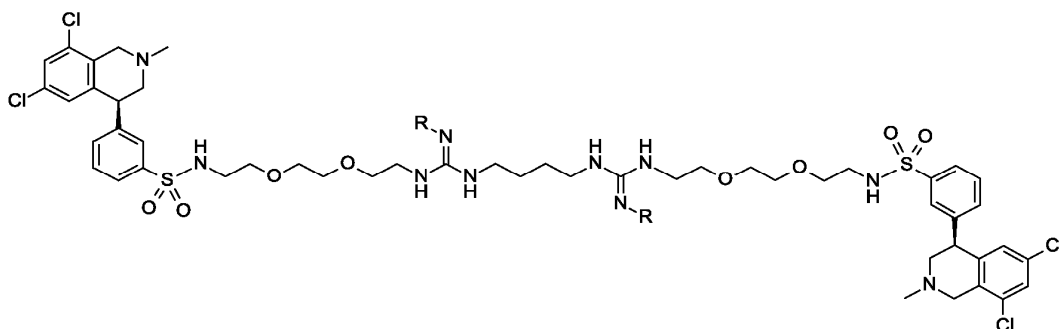
10



Fórmula Ia

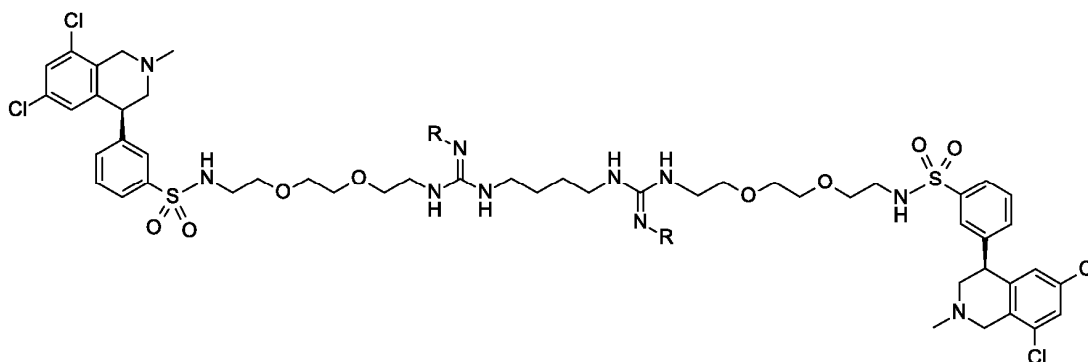
15 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una realización adicional, el compuesto es un compuesto de la fórmula:

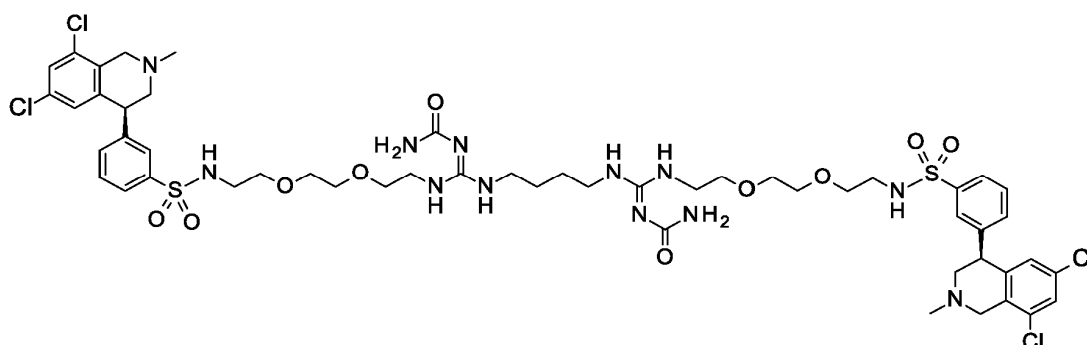


20

En una realización adicional, el compuesto es la sal clorhidrato de:

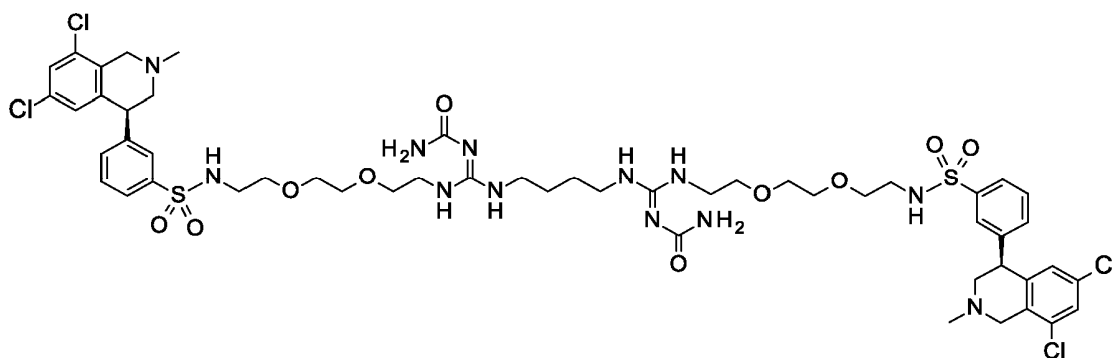


En una realización particular, el compuesto es un compuesto de la fórmula:



5

En una realización particular, el compuesto es la sal clorhidrato de:



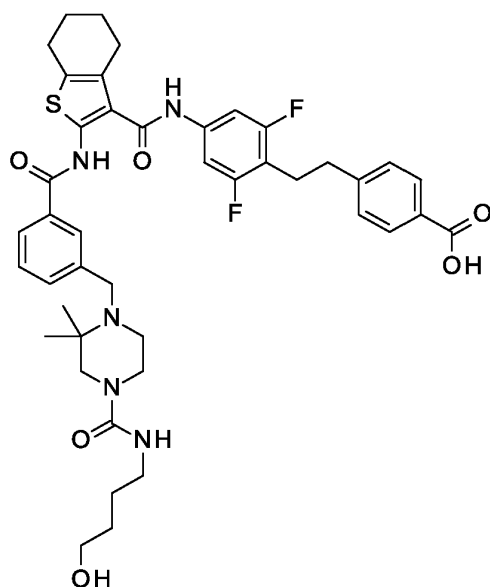
10

El compuesto de fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, puede usarse en un método para tratar una enfermedad seleccionada entre el grupo que consiste en NPC, hiperfosfatemia, hiperparatiroidismo secundario, insuficiencia cardíaca, hipertensión y ECV que comprende administrar a un mamífero que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de fórmula I o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo. El

15 El compuesto de fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, puede usarse en un método para tratar la NPC en gatos que comprende administrar a un gato que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de Fórmula I, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

20

El compuesto de fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, puede usarse en un método para tratar una enfermedad seleccionada entre el grupo que consiste en NPC, hiperfosfatemia, hiperparatiroidismo secundario, insuficiencia cardíaca y ECV que comprende administrar a un mamífero que lo necesite una combinación terapéuticamente eficaz del compuesto de fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en combinación con un compuesto de Fórmula II:



Fórmula II

5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. El compuesto de fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, puede usarse en un método para tratar la NPC en gatos que comprende administrar a un gato que lo necesite una combinación terapéuticamente eficaz del compuesto de Fórmula I, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en combinación con un compuesto de Fórmula II, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10 Es más, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en terapia. En particular, la presente invención proporciona un compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de NPC, hiperfosfatemia, hiperparatiroidismo secundario, insuficiencia cardíaca, hipertensión o ECV. En una realización, la invención proporciona un compuesto de
15 fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de la NPC en gatos.

Es más, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en combinación simultánea, separada o secuencial con un compuesto de Fórmula II, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el tratamiento de NPC, hiperfosfatemia, hiperparatiroidismo secundario,
20 insuficiencia cardíaca o ECV. En una realización, la invención proporciona un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en combinación simultánea, separada o secuencial con un compuesto de Fórmula II, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el tratamiento de la NPC en gatos.

Es más, la presente invención proporciona un compuesto de Fórmula II o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en combinación simultánea, separada o secuencial con un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el tratamiento de NPC, hiperfosfatemia, hiperparatiroidismo secundario, insuficiencia cardíaca o ECV. En una realización, la invención proporciona un compuesto de Fórmula II, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en combinación simultánea, separada o secuencial con un
25 compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el tratamiento de la NPC en gatos.

30 Es más, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, con un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

35 Es más, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, con un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable que comprende adicionalmente un compuesto de Fórmula II, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

40 Los compuestos y combinaciones de la presente invención se pueden usar en el tratamiento de enfermedades y afecciones asociadas con el desequilibrio de sodio y/o fosfato, que incluyen: hiperfosfatemia, en particular hiperfosfatemia en NPET o NPC o hiperfosfatemia familiar; hiperparatiroidismo, en particular hiperparatiroidismo secundario asociado con NPC; cálculos renales de fosfato de calcio; calcificación de la válvula cardíaca asociada con NPC o NPET; fracturas óseas asociadas con NPC; calcifilaxis; calcinosis tumoral; y nefropatía aguda.

En una realización particular, el compuesto de Fórmula II es el ácido libre. En una realización particular, el compuesto de fórmula II es la sal disódica. El compuesto de ácido libre de fórmula II se denomina en el presente documento "Compuesto A".

Como se usa en el presente documento, el término "que trata" o "tratar" incluye restringir, ralentizar, detener o revertir el avance o gravedad de un síntoma o trastorno existente.

En una realización, el mamífero que se va a tratar es un ser humano. En otra realización, el mamífero es un gato o un perro, preferentemente un gato.

Como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad o dosis de compuesto de fórmula I o II, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que, tras la administración de una dosis única o múltiple al mamífero, proporciona el efecto deseado en el paciente en diagnóstico o tratamiento.

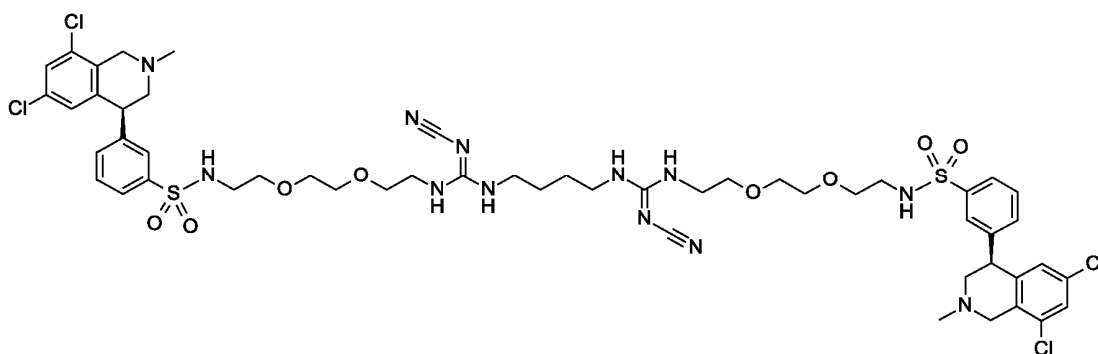
Un experto en la técnica puede determinar una cantidad eficaz usando técnicas conocidas y observando los resultados obtenidos en circunstancias análogas. Al determinar la cantidad eficaz para un paciente, se consideran varios factores, incluyendo, pero sin limitación: el tipo de paciente; su tamaño, la edad, dieta y salud en general; la enfermedad o trastorno específico implicado; el grado de o la afectación o la gravedad de la enfermedad o trastorno; la respuesta del paciente individual; el compuesto administrado particular; el modo de administración; las características de biodisponibilidad de la preparación administrada; la posología seleccionada; el uso de medicación simultánea; y otras circunstancias relevantes. Los compuestos de fórmula I y II son eficaces a una dosis por día que está dentro del intervalo de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 15 mg/kg de peso corporal.

