

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 834 131**

51 Int. Cl.:

**C07F 9/06** (2006.01)

**C07F 9/09** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.11.2014** **PCT/US2014/064447**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.05.2015** **WO15069961**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.11.2014** **E 14859359 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.08.2020** **EP 3065727**

54 Título: **Nuevas sales de profármacos**

30 Prioridad:

**06.11.2013 US 201361900878 P**

**06.11.2013 US 201361900946 P**

**06.11.2013 US 201361900919 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**16.06.2021**

73 Titular/es:

**AEROMICS, INC. (100.0%)**  
**11000 Cedar Avenue, Suite 270**  
**Cleveland, OH 44106, US**

72 Inventor/es:

**PELLETIER, MARC F.;**  
**MCGUIRK, PAUL ROBERT;**  
**FARR, GEORGE WILLIAM;**  
**ZAMBONI, ROBERT;**  
**COLUCCI, JOHN y**  
**ZAGHDANE, HELMI**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

### Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 834 131 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

Nuevas sales de profármacos

Esta solicitud reivindica prioridad de la solicitud provisional de EE.UU. No. 61/900.878 presentada el 6 de noviembre de 2013, de la solicitud provisional de EE.UU. No. 61/900.946 presentada el 6 de noviembre de 2013 y de la solicitud provisional de EE.UU. No. 61/900.919 presentada el 6 de noviembre de 2013.

## Campo técnico

Se pueden usar nuevas sales de profármacos de inhibidores selectivos de las acuaporinas, por ej., de acuaporina-4 y/o acuaporina-2, como productos farmacéuticos y composiciones farmacéuticas que las comprenden, y se pueden usar nuevos intermedios y procedimientos para su síntesis. Estas nuevas sales de profármacos son útiles, por ej., en la profilaxis, tratamiento y control de afecciones mediadas por acuaporinas, por ej., enfermedades de desequilibrio hídrico, por ejemplo edema (particularmente edema del cerebro y la médula espinal, por ej., después de un traumatismo o apoplejía isquémica, así como edema asociado con glioma, meningitis, mal de montaña agudo, ataque epiléptico, infección, trastorno metabólico, hipoxia, intoxicación por agua, insuficiencia hepática, encefalopatía hepática, cetoacidosis diabética, absceso, eclampsia, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob y lupus cerebritis, así como edema como consecuencia de la microgravedad y/o exposición a la radiación, así como edema del nervio óptico, por ej., edema del nervio óptico como consecuencia de la microgravedad y/o exposición a la radiación, así como edema como consecuencia de un procedimiento invasivo del sistema nervioso central, por ej., neurocirugía, eliminación de coágulos endovasculares, punción lumbar, reparación de aneurismas o estimulación cerebral profunda, así como edema de retina, así como edema pulmonar, así como inflamación cerebral como consecuencia de paro cardíaco, por ej., relacionado con el desarrollo de acidosis metabólica (p. ej., acidosis láctica) debido a hipoxia antes del período de reanimación), así como hiponatremia y retención excesiva de fluidos, síndrome de hiperestimulación ovárica y enfermedades como epilepsia, isquemia retiniana y otras enfermedades del ojo asociadas con anomalías en la presión intraocular y/o hidratación tisular, isquemia miocárdica, isquemia miocárdica/lesión por reperfusión, infarto de miocardio, hipoxia miocárdica, insuficiencia cardíaca congestiva, sepsis, neuromielitis óptica y glioblastoma, así como fibromialgia, esclerosis múltiple y migrañas.

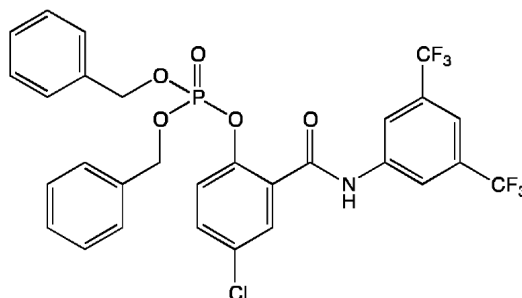
## Antecedentes

Las acuaporinas son proteínas de la membrana celular que actúan como canales moleculares de agua para mediar el flujo de agua dentro y fuera de las células. Si bien existe cierto grado de difusión pasiva u ósmosis de agua a través de las membranas celulares, el transporte rápido y selectivo de agua dentro y fuera de las células implica acuaporinas. Estos canales de agua conducen selectivamente moléculas de agua dentro y fuera de la célula, mientras bloquean el paso de iones y otros solutos, preservando así el potencial de membrana de la célula. Las acuaporinas se encuentran en prácticamente todas las formas de vida, desde bacterias hasta plantas y animales. En los seres humanos, se encuentran en células de todo el cuerpo.