Los compuestos de Fórmula I o II se formulan como composiciones farmacéuticas para ser administradas por cualquier vía que haga que el compuesto sea biodisponible. Preferentemente, dichas composiciones son para administración oral. Dichas composiciones farmacéuticas y los procesos para preparar las mismas se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Remington, J. P., "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", L.V. Allen, Editor, 22ª edición, Pharmaceutical Press, 2012).

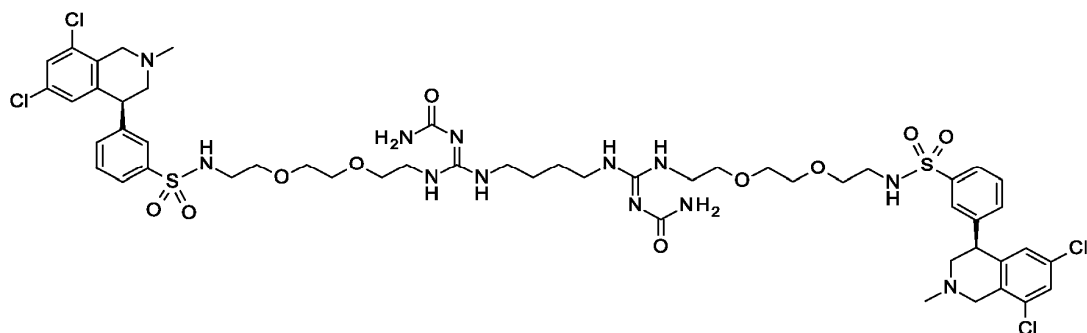
Los compuestos de fórmula I y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos pueden usarse en los usos terapéuticos descritos, prefiriéndose ciertas configuraciones. La siguiente lista de compuestos de la presente invención describe tales configuraciones. Se entenderá que estas preferencias son aplicables tanto a los compuestos para usos terapéuticos como a los compuestos de la invención.

El experto en la materia apreciará que para los compuestos en los que ambos R son C(O)NH₂, el resto amidina urea puede existir en la configuración E o Z y puede cambiar fácilmente entre las dos. Los compuestos de la presente invención incluyen los isómeros tanto E como Z, así como mezclas de los mismos.

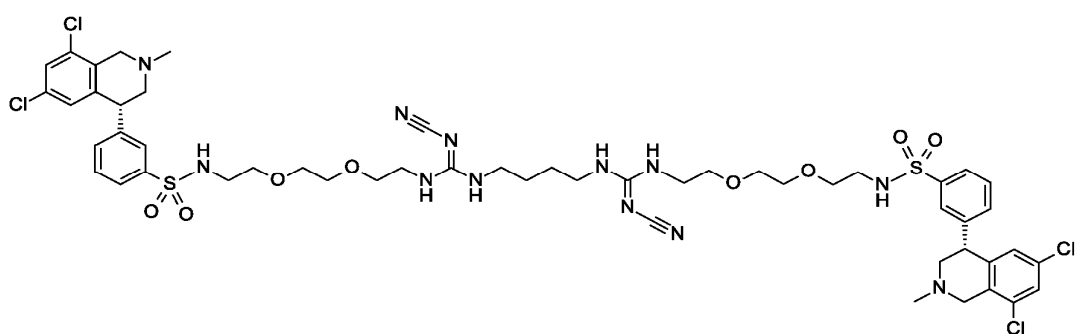
Los compuestos de Fórmula I incluyen:



Fórmula Ia'

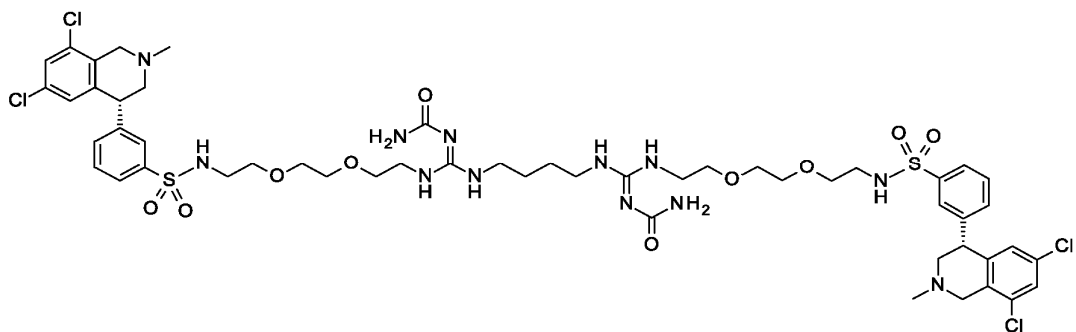


Fórmula Ia''



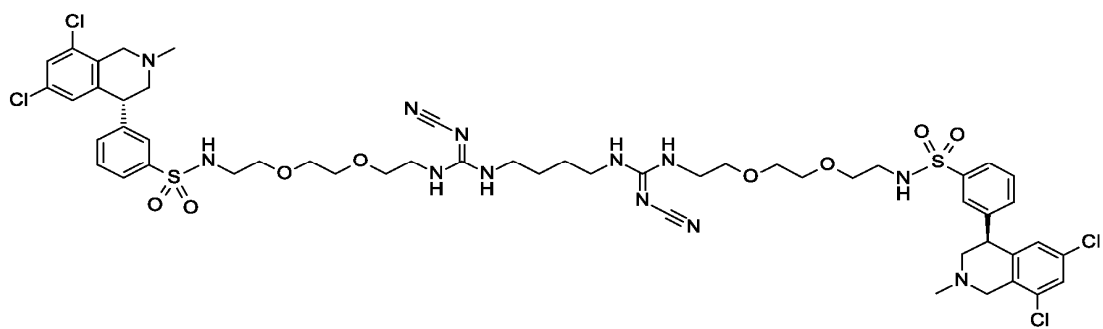
5

Fórmula Ib'



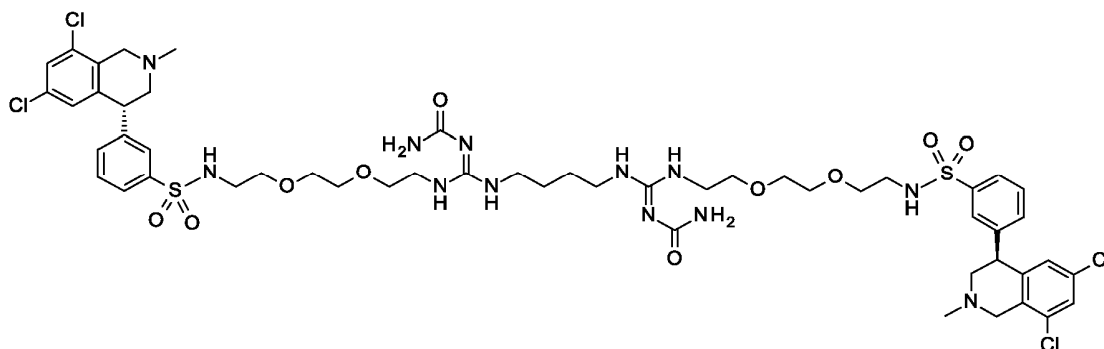
10

Fórmula Ib''



15

Fórmula Ic'



Fórmula Ic"

5 o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Aunque la presente invención contempla todos los enantiómeros y diastereómeros individuales, así como las mezclas de los enantiómeros de dichos compuestos, incluidos los racematos, se prefieren particularmente los compuestos de Fórmula Ia' y Fórmula Ia" y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. En particular, se prefiere la sal clorhidrato del compuesto de Fórmula Ia".

Los enantiómeros individuales pueden ser separados o resueltos por un experto en la materia en cualquier punto conveniente de la síntesis de los compuestos de la invención, por métodos tales como técnicas de cristalización selectiva, cromatografía quiral (Véase por ejemplo, J. Jacques, *et al.*, "Enantiomers, Racemates, and Resolutions", John Wiley y Sons, Inc., 1981, y E.L. Eliel y S. H. Wilen, "Stereochemistry of Organic Compounds", Wiley-Interscience, 1994) o cromatografía de fluidos supercríticos (SFC) (Véase por ejemplo, T. A. Berger; "Supercritical Fluid Chromatography Primer", Agilent Technologies, julio de 2015).

Se puede formar una sal farmacéuticamente aceptable de un compuesto de Fórmula I, por ejemplo, mediante la reacción de una forma de base libre apropiada de un compuesto de Fórmula I y un ácido farmacéuticamente aceptable apropiado en un disolvente adecuado en condiciones convencionales bien conocidas en la técnica (Véase, por ejemplo, Bastin, R.J., *et al.*; Org. Process. Res. Dev., 4, 427-435, 2000 y Berge, S.M., *et al.*; J. Pharm. Sci., 66, 1-19, 1977). En particular, la sal preferida de un compuesto de Fórmula I es la sal diclorhidrato.

Una sal farmacéuticamente aceptable de un compuesto de Fórmula II puede formarse, por ejemplo, por reacción de una forma de ácido libre apropiada de un compuesto de Fórmula II y una base farmacéuticamente aceptable apropiada en un disolvente adecuado en condiciones convencionales bien conocidas en la técnica (Véase, por ejemplo, Bastin, R.J., *et al.*; Org. Process. Res. Dev., 4, 427-435, 2000 y Berge, S.M., *et al.*; J. Pharm. Sci., 66, 1-19, 1977). En particular, una sal preferida de un compuesto de Fórmula II es la sal disódica.

El documento WO2018/034883 describe un género de compuestos, incluidos los compuestos de Fórmula II, que son inhibidores del cotransportador de fosfato 2b dependiente de sodio (NPT2b o NaPiIb). NPT2b se encuentra en la superficie luminal del intestino delgado donde promueve la absorción de fosfato por transporte activo. Se puede preparar un compuesto de fórmula II mediante los métodos descritos en el documento WO2018/034883.

Los compuestos de Fórmula I o sales de los mismos pueden prepararse mediante una variedad de procedimientos conocidos por los expertos en la materia, algunos de los cuales se ilustran en las preparaciones y ejemplos a continuación. Los productos de cada etapa se pueden recuperar por métodos convencionales bien conocidos en la técnica, que incluyen extracción, evaporación, precipitación, cromatografía, filtración, triturado y cristalización. Los reactivos y materiales de partida están fácilmente disponibles para un experto en la materia. Sin limitar el alcance de la invención, las siguientes preparaciones y ejemplos se proporcionan para ilustrar adicionalmente la invención. Además, un experto en la materia apreciará que los compuestos de fórmula I pueden prepararse utilizando materiales de partida o intermedios con la configuración estereoquímica deseada correspondiente que puede preparar un experto en la materia.

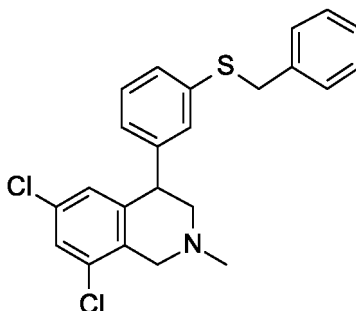
Determinadas abreviaturas se definen de la siguiente manera: "ACN" se refiere a acetonitrilo; "BCECF-AM" se refiere a 2',7'-Bis(2-carboxietil)-5(6)-carboxifluorescein acetoximetil éster; "BSA" se refiere a albúmina de suero bovino; "DCM" se refiere a cloruro de metileno o diclorometano; "DMSO" se refiere a dimetilsulfóxido; "EtOAc" se refiere a acetato de etilo; "ES/EM" se refiere a espectrometría de masas por electropulverización; "EMS" se refiere a metanosulfonato de etilo; "EtOH" se refiere a etanol o alcohol etílico; "FBS" se refiere a suero bovino fetal; "h" se refiere a hora u horas; "HEPES" se refiere a ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico; "HPLC" se refiere a cromatografía líquida de alto rendimiento; "CI50" se refiere a la concentración de inhibidor a la mitad de la inhibición máxima; "CL-EM" se refiere a cromatografía líquida-espectrometría de masas; "MeOH" se refiere a metanol; "min" se refiere a minutos o minutos;

"MTBE" se refiere a metil *terc*-butil éter; "m/z" se refiere a relación masa a carga; "Pd(dba)₂" se refiere a bis(dibencilidenoacetona)paladio (0); "TA" se refiere a temperatura ambiente; "TLC" se refiere a cromatografía de capa fina.

- 5 CL-EM se realiza en un sistema de cromatografía líquida AGILENT® HP1260. Las mediciones de espectrometría de masas se realizan mediante ES/EM (adquiridas en modo positivo y/o negativo) y se realizan en un espectrómetro de masas de cuadrupolo con detector selectivo de masas conectado a una HPLC que puede tener o no un ELSD. Condiciones de la LC-EM (pH bajo): columna: PHENOMENEX® GEMINI® NX C18 2,0 x 50 mm 3,0 µm, 110 Å; gradiente: B al 5-95 % en 1,5 min, después B al 95 % durante 0,5 min temperatura de la columna: 50 °C +/-10 °C; caudal: 1,2 ml/min; volumen de la inyección 1 µl; Disolvente A: agua desionizada con HCOOH al 0,1 %; Disolvente B: ACN con ácido fórmico al 0,1 %; longitud de onda de 200-400 nm y 212-216 nm. Si la HPLC está equipada con un ELSD, los ajustes son una temperatura del evaporador de 45 °C, una temperatura del nebulizador de 40 °C y un caudal de gas de 1,6 SLM. Condiciones de CL-EM alternativas (pH alto): columna: Waters xBridge® C18 column 2,1x50 mm, 3,5 µm; gradiente: B al 5-95 % en 1,5 min, después B al 95 % durante 0,50 min; temperatura de la columna: 50 °C +/-10 °C; caudal: 1,2 ml/min; volumen de inyección de 1µl; Disolvente A: NH₄HCO₃ 10 mM pH 9; Disolvente B: ACN; longitud de onda: 200-400 nm y 212-216 nm; si tuviera ELSD: 45 °C temp. de evaporador, 40 °C temp. de nebulizador y caudal de gas de 1,60 SLM.

Preparación 1

4-(3-Bencilsulfanilfenil)-6,8-dicloro-2-metil-3,4-dihidro-1H-isoquinolina

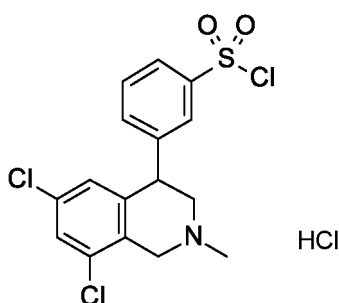


- 25 Establecer tres reacciones en paralelo en la misma escala. Para cada reacción, preparar dos soluciones, Solución 1 y Solución 2. Solución 1: A una solución de 4-(3-bromofenil)-6,8-dicloro-2-metil-3,4-dihidro-1H-isoquinolina (54,0 g, 145,5 mmol) en xileno (1,08 l), se le añade Pd(dba)₂ (3,35 g, 5,82 mmol) y Xantphos (3,37 g, 0,04 equiv 5,82 mmol) a 15 °C en una atmósfera de nitrógeno. Se agita la mezcla durante 1 h. Solución 2: A una mezcla de K₂CO₃ (10,1 g, 72,7 mmol) en xileno (1,08 l), se le añade fenilmetanotiol (27,1 g, 218,3 mmol) gota a gota a 0 °C en una atmósfera de nitrógeno. Se agita la mezcla durante 1 h a 15 °C. Se añade la Solución 1 gota a gota a la Solución 2 a 15 °C y se agita la mezcla a 140 °C durante 12 h.

Combinar las tres mezclas de reacción y lavar con agua (500 ml). Concentrar la capa orgánica y purificar por cromatografía en gel de sílice usando un gradiente de EtOAc del 1 a 17 % en éter de petróleo para dar el compuesto del título (92 g, 50 %). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,28-7,17 (m, 8H), 7,05-7,04 (m, 1H), 7,00-6,95 (m, 1H), 6,74-6,69 (m, 1H), 4,15-4,04 (m, 3H), 3,76 (d, J = 16,0 Hz, 1H), 3,47 (d, J = 16,0 Hz, 1H), 2,90 (dd, J = 11,2, 7,2 MHz, 1H), 2,50-2,42 (m, 4H).

Preparación 2

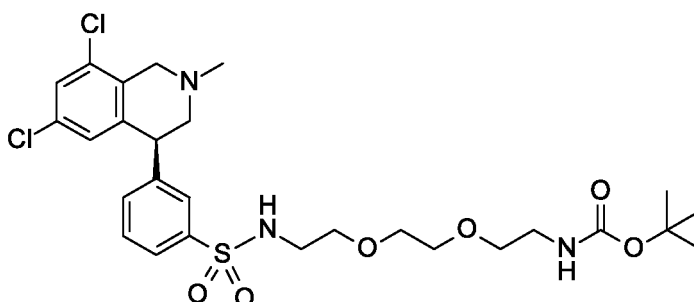
Cloruro de 3-(6,8-dicloro-2-metil-3,4-dihidro-1H-isoquinolin-4-il)bencenosulfonilo; sal clorhidrato



Establecer dos reacciones en paralelo en la misma escala. Para cada reacción, a una mezcla agitada de 4-(3-bencilsulfanilfenil)-6,8-dicloro-2-metil-3,4-dihidro-1H-isoquinolina (50,0 g, 121 mmol), ácido acético (52,17 g, 868,8 mmol) y agua (62 ml) en ACN (690 ml), se le añade 1,3-dicloro-5,5-dimetil-imidazolidina-2,4-diona (47,5 g, 241 mmol) en porciones a 0 °C. Agitar la mezcla de 0 a 5 °C durante 2 h, después concentrar la mezcla de reacción al vacío. Añadir MTBE (200 ml) y HCl (solución 4 M en 1,4-dioxano, 10 ml) a cada reacción y combinar las mezclas de reacción. Agitar durante 30 min y recoger el sólido por filtración. Lavar el sólido con MTBE (100 ml) para dar el compuesto del título (112 g) que se usa sin purificación adicional. Suponiendo rendimiento cuantitativo, la pureza se estima en un 92 % p/p en función de un rendimiento teórico de 103 g. TLC (1:6 de EtOAc:éter de petróleo) R_f = 0,05.

Preparación 3

N-[2-[2-[2-[[3-[(4S)-6,8-Dicloro-2-metil-3,4-dihidro-1H-isoquinolin-4-il]fenil]sulfonilamino]etoxi]etoxi]etil]carbamato de *terc*-butilo



A una solución de N-[2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]etil]carbamato de *terc*-butilo (5,22 g, 21,0 mmol) y trimetilamina (6,38 g, 8,79 ml, 63,0 mmol, 3,00 equiv.) en DCM anhidro (120 ml), añadir cloruro de 3-(6,8-dicloro-2-metil-3,4-dihidro-1H-isoquinolin-4-il)bencenosulfonilo racémico (Abacipharm, 8,21 g, 21,0 mmol) y agitar a TA en una atmósfera de nitrógeno durante una noche. Concentrar la mezcla de reacción al vacío. Al residuo oleoso, añadir EtOAc (50 ml), filtrar los sólidos y concentrar el filtrado al vacío para obtener un aceite de color naranja. Purificar mediante cromatografía en columna de gel de sílice eluyendo con EtOAc para obtener el compuesto racémico (6,92 g, 55 %) en forma de un aceite incoloro. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7,75 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,67 (s, 1H), 7,44 (t, J = 7,6 Hz, 1H), 7,36 (d, J = 7,2 Hz, 1H), 7,23 (d, J = 2,0 Hz, 1H), 6,71 (d, J = 1,2 Hz, 1H), 5,42-5,05 (m, 1H), 4,29 (t, J = 6,0 Hz, 1H), 3,73 (d, J = 16,2 Hz, 1H), 3,57 (d, J = 15,8 Hz, 1H), 3,55-3,46 (m, 8H), 3,34-3,25 (m, 2H), 3,14-3,08 (m, 2H), 2,97 (dd, J = 11,5, 5,29 Hz, 1H), 2,59 (dd, J = 11,5, 7,2 Hz, 1H), 2,46 (s, 3H), 1,41 (s, 9H).

Separar los enantiómeros en una columna Chiralpak® AD (8 x 35 cm) (caudal de 400 ml/min, detección a 260 nm) en 11 inyecciones de 629 mg eluyendo con 95:5 de EtOH:ACN para obtener el compuesto del título (2,94 g, 23 %) como el segundo isómero de elución. HPLC quiral (columna: Chiralpak® AD-H 4,6 x 150 mm, caudal: 0,6 ml/min, detección: 250 nm, eluyente: 95:5 de EtOH:ACN) indica >99 % de ee.

Síntesis alternativa

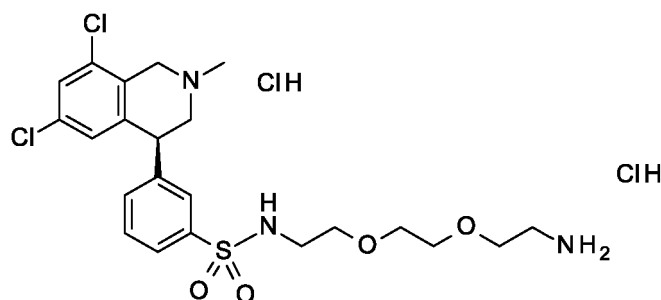
A una solución de N-[2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]etil]carbamato de *terc*-butilo (57,1 g, 230 mmol) en DCM (1,70 l), añadir trietilamina (65,2 g, 645 mmol) a 0 °C. Añadir cloruro de 3-(6,8-dicloro-2-metil-3,4-dihidro-1H-isoquinolin-4-il)bencenosulfonilo; sal clorhidrato (material preparado de acuerdo con la Preparación 2; 84,0 g, 181 mmol) en porciones a la mezcla a 0 °C. Calentar la mezcla hasta 25 °C y agitar durante 4 h. Combinar la mezcla de reacción con dos mezclas de reacción preparadas esencialmente como anteriormente, partiendo con cloruro de 3-(6,8-dicloro-2-metil-3,4-dihidro-1H-isoquinolin-4-il)bencenosulfonilo; sal clorhidrato (material preparado de acuerdo con la Preparación 2; 52 g, 112 mmol de cada uno para un total de 104 g, 224 mmol). Verter la mezcla resultante en agua enfriada con hielo (1,8 l), después lavar la capa orgánica con agua (2 x 1,5 l) y concentrar para dar un residuo de color amarillo. Purificar por cromatografía sobre gel de sílice usando un gradiente de MeOH del 1 al 2 % en DCM para dar el compuesto racémico (157 g, rendimiento del 64 %) en forma de un aceite de color amarillo.