Los inhibidores de las acuaporinas, por ej., inhibidores de AQP4 y/o AQP2, pueden ser útiles en el tratamiento o control de enfermedades de desequilibrio hídrico, por ejemplo edema (particularmente edema del cerebro y médula espinal), hiponatremia y retención excesiva de fluidos, así como enfermedades tales como epilepsia, isquemia retiniana y otras enfermedades del ojo, isquemia miocárdica, lesión por reperfusión/isquemia miocárdica, infarto de miocardio, hipoxia miocárdica, insuficiencia cardíaca congestiva, sepsis y neuromielitis óptica, así como migrañas.

Antes de las presentaciones de los solicitantes, no se conocían inhibidores específicos validados de las acuaporinas, por ej., AQP4 o AQP2. En un momento se informó de ciertos fármacos antiepilépticos o sulfonamidas (p. ej., acetilsulfanilamida, acetazolamida, 6-etoxi-benzotiazol-2-sulfonamida, topiramato, zonisamida, fenitoína, lamotrigina y sumatriptán) como posibles inhibidores de AQP4, pero posteriormente se demostró que era incorrecto. Yang, et al., Bioorganic & Medicinal Chemistry (2008) 16: 7489-7493. No se ha informado de ningún inhibidor directo de AQP2.

La patente de EE.UU. No. 7.626.042 informa de un procedimiento para preparar dihidrógeno-fosfato de 2-([3,5-bis(trifluorometil)fenil]carbamoil)-4-clorofenilo a partir del Compuesto No. 50:



La patente de EE.UU. No. 7.626.042 describe que se añadió hidróxido de paladio sobre carbono al Compuesto No.

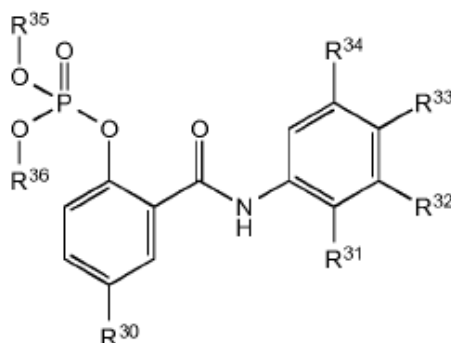
50 en acetato de etilo y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora en atmósfera de hidrógeno.

Li J et al., (Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, Vol. 8, No. 22, 17 de noviembre de 1998, páginas 3159-3164) describe el uso de  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ -trimetilsililo como grupo protector para derivados de fosfato de un compuesto de benceno sin sustituyentes halógenos.

- 5 Por tanto, existe la necesidad de compuestos que inhiban selectivamente a las acuaporinas. Además, existe la necesidad de compuestos que puedan formularse para administrar compuestos que inhiban selectivamente a las acuaporinas, por ejemplo, compuestos que pueden ser solubles en medios acuosos y/o pueden administrarse fácilmente a pacientes.

### Breve compendio

- 10 Se proporciona un compuesto de Fórmula III



en donde:

$\text{R}^{30}$  es halógeno (por ejemplo, Cl o Br),  $\text{R}^{31}$  y  $\text{R}^{33}$  son H y  $\text{R}^{32}$  y  $\text{R}^{34}$  son independientemente haloalquilo  $\text{C}_{1-4}$ ; y

- 15  $\text{R}^{35}$  y  $\text{R}^{36}$  son independientemente  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_n-\text{Si}(\text{R}^{37})_3$ , en donde cada  $\text{R}^{37}$  es independientemente alquilo  $\text{C}_{1-6}$ , por ej.,  $\text{C}_{1-4}$ -alquilo y n es 0 o 1.

También se proporciona un procedimiento para sintetizar un compuesto de Fórmula IV que comprende desproteger un compuesto de Fórmula III.

También se proporciona un procedimiento para sintetizar un compuesto de Fórmula III.