Combinar este material racémico (157 g, 261 mmol) con material racémico adicional (23 g, 38 mmol) preparado como se ha indicado anteriormente. Separar los enantiómeros por SFC usando una columna Chiralpak® AD-H (5 μm , 3 x 25 cm) (caudal 70 g/min, detección UV a 220 nm) eluyendo con 70:30 de CO_2 :(NH_4OH al 0,1 %) en MeOH para obtener el compuesto del título (50 g, 28 %) en forma de una goma de color amarillo, segundo isómero de elución, >99 % de ee. ES/EM m/z ($^{35}\text{Cl}/^{37}\text{Cl}$) 602/604 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$.

Preparación 4

Diclorhidrato de N-[2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]etil]-3-[(4S)-6,8-dicloro-2-metil-3,4-dihidro-1H-isoquinolin-4-

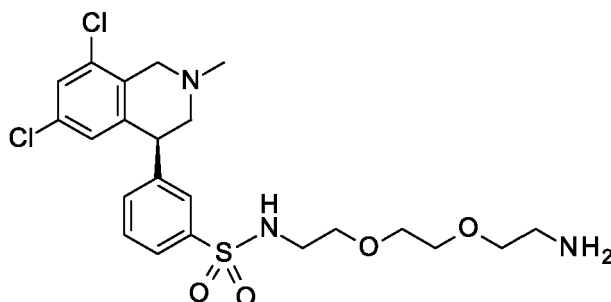
il]bencenosulfonamida



- 5 A N-[2-[2-[2-[[3-[(4S)-6,8-dicloro-2-metil-3,4-dihidro-1H-isoquinolin-4-il]fenil]sulfonilamino]etoxi]etoxi]etil]carbamato de *terc*-butilo (2,94 g, 4,88 mmol), añadir cloruro de hidrógeno 4 M en 1,4-dioxano (10 ml, 40 mmol) y agitar la solución resultante a TA durante una noche. Concentrar la mezcla de reacción al vacío para obtener una espuma de color (2,85 g, >100 %). Secar a alto vacío durante una noche y usar sin manipulación adicional. ES/EM m/z (³⁵Cl/³⁷Cl) 502/504 [M+H]⁺

Preparación 5

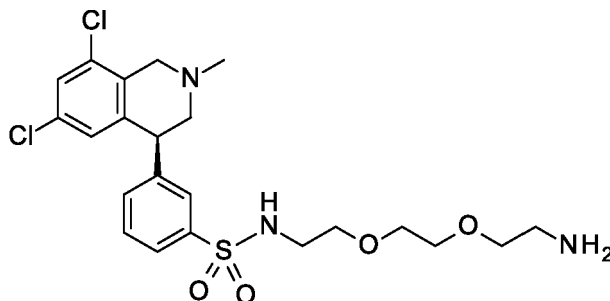
N-[2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]etil]-3-[(4S)-6,8-dicloro-2-metil-3,4-dihidro-1H-isoquinolin-4-il]bencenosulfonamida



Purificar diclorhidrato de N-[2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]etil]-3-[(4S)-6,8-dicloro-2-metil-3,4-dihidro-1H-isoquinolin-4-il]bencenosulfonamida (992 mg, 1,84 mmol) usando una columna de Isolute® SCX de 10 g para obtener 740 mg de la base libre en forma de un semisólido incoloro transparente (740 mg, 80 %).

Preparación 6

N-[2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]etil]-3-[(4S)-6,8-dicloro-2-metil-3,4-dihidro-1H-isoquinolin-4-il]bencenosulfonamida

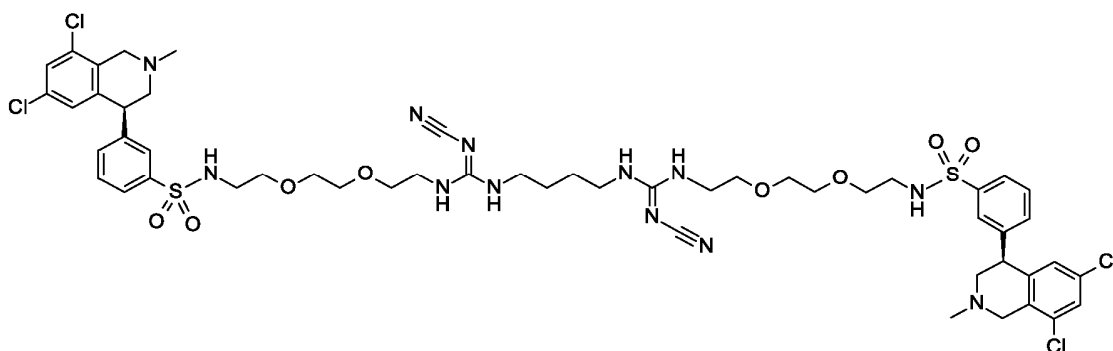


A N-[2-[2-[2-[[3-[(4S)-6,8-dicloro-2-metil-3,4-dihidro-1H-isoquinolin-4-il]fenil]sulfonilamino]etoxi]etoxi]etil]carbamato de *terc*-butilo (48 g, 80 mmol) en MeOH (190 ml) a 15 °C, añadir ácido clorhídrico 4 M en 1,4-dioxano (100 ml, 400 mmol) y agitar la solución resultante a TA durante una noche. Retirar los disolventes al vacío y disolver el residuo en agua (150 ml). Añadir NaOH 5 N (30 ml) y NaOH 2 N (50 ml) a esta solución hasta pH 9-10, después añadir Na₂CO₃ acuoso al 20 % (75 ml) para llevar la solución a pH 11. Extraer la mezcla acuosa con EtOAc (2 x 200 ml, después 1 x 100 ml). Combinar los orgánicos y lavar con una mezcla de cloruro sódico acuoso saturado (120 ml) y Na₂CO₃ al 20 % (30 ml). Secar los orgánicos sobre sulfato sódico, filtrar y concentrar al vacío. Disolver el residuo en tolueno y concentrar al

vacío, después repetir esta operación dos veces más. Disolver el residuo en DCM y concentrar al vacío, después repetir esta operación dos veces más para obtener un aceite de color amarillo oscuro (42 g, 94 %), con una pureza aproximada del 90 % en peso en función de la comparación de RMN ^1H con anisol como estándar interno. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7,76-7,72 (m, 1H), 7,68-7,66 (m, 1H), 7,43 (t, $J = 7,6$ Hz, 1H), 7,36-7,33 (m, 1H), 7,23 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H), 6,74-6,72 (m, 1H), 4,28-4,22 (m, 1H), 3,67 (d, $J = 16,2$ Hz, 1H), 3,62-3,49 (m, 9H), 3,11 (t, $J = 4,6$ Hz, 2H), 2,91 (dd, $J = 11,8, 5,5$ Hz, 1H), 2,87 (t, $J = 5,1$ Hz, 2H), 2,58 (dd, $J = 11,7, 7,4$ Hz, 1H), 2,44 (s, 3H). ES/EM m/z ($^{35}\text{Cl}/^{37}\text{Cl}$) 502/504 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Ejemplo 1

2-Ciano-1-[4-[[N'-ciano-N-[2-[2-[2-[3-[(4S)-6,8-dicloro-2-metil-3,4-dihidro-1H-isoquinolin-4-il]fenil]sulfonilamino]etoxi]etoxi]etil]carbamidooil]amino]butil]-3-[2-[2-[2-[3-[(4S)-6,8-dicloro-2-metil-3,4-dihidro-1H-isoquinolin-4-il]fenil]sulfonilamino]etoxi]etoxi]etil]guanidina



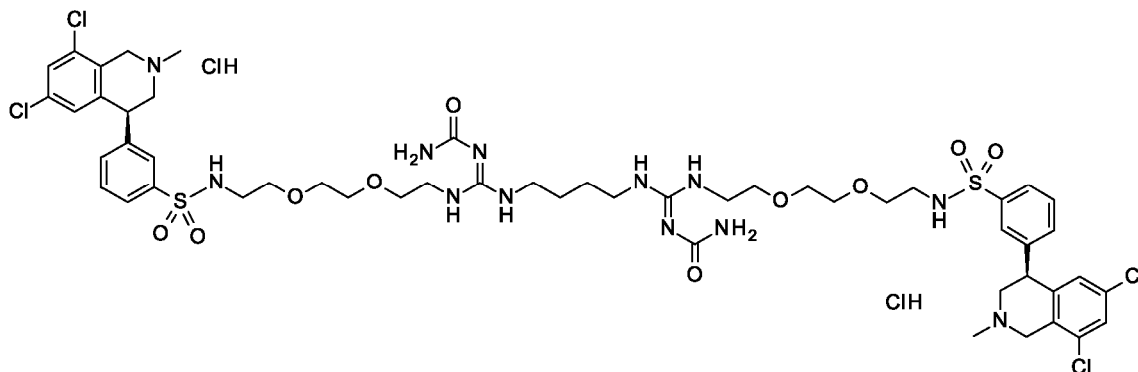
A una solución de N-[2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]etil]-3-[(4S)-6,8-dicloro-2-metil-3,4-dihidro-1H-isoquinolin-4-il]bencenosulfonamida (preparada de acuerdo con la Preparación 5; 740 mg, 1,47 mmol) en 1,4-dioxano (10 ml) y piridina (10 ml), añadir difenoximetilenocianamida (351 mg, 1,47 mmol) y agitar a TA en una atmósfera de nitrógeno durante una noche. Añadir butano-1,4-diamina (65 mg, 0,74 mmol) y calentar a 60 °C durante 24 h, después calentar a 90 °C durante una noche. Enfriar la mezcla de reacción a TA. Diluir la mezcla de reacción con EtOAc, lavar con carbonato potásico acuoso al 5 % dos veces, secar sobre sulfato de magnesio anhidro, filtrar y concentrar al vacío para obtener un aceite de color naranja. Purificar la mezcla en bruto por cromatografía en columna sobre gel de sílice eluyendo con un gradiente de MeOH del 0 al 10 % en DCM para obtener el compuesto del título en forma de una espuma de color amarillo (591 mg, 67 %). ES/EM m/z (^{35}Cl) 1193 $[\text{M}+\text{H}]^+$

Síntesis alternativa

A una solución de N-[2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]etil]-3-[(4S)-6,8-dicloro-2-metil-3,4-dihidro-1H-isoquinolin-4-il]bencenosulfonamida (preparada de acuerdo con la Preparación 6; 90 % en peso de pureza, 24,5 g, 44 mmol) en 1,4-dioxano (240 ml), añadir piridina (17,7 ml, 219 mmol) y difenoximetilenocianamida (10,5 g, 44 mmol) y agitar a TA en una atmósfera de nitrógeno durante una noche. A la mezcla de reacción, añadir butano-1,4-diamina (1,93 g, 21,9 mmol), dividir la reacción en cuatro porciones iguales y calentar cada porción a 90 °C durante 21 h. Añadir butano-1,4-diamina (102 mg, 1,16 mmol) y 1,4-dioxano (5 ml) a cada porción de la reacción y continuar calentando a 90 °C durante 23 h. Añadir butano-1,4-diamina (42 mg, 0,48 mmol) y 1,4-dioxano (5 ml) a las porciones de la mezcla de reacción que muestren una relación superior a 1:5 de intermedio de cianoisourea: compuesto del título según lo determinado por CL-EM. Continuar calentando todas las porciones de la mezcla de reacción a 90 °C durante la noche y después enfriar a temperatura ambiente. Combinar las porciones de reacción. Combinar la mezcla con otros dos lotes preparados esencialmente de la misma manera usando N-[2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]etil]-3-[(4S)-6,8-dicloro-2-metil-3,4-dihidro-1H-isoquinolin-4-il]bencenosulfonamida (90 % en peso de pureza) (10,05 g, 18,00 mmol y 5,20 g, 9,32 mmol respectivamente). Retirar los disolventes a presión reducida, disolver el residuo en DCM (250 ml), después lavar los orgánicos con carbonato potásico acuoso al 5 % (2 x 80 ml). Combinar los lavados acuosos y extraer con DCM (2 x 40 ml). Combinar todos los lavados orgánicos y lavar con cloruro sódico acuoso saturado (80 ml). Secar la parte orgánica sobre sulfato sódico anhidro, filtrar y concentrar a presión reducida para obtener un aceite de color pardo amarillento. Purificar el material en bruto mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice eluyendo con un gradiente de EtOH del 8 al 16 % en DCM. Luego volver a purificar el material dos veces por cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con gradientes de MeOH del 5 al 12 % y del 2 al 12 % en DCM. Volver a purificar las fracciones impuras mediante cromatografía sobre gel de sílice con un gradiente de MeOH del 2 al 12 % en DCM y combinar los materiales puros para obtener el compuesto del título en forma de un sólido espumoso de color blanquecino (15,3 g, 36 %). ES/EM m/z (^{35}Cl) 1193 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Ejemplo 2

Diclorhidrato de [[4-[[N'-carbamoil-N-[2-[2-[2-[3-[(4S)-6,8-dicloro-2-metil-3,4-dihidro-1H-isoquinolin-4-il]fenil]sulfonilamino]etoxi]etoxi]etil]carbamididoil]amino]butilamino]-[2-[2-[2-[3-[(4S)-6,8-dicloro-2-metil-3,4-dihidro-1H-isoquinolin-4-il]fenil]sulfonilamino]etoxi]etoxi]etilamino]metileno]urea



5

Al Ejemplo 1 (670 mg, 0,562 mmol), añadir ácido trifluoroacético (10 ml) y agua (1 ml) y agitar a TA durante una noche. Retirar los volátiles a presión reducida. Disolver el residuo en una cantidad mínima de MeOH y purificar a través de una columna Isolute® SCX de 10 g para obtener una espuma de color amarillo (629 mg). Purificar mediante HPLC preparativa [columna: Phenomenex® Kinetex® EVO C₁₈ 100 x 30 mm, tamaño de partícula de 5 µm, calentador en línea a 50 °C; eluyente: 51 a 86 % (MeOH al 5 % en NH₄HCO₃ 10 mM) en ACN] para obtener el compuesto del título como una base libre en forma de un aceite de color naranja (253 mg, 37 %). ES/EM m/z (³⁵Cl) 1229 [M+H]⁺. En un vial, disolver el compuesto de base libre (223 mg, 0,181 mmol) en DCM (0,5 ml) y añadir ácido clorhídrico (solución 1 M en éter dietílico, 1 ml) gota a gota con agitación. Sólidos de color blanco precipitan fuera de la solución. Agitar la mezcla durante 5 min y después concentrar al vacío para obtener el compuesto del título en forma de un polvo fino de color blanco (236 mg, 100 %). ES/EM m/z (³⁵Cl) 1229 [base libre M+H]⁺, 1227 [base libre M-H]⁺

10

15

Síntesis alternativa

Preparar dos mezclas de porciones iguales de la siguiente manera: Para cada porción, mezclar el compuesto del Ejemplo 1 (5,1 g, 4,3 mmol), ácido clorhídrico 4 M en dioxano (50 ml, 200 mmol) y agua (25 ml). Calentar cada solución a 65 °C durante 2 h. Enfriar las mezclas a TA y agitar a TA durante una noche, después combinarlos con otro lote esencialmente de la misma manera, partiendo con el compuesto del Ejemplo 1 (3,1 g, 2,6 mmol). Concentrar la mezcla al vacío. Añadir agua/EtOH (1:2, 100 ml) al residuo y concentrar al vacío. Repetir esta operación tres veces. Al residuo, añadir EtOH y agitar a 45 °C durante 10 min, después concentrar al vacío. Repetir esta operación tres veces. Secar el residuo al vacío a TA durante 22 h. Al residuo, añadir otro lote de producto preparado esencialmente de la misma manera como se ha descrito anteriormente con el Ejemplo 1 (1 g, 0,8 mmol). Secar al vacío a TA durante 23 h, 50 °C 16 h, 55 °C 6 h y a TA durante 72 h para producir el compuesto del título (14,7 g, 94 %). ES/EM m/z (³⁵Cl) 1229 [base libre M+H]⁺.

20

25

30

Ensayos**Actividad de inhibición *in vitro* de NHE3**

Para crear un ensayo de NHE3, las células que expresan selectivamente NHE3 se generan sobreexpresando NHE3 humano en una línea celular endógenamente deficiente en NHE. La línea celular deficiente en NHE se crea mediante mutagénesis inducida por productos químicos. Después de la mutagénesis, las células deficientes en NHE se seleccionan sometiendo las células cargadas de litio (Li) a un entorno extracelular ácido. En estas condiciones, el NHE intercambia Li⁺ intracelular para protones extracelulares, por tanto, sólo las células deficientes en NHE pueden evitar una acidosis intracelular tóxica y sobrevivir.

35

40

Una línea celular deficiente en NHE, NHD C8, se genera por mutagénesis y selección a partir de la línea celular Dede (ATCC® CCL-39™). La mutagénesis se induce tratando células Dede CCL-39 con EMS (Sigma-Aldrich) en medios de cultivo a una concentración final de 500 µg/ml durante 20 horas. Las células deficientes en NHE se seleccionan cultivándolas en una solución de LiCl (LiCl 130 mM, KCl 5 mM, MgSO₄ 1 mM, CaCl₂ 2 mM, glucosa 5 mM y Hepes-Tris 20 mM, pH 7,4) durante 2 horas, seguido de cultivo en una solución de cloruro de colina (cloruro de colina 130 mM, KCl 5 mM, MgSO₄ 1 mM, CaCl₂ 2 mM, y ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico-Tris 20 mM, pH 5,5) durante 30 minutos. Las células supervivientes después de crecer en medios de cultivo estándar hasta una confluencia del 90 % se someten a un segundo ciclo de selección. Las colonias de un solo clon se aíslan, se cultivan hasta la confluencia total y se someten a un tercer ciclo de selección. Los clones supervivientes se expanden y se analizan en cuanto a la actividad del intercambiador de sodio-hidrógeno (véase el ensayo a continuación).

45

50

El ADNc que codifica NHE3 humano con una etiqueta myc se subclona en el plásmido pcDNA3.1 y se genera una línea celular estable en las células NHD C8 deficientes en NHE mencionadas anteriormente. Las células que sobreexpresan NHE3 de forma estable se mantienen en medio 5A de McCoy (Hyclone-GE Healthcare Bioscience) con 10 % de FBS, 400 mg/ml de G418 (Gibco-ThermoFisher Scientific) y solución antibiótica/antimicótica.

Para medir la actividad del NHE, el pH intracelular de las células se reduce mediante la adición de NH_4Cl . El cambio de pH intracelular dependiente del sodio se mide luego con el tinte de fluoresceína sensible al pH intracelular, BCECF-AM (Molecular Probes-ThermoFisher Scientific). Las células NHD8/NHE3 se dispersan con una pipeta multicanal en placas de poli-D-lisina de 96 pocillos (Corning) a razón de 30.000 por pocillo. Las células se incuban a 37 °C más 5 % de CO_2 durante 24 horas. Los medios de cultivo celular se aspiran, las células se lavan con 100 μl de solución NaCl-HEPES (NaCl 100 mM, glucosa 10 mM, KCl 5 mM, CaCl_2 2 mM, MgCl_2 1 mM, BSA al 0.1 %, HEPES 50 mM, pH 7) dos veces y luego las células se incuban con 100 μl de BCECF-AM 5 μM en NH_4Cl /pluronic F-127/solución de probenecid (NH_4Cl 130 mM, KCl 5 mM, CaCl_2 2 mM, MgCl_2 1 mM, BSA al 0.1 %, 0,0625 % de pluronic F-127, probenecid 2 mM, HEPES 20 mM, pH 7) durante 60 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación, las células se lavan con 100 μl de solución libre de amonio, libre de sodio de HEPES/BSA al 0,1 % (cloruro de colina 100 mM, glucosa 10 mM, KCl 5 mM, CaCl_2 2 mM, MgCl_2 1 mM, BSA al 0.1 %, HEPES 50 mM, pH 7) dos veces. A continuación, a los pocillos adecuados se añaden 86 μl de solución libre de amonio, libre de sodio de HEPES/BSA al 0,1 % que contiene amilorida 30 μM con compuesto o controles. La actividad de NHE se inicia mediante la adición de 14 μl de NaCl 1 M para lograr una concentración final de 140 mM. La placa se lee inmediatamente para determinar la intensidad fluorescente a una longitud de onda de excitación de 505 nm y una longitud de onda de emisión de 550 nm. El porcentaje de inhibición en cada concentración probada se calcula en relación con la actividad de NHE con un 1 % de DMSO como un 0 % de inhibición y la actividad de NHE con una concentración saturante de un inhibidor estándar como un 100 % de inhibición. Una curva de respuesta de 9 concentraciones de 1000 nM a 0,152 nM más ningún compuesto se ajusta a un modelo de 4 parámetros usando Prism para determinar la Cl_{50} .

El ejemplo 2 inhibe el NHE3 humano de forma dependiente de la concentración con una Cl_{50} de 5,76 nM (media geométrica de Cl_{50} individual, $n = 7$ con un error estándar de la media geométrica de 0,72). El ejemplo 2 es selectivo para NHE3, en que no era un potente inhibidor de NPT2b ($\text{Cl}_{50} = 58,4 \mu\text{M}$) o SGLT1 ($\text{Cl}_{50} = 6,6 \mu\text{M}$). El ejemplo 1 inhibe el NHE3 humano de forma dependiente de la concentración con una Cl_{50} de 37,9 nM (media geométrica de Cl_{50} individual, $n = 2$ con un error estándar de la media geométrica de 6,2).

Efecto del ejemplo 2 sobre la presión arterial

Ratas macho espontáneamente hipertensas (REH) que pesan 250-300 g con una edad de 7 semanas se aclimatan a un ciclo de luz inverso (8:00 luces apagadas y 20:00 luces encendidas) y se alimentan con comida y agua normales *ad libitum*. Se implantan dispositivos de telemetría implantables (modelo TA11PA-C40, Data Sciences International) en la aorta abdominal. Después de recuperarse de la cirugía, las ratas se colocan en jaulas individuales en una sala tranquila de instalaciones de telemetría para medir la presión arterial (presión arterial media, PAM) y la frecuencia cardíaca (FC). Las señales de presión digitalizadas se adquieren durante 20 segundos cada 5 minutos utilizando el software DSI Dataquest IV 4.0.

Las 31 ratas REH se aleatorizan por PAM en dos grupos y se tratan dos veces al día durante 14 días con vehículo ($n=15$) (10 % acacia, 0,05 % antiespumante en agua purificada) o 0,15 mg/kg/día Ejemplo 2. La primera dosis se administra entre las 6:00 y las 6:30 de la mañana (2 horas antes de que se apaguen las luces) y la segunda dosis se administra entre las 4:00 y las 4:30 de la tarde. También se controlan el consumo diario de alimentos y el aumento de peso corporal.

Los datos de PAM, FC y peso corporal (PC) se analizan mediante análisis de covarianza de medidas repetidas (ANCOVA) con la basal como covariable. Los datos de consumo de alimentos (FC) se analizan mediante análisis de varianza (ANOVA) de medidas repetidas. La presión arterial media a lo largo del curso de tiempo del estudio (días 1-14) para el grupo tratado con 0,15 mg/kg/día del Ejemplo 2 es 4,83 mm Hg menor que la del grupo de control con un valor p de 0,0007 (Tabla 1). No se observa un efecto significativo sobre la FC, el PC o la FC.

Tabla 1: Efecto del Ejemplo 2 sobre la presión arterial media (PAM) en ratas macho espontáneamente hipertensas (REH)

Grupo de tratamiento	Presión arterial media durante los días 1-14 (mm Hg)	ETM	Diferencia (mm Hg)	valor de p
Vehículo	158,16	0,85	4,83	0,0007
Ejemplo 2 0,15 mg/kg/día	153,33	0,97		

Efecto del Ejemplo 1 sobre la absorción de sodio

La excreción urinaria de sodio después de una dosis en bolo oral de cloruro de sodio es una medida indirecta de la absorción de sodio en el intestino.

Los machos Sprague-Dawley con pesos corporales que oscilan entre 200 y 250 g se aleatorizan en grupos basados en pesos corporales medios iguales. En adelante, la siguiente formulación se denominará "1 % de HEC ": 1 % de hidroxietilcelulosa (HEC) y 0,25 % de Tween® 80 con vehículo antiespumante en agua. El ejemplo 1 a 0,1 mg/ml (dosis final de 1 mg/kg en un volumen de 10 ml/kg) se formula con HEC al 1 % en un vial de vidrio que contiene una cantidad previamente pesada del compuesto y luego se somete a ultrasonidos con sonda hasta que aparece como una suspensión uniforme. Para asegurarse de que el compuesto no se adhiera a los lados o al fondo del vial, se añade una barra de agitación a la botella y la suspensión se agita durante todo el proceso de formulación y dosificación. Las soluciones de dosificación posteriores del Ejemplo 1 se preparan mediante diluciones en serie con HEC al 1 %. Se formula NaCl a 10 mg/ml (dosis final de 200 mg/kg en un volumen de 20 ml/kg) añadiendo agua esterilizada.

El día antes del ensayo, los animales se colocan en jaulas limpias sin alimentos pero con acceso a agua para una noche en ayunas. El día del estudio, a las ratas se les dosifica por vía oral el vehículo o dosis variables del Ejemplo 1. 30 minutos después, se administra a los animales NaCl, luego se transfirieron inmediatamente a jaulas metabólicas. Se recogen muestras de orina durante 2 horas. Se registra el volumen neto de orina. El sodio urinario y la creatinina se evalúan utilizando un analizador de bioquímica clínica.

Los valores expresados como la proporción de sodio urinario a creatinina (mM/mM) se calculan y se presentan como media $\pm$ SEM. Las curvas se ajustan con la herramienta de ajuste de curvas logísticas de 4 parámetros GraphPad Prism 6 para calcular la DE50. Con el fin de ajustar la curva, la dosis del Ejemplo 1 se establece artificialmente en 0,001 mg/kg en el software para el grupo de vehículo solo.

Después de la administración oral del Ejemplo 1 y un bolo de NaCl, la excreción urinaria de sodio disminuye en forma dependiente de la dosis (Tabla 2). La DE₅₀ del Ejemplo 1 sobre la excreción urinaria de sodio es de 0,058 mg/kg. La disminución dependiente de la dosis en la excreción urinaria de sodio es consistente con una inhibición dependiente de la dosis de la absorción intestinal de sodio con el Ejemplo 1.

Tabla 2: Efecto del Ejemplo 1 sobre el sodio urinario en ratas

Tratamiento	Proporción de sodio urinario a creatinina (mM/mM, media $\pm$ SEM)
Vehículo (n=8)	1,43 $\pm$ 0,16
Ejemplo 1, 0,03 mg/kg (n = 5)	1,19 $\pm$ 0,19
Ejemplo 1, 0,1 mg/kg (n = 5)	0,80 $\pm$ 0,23
Ejemplo 1, 0,3 mg/kg (n = 5)	0,37 $\pm$ 0,06
Ejemplo 1, 1,0 mg/kg (n = 5)	0,63 $\pm$ 0,23

Efecto del Ejemplo 2 sobre la absorción de sodio y fosfato

La excreción urinaria de sodio y fosfato después de una dosis en bolo oral de fosfato de sodio es una medida indirecta de la absorción de sodio y fosfato en el intestino.

Ratas Sprague-Dawley macho de una edad de aproximadamente 7 semanas con pesos corporales que oscilan entre 195 y 221 g se aleatorizan en grupos basados en pesos corporales medios iguales. El ejemplo 2 a 0,3 mg/ml (dosis final de 3 mg/kg dosificados en un volumen de 10 ml/kg) se formula añadiendo HEC al 1 % a un vial de vidrio que contiene una cantidad previamente pesada del compuesto y luego sometiendo a sondeo con sonda hasta que aparece como una suspensión uniforme. Para asegurarse de que el compuesto no se adhiera a los lados o al fondo del vial, se añade una barra de agitación a la botella y la suspensión se agita durante todo el proceso de formulación y dosificación. Las soluciones de dosificación posteriores del Ejemplo 2 se preparan mediante diluciones en serie con HEC al 1 %. Se formula NaH₂PO₄ a 34,5 mg/ml (dosis final 690 mg/kg dosificados en un volumen de 20 ml/kg) añadiendo agua estéril.

El día del estudio, los animales se colocan en jaulas limpias sin comida pero con acceso a agua durante un ayuno de 4 horas antes del estudio. A las ratas se les dosifica por vía oral el vehículo o dosis variables del Ejemplo 2. 15 minutos después, se administra a los animales agua estéril o NaH₂PO₄, luego se transfirieron inmediatamente a jaulas metabólicas. Se recogen muestras de orina durante 4 horas. Se registra el volumen neto de orina. Se valoran los niveles de sodio urinario, creatinina y fosfato utilizando un analizador de bioquímica clínica. Los valores expresados como la proporción de fósforo o sodio urinario a dietético se calculan y presentan como la media $\pm$ SEM. Las curvas están equipadas con una herramienta de ajuste de curva logística de 4 parámetros GraphPod Prism 6 para calcular la DE50. Con el fin de ajustar la curva, la dosis del Ejemplo 2 se establece artificialmente en 0,00001 mg/kg en el software para el grupo de vehículo solo.

Después de la administración oral del Ejemplo 2 y un bolo de fosfato, la excreción urinaria de sodio y fosfato disminuye de forma dependiente de la dosis (Tabla 3). La DE₅₀ del Ejemplo 2 sobre la excreción urinaria de fósforo es de 0,041 mg/kg y la DE₅₀ del Ejemplo 2 sobre la excreción de sodio es de 0,058 mg/kg. La disminución dependiente de la dosis en la excreción urinaria de sodio y fosfato es consistente con una inhibición dependiente de la dosis de la absorción intestinal de sodio y fosfato con el Ejemplo 2.

Tabla 3: Efecto del Ejemplo 2 sobre el fósforo y el sodio urinarios en ratas

Tratamiento	Proporción de fósforo urinario a dietético (medias $\pm$ SEM)	Proporción de sodio urinario a dietético (medias $\pm$ SEM)
Vehículo	0,297 $\pm$ 0,039	0,271 $\pm$ 0,031
Ejemplo 2, 0,001 mg/kg	0,337 $\pm$ 0,017	0,326 $\pm$ 0,042
Ejemplo 2, 0,003 mg/kg	0,350 $\pm$ 0,023	0,413 $\pm$ 0,055
Ejemplo 2, 0,01 mg/kg	0,320 $\pm$ 0,042	0,290 $\pm$ 0,06
Ejemplo 2, 0,03 mg/kg	0,268 $\pm$ 0,04	0,276 $\pm$ 0,06
Ejemplo 2, 0,1 mg/kg	0,197 $\pm$ 0,045	0,105 $\pm$ 0,042
Ejemplo 2, 0,3 mg/kg	0,168 $\pm$ 0,027	0,039 $\pm$ 0,010
Ejemplo 2, 1 mg/kg	0,191 $\pm$ 0,039	0,051 $\pm$ 0,027
Ejemplo 2, 3 mg/kg	0,144 $\pm$ 0,009	0,022 $\pm$ 0,009

Efecto del Ejemplo 2 en combinación con un Inhibidor de NPT2b (Compuesto A) sobre la absorción de fosfato en ratas

5 *Soluciones de dosificación de inhibidores de NPT2b:* El compuesto A y acetato de poli-1-vinilpirrolidona-co-vinilo (PVP-VA, Sigma-Aldrich) se pesan en una botella en una proporción de 30 % de compuesto A y 70 % de PVP-VA en peso. Se prepara una solución amarilla transparente diluyendo la mezcla en MeOH seguido de la adición de 2 mol de NaOH por mol de Compuesto A utilizando NaOH 5 N. La solución se seca por pulverización con una corriente de nitrógeno caliente y el polvo de dispersión sólido se recoge y luego se seca más en un horno de vacío. Las dosis para la dispersión sólida secada por pulverización (SDD) se expresan como principio farmacéutico activo (PFA) en todo el documento.

10 Para hacer la solución de dosificación del Compuesto A, se pesa una cantidad apropiada de Compuesto A SDD en un vial y se disuelve en agua (10 ml/kg de volumen de dosificación). Para asegurarse de que el compuesto no se adhiera a los lados o al fondo del vial, se añade una barra de agitación a la botella y la suspensión se agita durante los procesos de formulación y dosificación. Las soluciones posteriores para dosis más bajas se preparan mediante diluciones en serie con agua. Se usa PVP-VA a 7 mg/ml como control de vehículo.

20 *Soluciones de dosificación de inhibidores de NHE3:* Para hacer la solución de dosificación del Ejemplo 2, se pesa una cantidad adecuada del compuesto en un vial y se disuelve en HEC al 1 % (volumen de dosificación de 10 ml/kg). Para asegurarse de que el compuesto no se adhiera a los lados o al fondo del vial, se añade una barra de agitación a la botella y la suspensión se agita durante los procesos de formulación y dosificación. Las soluciones posteriores para dosis más bajas se preparan mediante diluciones en serie con HEC.

25 Para hacer la solución de dosificación de fosfato radiomarcado, se prepara una solución de Na₂HPO₄ 16,25 mM, solución salina al 0,9 %, a pH 7,4 y se filtra usando una unidad de filtro de jeringa estéril de 0,22 μ m de polietersulfona, Millex-GP (EMD Millipore). Se añade fosfato radiactivo (H₃³³PO₄, Perkin Elmer) a aproximadamente 2,5 μ Ci por ml de solución y se filtra de nuevo.

30 Se realizan tres estudios separados. En estos estudios, se aleatorizan ratas Sprague-Dawley macho a grupos con pesos corporales medios aproximadamente iguales. Después de un ayuno nocturno, todos los animales se dosifican a 10 ml/kg con cualquiera de los vehículos, dosis variables del Compuesto A (Estudio 1), dosis variables del Ejemplo 2 (Estudio 2) o 1,2 mg/kg de Compuesto A y dosis variables del Ejemplo 2 (Estudio 3). 15 minutos después, el fosfato radiomarcado se dosifica por vía oral en un volumen de 2 ml. 15 minutos después, se recoge la sangre y se prepara el plasma. La radiactividad (dpm) en 50 μ l de plasma se mide mediante recuento de centelleo y se utiliza para calcular la absorción de fosfato. Los resultados se normalizan con los controles de vehículo que representan una absorción del 100 %. Las curvas se ajustan con regresión no lineal con pendiente variable usando GraphPad Prism 6 para calcular la DE₅₀ y E_{máxima} dados en la Tabla 7. A los efectos del ajuste de curvas en el cálculo de la DE₅₀, la dosis del Ejemplo 2 se establece artificialmente en 0,00001 mg/kg en el software para el grupo de vehículo solo en el Estudio 2 y también para el grupo de vehículo + 1,2 mg/kg de Compuesto A en el Estudio 3. No se realizó ningún ajuste de curva para el Compuesto A solo en el Estudio 1.

45 Los resultados de los tres estudios separados realizados en ratas, un estudio de respuesta a la dosis para el Compuesto A (Estudio 1), un estudio de respuesta a la dosis para el Ejemplo 2 (Estudio 2) y un estudio de respuesta a la dosis para el Ejemplo 2 en presencia de 1,2 mg/kg del Compuesto A (Estudio 3) se resumen en las Tablas 4-7 a continuación. El Ejemplo 2 y el Compuesto A inhiben la absorción de fosfato de forma dependiente de la dosis con un porcentaje de inhibición en la dosis más alta probada de 37 % y 18 %, respectivamente. Sin embargo, cuando se administra en combinación, se logra una inhibición del 70 % con la dosis más alta del Ejemplo 2 en combinación con 50 1,2 mg/kg del Compuesto A. Por lo tanto, los dos compuestos son más efectivos cuando se dosifican juntos que

cuando cualquiera de los compuestos se dosifica solo, consistente con cada compuesto que inhibe distintas vías que contribuyen a la absorción intestinal de fosfato en ratas.

Tabla 4: Efecto del compuesto A sobre la absorción de fosfato en ratas (Estudio 1)

Tratamiento	Absorción (frente al control del vehículo, %, media $\pm$ SEM)
Vehículo	100 $\pm$ 7,23
Compuesto A, 0,01 mg/kg	94,39 $\pm$ 7,88
Compuesto A, 0,1 mg/kg	87,61 $\pm$ 6,08
Compuesto A, 1 mg/kg	87,64 $\pm$ 7,26
Compuesto A, 10 mg/kg	81,53 $\pm$ 5,50

5

Tabla 5: Efecto del Ejemplo 2 sobre la absorción de fosfato en ratas (Estudio 2)

Tratamiento	Absorción (frente al control del vehículo, %, media $\pm$ SEM)
Vehículo	100,00 $\pm$ 14,22
Ejemplo 2, 0,001 mg/kg	97,16 $\pm$ 20,76
Ejemplo 2, 0,003 mg/kg	100,81 $\pm$ 20,74
Ejemplo 2, 0,01 mg/kg	75,15 $\pm$ 15,52
Ejemplo 2, 0,03 mg/kg	83,17 $\pm$ 17,99
Ejemplo 2, 0,1 mg/kg	57,29 $\pm$ 11,20
Ejemplo 2, 0,3 mg/kg	71,09 $\pm$ 13,98
Ejemplo 2, 1 mg/kg	44,29 $\pm$ 9,09
Ejemplo 2, 3 mg/kg	60,04 $\pm$ 12,00
Ejemplo 2, 10 mg/kg	63,47 $\pm$ 8,39

Tabla 6: Efecto del compuesto A y el ejemplo 2 en combinación sobre la absorción de fosfato en ratas (Estudio 3)

Tratamiento	Absorción (frente al control del vehículo, %, media $\pm$ SEM)
Vehículo + Compuesto A, 1,2 mg/kg	71,00 $\pm$ 11,63
Ejemplo 2, 0,001 mg/kg + Compuesto A, 1,2 mg/kg	85,61 $\pm$ 5,16
Ejemplo 2, 0,003 mg/kg + Compuesto A, 1,2 mg/kg	70,98 $\pm$ 7,27
Ejemplo 2, 0,01 mg/kg + Compuesto A, 1,2 mg/kg	73,53 $\pm$ 7,29
Ejemplo 2, 0,03 mg/kg + Compuesto A, 1,2 mg/kg	61,82 $\pm$ 6,73
Ejemplo 2, 0,1 mg/kg + Compuesto A, 1,2 mg/kg	44,78 $\pm$ 6,09
Ejemplo 2, 0,3 mg/kg + Compuesto A, 1,2 mg/kg	35,56 $\pm$ 2,86
Ejemplo 2, 1 mg/kg + Compuesto A, 1,2 mg/kg	35,52 $\pm$ 8,67
Ejemplo 2, 3 mg/kg + Compuesto A, 1,2 mg/kg	26,94 $\pm$ 4,94
Ejemplo 2, 10 mg/kg + Compuesto A, 1,2 mg/kg	29,83 $\pm$ 3,72

10

Tabla 7:

	Compuesto A	Ejemplo 2	Ejemplo 2 + 1,2 mg/kg Compuesto A
DE ₅₀ mg/kg	Sin ajuste de curva	0,041	0,056
% de inhibición a la dosis más alta	18 %	37 %	70 %

Efecto del ejemplo 2 en combinación con un inhibidor de NPT2b (Compuesto A) sobre la absorción de fosfato y la retención intestinal de fosfato en ratas

15

El propósito de este estudio es investigar en ratas el efecto del Ejemplo 2, Compuesto A y una combinación del Ejemplo 2/Compuesto A sobre la absorción de fosfato 15 minutos después de dosificar los compuestos y el fosfato retenido en el intestino 4,25 horas después de dosificar los compuestos. Este último es una medida de la carga de fosfato oral que se absorbe durante un período prolongado.

20

En este estudio se utilizan dos vehículos: 1) 1 % de HEC y 2) 0,46 % de acetato de poli-1-vinilpirrolidona-co-vinilo en agua (vehículo PVP-VA). El grupo de control de vehículos en este estudio recibe una combinación 1:1 de los dos vehículos.

25

Las soluciones de dosificación del ejemplo 2, el compuesto A y fosfato se preparan de manera similar a como se ha descrito anteriormente, excepto que las dosis son de 0,4 mg/kg para el Ejemplo 2 y 10 mg/kg para el Compuesto A y se preparan a una concentración en la que se dosificarían en un volumen de 5 ml/kg. Los grupos del Ejemplo 2 y el Compuesto A solo se mezclan 1:1 con el vehículo del otro compuesto, mientras que el Compuesto A y el Ejemplo 2

se mezclan 1:1 antes de la dosificación. El volumen de dosificación final es de 10 ml/kg en todos los casos.

Ratas Sprague Dawley macho se mantienen en ayunas durante 4 horas y luego se les administran vehículos apropiados, 10 mg/kg de compuesto A, 0,4 mg/kg de ejemplo 2, o una combinación de ambos compuestos. 15 minutos después, los animales reciben una dosis de solución de fosfato radiomarcado. 15 minutos después, se recoge la sangre y se prepara el plasma. La radiactividad en el plasma se mide mediante recuento de centelleo y se utiliza para calcular la inhibición de la absorción de fosfato. Mientras que el ejemplo 2 (0,4 mg/kg) inhibe la absorción de fosfato en un 29 % ($P = 0,046$ frente al control con vehículo) y el Compuesto A (10 mg/kg) inhibe la absorción de fosfato en un 35 % ($P = 0,013$ frente al control con vehículo), la combinación de los dos compuestos inhibe la absorción de fosfato en un 63 % ($p = 0,0001$ frente al control con vehículo). El 63 % de inhibición de la combinación del Ejemplo 2/Compuesto A supera la inhibición de cualquiera de los compuestos solos. Los datos se presentan como media $\pm$ SEM con un número de animales igual a 8 para los grupos. La significación estadística se determina mediante ANOVA con una comparación de Dunnett con la combinación del ejemplo 2/compuesto A usando JMP 12.1.

4 horas después de dosificar la solución de fosfato radiomarcado, se recogen el estómago, el intestino delgado, el intestino grueso y las heces, se pesan y se digieren con NaOH 1 N durante la noche a 37 °C. La radiactividad en cada fracción se mide por recuento de centelleo.

El porcentaje de dosis recuperada en el tracto gastrointestinal se define como la radiactividad recuperada en el estómago, intestino delgado, intestino grueso y heces en comparación con la cantidad dosificada. Los datos se presentan como media $\pm$ SEM con un número de animales igual a 8 para los grupos. La significación estadística se determina mediante ANOVA con una comparación de Dunnett con la combinación del ejemplo 2/compuesto A usando JMP 12.1.

Tabla 8: La dosis porcentual recuperada en cada sección del tracto gastrointestinal.

Tratamiento	Estómago	Intestino delgado	Intestino grueso	Heces	Total
Control, PVP + HEC	5,50 $\pm$ 0,89	8,03 $\pm$ 0,54	11,83 $\pm$ 1,09	<0,1	25,36 $\pm$ 1,27
Ejemplo 2, 0,4 mg/kg	3,9 $\pm$ 0,49	8,64 $\pm$ 0,32	18,16 $\pm$ 2,58	<0,1	30,7 $\pm$ 2,43
Compuesto A, 10 mg/kg	4,86 $\pm$ 1,13	8,98 $\pm$ 0,48	18,43 $\pm$ 2,03	<0,1	32,27 $\pm$ 1,38
Ejemplo 2 + Compuesto A	6,23 $\pm$ 0,80	10,76 $\pm$ 0,67	28,98 $\pm$ 1,93	<0,1	45,96 $\pm$ 1,33

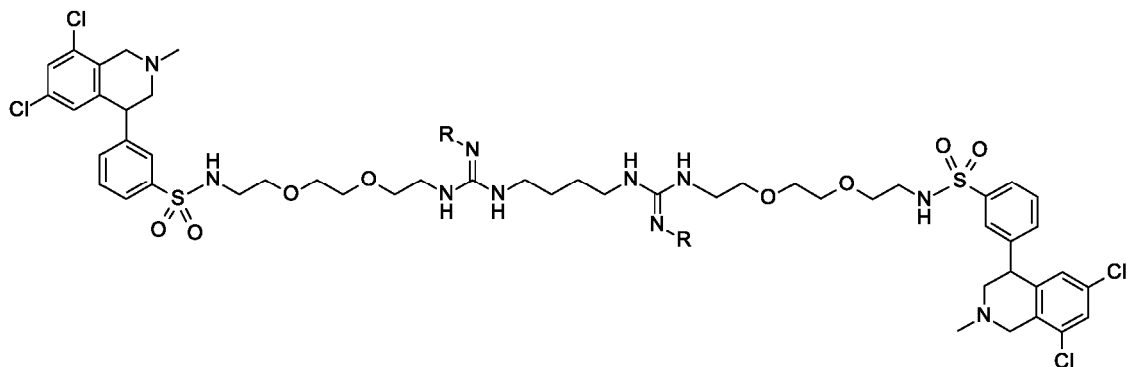
Porcentaje de dosis de fosfato radiomarcado recuperada de cada sección del tracto GI, media $\pm$ SEM

La radiactividad total recuperada es mayor en los animales a los que se dosificó tanto el ejemplo 2 como el compuesto A (46 %) que con cualquiera de los dos solos (31 % y 32 %, respectivamente) (Tabla 8). Por lo tanto, la combinación es más efectiva que cualquier compuesto solo.

El porcentaje de dosis recuperada en los datos del tracto gastrointestinal se analiza adicionalmente mediante un ANOVA de dos vías en JMP 12.1 para probar la aditividad de los efectos del ejemplo 2 y el compuesto A sobre la inhibición de la absorción de fosfato. La prueba de la interacción ejemplo 2/compuesto A es significativa ($p=0,0187$), lo que indica una relación sinérgica entre los compuestos a las dosis probadas en este estudio. Es decir, el efecto inhibitorio de la combinación es mayor que la suma de los efectos de los compuestos individuales.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula:



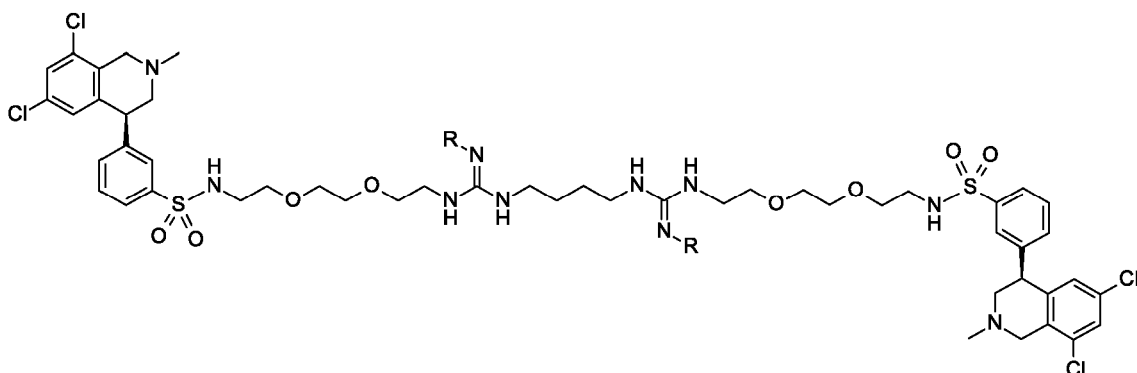
5

en donde ambos R son CN o ambos R son C(O)NH₂, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde ambos R son C(O)NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10

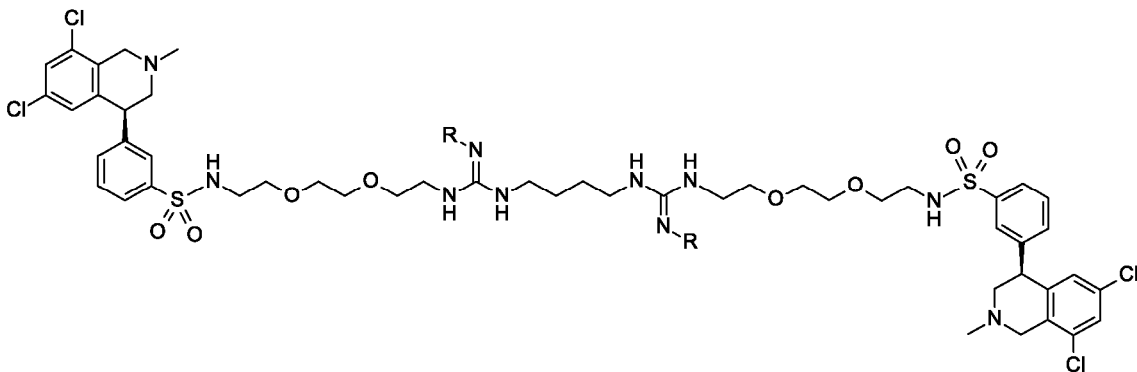
3. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el compuesto es:



15

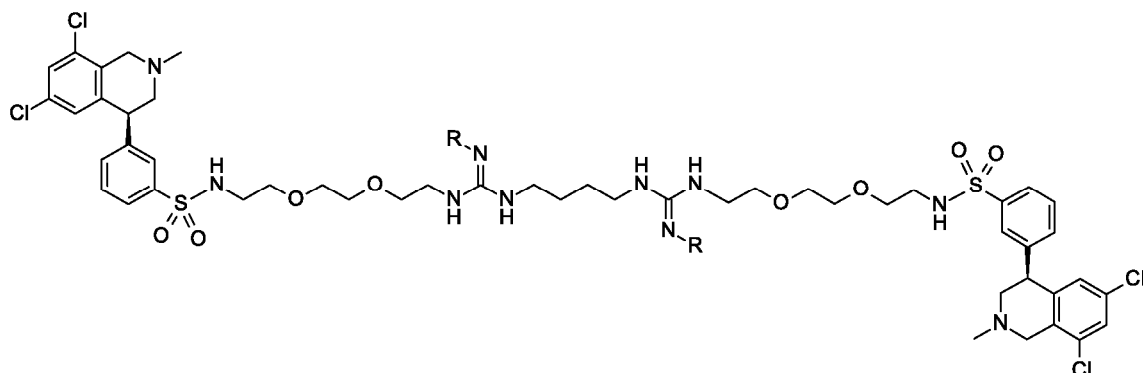
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

4. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el compuesto es:

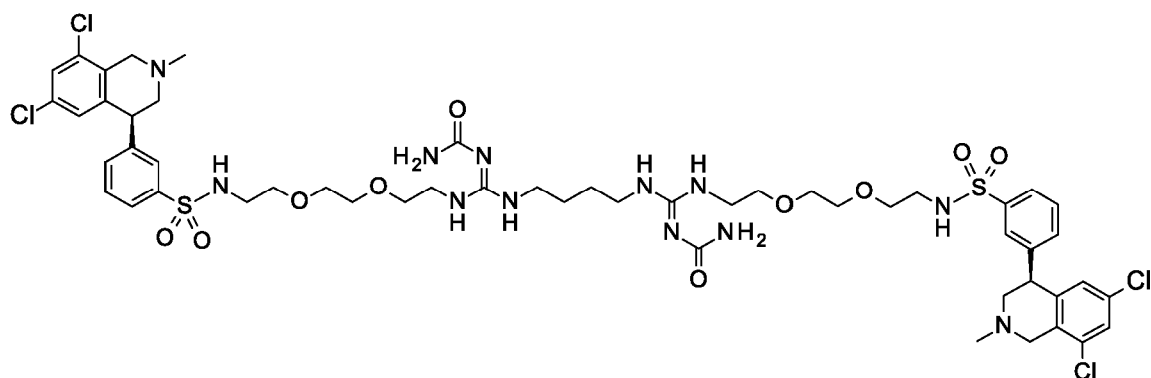


20

5. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el compuesto es la sal diclorhidrato de:

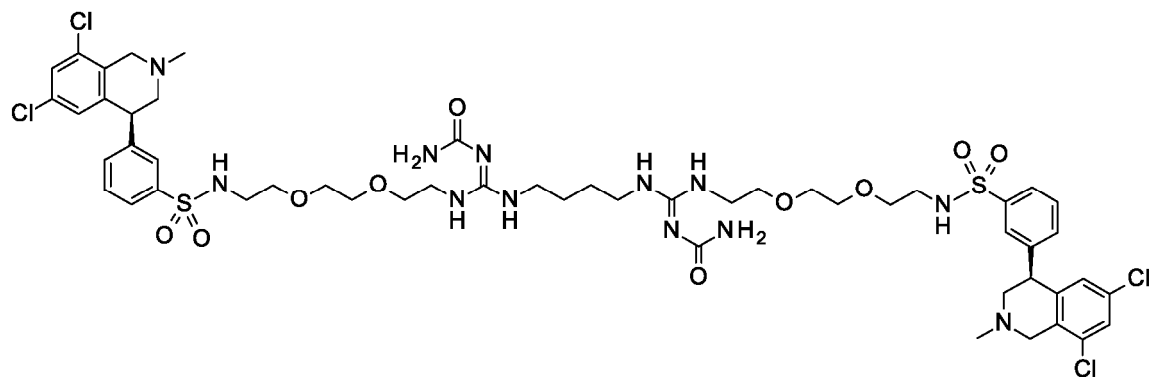


6. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que es:



5

7. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que es la sal diclorhidrato de:



10

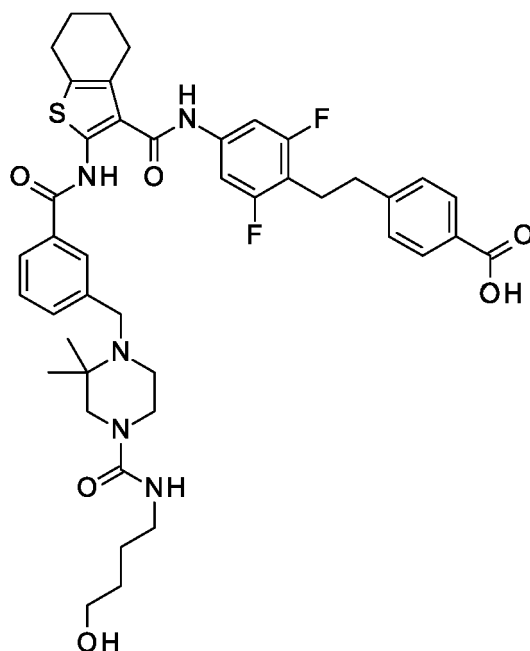
8. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en terapia.

15

9. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de nefropatía crónica, hiperfosfatemia, hiperparatiroidismo secundario, insuficiencia cardíaca, hipertensión o enfermedad cardiovascular.

20

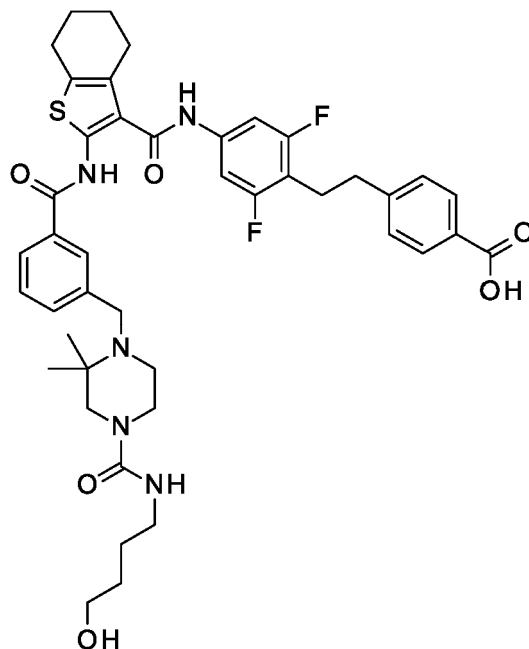
10. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en combinación simultánea, separada o secuencial con un compuesto de la fórmula:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el tratamiento de la nefropatía crónica, hiperfosfatemia, hiperparatiroidismo secundario, insuficiencia cardíaca o enfermedad cardiovascular.

5

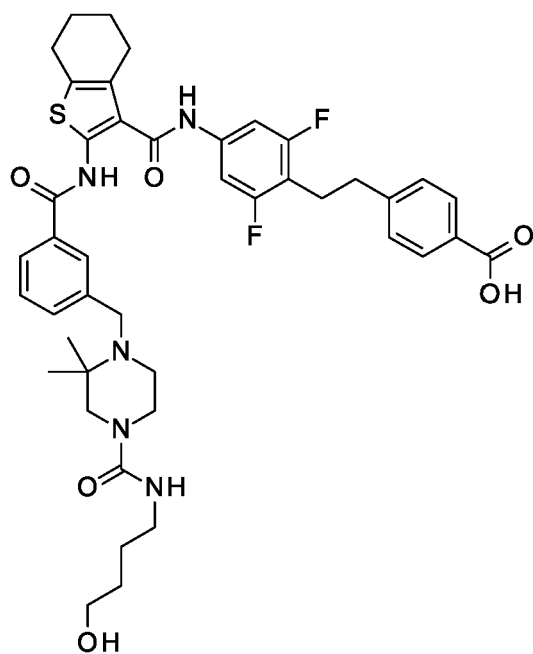
11. Un compuesto de la fórmula:



10 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en combinación simultánea, separada o secuencial con el compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el tratamiento de la nefropatía crónica, hiperfosfatemia, hiperparatiroidismo secundario, insuficiencia cardíaca o enfermedad cardiovascular.

15 12. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o una sal del mismo, con un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

13. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 12 que comprende adicionalmente un compuesto de fórmula:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.