- 20 Otras áreas de aplicabilidad de la presente descripción resultarán evidentes a partir de la descripción detallada proporcionada a continuación. Debe entenderse que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican la realización preferida de la descripción, están destinados únicamente a fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la descripción.

### Breve descripción de los dibujos

- 25 La Figura 1 muestra los resultados del ensayo de cambio de volumen celular mediado por acuaporina-4 (Figura 1A) y acuaporina-2 (Figura 1B), y el efecto inhibitorio de 5-cloro-N-(3,5-diclorofenil)-2-hidroxibenzamida (Compuesto 3) contra estas acuaporinas.

La Figura 2 muestra la especificidad de 5-cloro-N-(3,5-diclorofenil)-2-hidroxibenzamida (Compuesto 3) hacia AQP-1, AQP-2, AQP-4-M1, AQP-4-M23 y AQP-5.

- 30 La Figura 3 representa un ensayo de estilo Hummel-Dryer para la unión de N-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-2-hidroxi-5-(trifluorometil)benzamida (Compuesto 4) marcada con  $[^3\text{H}]$  a AQP4b purificada.

La Figura 4 representa las curvas de porcentaje de supervivencia para el modelo de toxicidad del agua en ratón usando 0,76 mg/kg de N-[3,5-bis(trifluorometil)fenil]-5-cloro-2-hidroxibenzamida (Compuesto 1).

- 35 La Figura 5 representa la inhibición de la formación de edema cerebral por N-[3,5-bis(trifluorometil)fenil]-5-cloro-2-hidroxibenzamida (Compuesto 1) en el modelo de toxicidad del agua en ratón mediante análisis por MRI del volumen cerebral, con n = 14 ratones/tratamiento. Se muestra una evolución en el tiempo de la formación de edema comparando ningún fármaco con N-[3,5-bis(trifluorometil)fenil]-5-cloro-2-hidroxibenzamida (Compuesto 1) a 0,76 mg/kg. El primer punto de tiempo a 5,67 min coincide con el corte de barrido en el centro del cerebro durante el primer barrido posterior a la inyección. Otros puntos de tiempo se ubican de manera similar. Los datos se ajustan a una única ecuación exponencial:

- 40 
$$V/V_0 = V_i + dV_{\max}(1-e^{-kt});$$

donde  $V/V_0$  = volumen cerebral relativo,  $V_i$  = volumen cerebral relativo inicial,  $dV_{\max}$  = cambio máximo en el volumen cerebral relativo,  $k$  = constante de velocidad de primer orden ( $\text{min}^{-1}$ ) y  $t$  = tiempo en minutos.

La Figura 6 representa el ensayo de punto final de fluorescencia de calceína utilizado para la exploración de alto rendimiento.

- 5 La Figura 7 representa la validación de aciertos usando el ensayo de desintegración celular de acuaporinas; el recuadro muestra la estructura de 5-cloro-*N*-(3,5-diclorofenil)-2-hidroxibenzamida (Compuesto 3).

La Figura 8 representa la reducción de la presión intracraneal (ICP) en el modelo de toxicidad del agua en ratón con *N*-[3,5-bis(trifluorometil)fenil]-5-cloro-2-hidroxibenzamida (Compuesto 1) a 0,76 /mg/kg.

- 10 La Figura 9 muestra los niveles plasmáticos y séricos de *N*-[3,5-bis(trifluorometil)fenil]-5-cloro-2-hidroxibenzamida (Compuesto 1) convertida a partir de la sal de bis-etanolamina de fosfato de 2-[[3,5-bis(trifluorometil)fenil]carbamoilo]-4-clorofenilo.

La Figura 10 representa el modelo de apoplejía isquémica por oclusión de la arteria cerebral media (MCAo) en ratón.

La Figura 11 representa el cambio relativo en el volumen del hemisferio cerebral en el modelo de oclusión de la arteria cerebral media (MCAo) en ratón.

- 15 La Figura 12 representa el resultado neurológico después de MCAo en ratones tratados con solución salina (sin fármaco, •) o el compuesto 5 (o) fosfato de (2-[[3,5-bis(trifluorometil)fenil]carbamoilo]-4-clorofenilo, sal disódica).

### Descripción detallada

La siguiente descripción de las realizaciones preferidas es meramente de naturaleza ejemplar y de ninguna manera pretende limitar la presente descripción, su aplicación o usos.

- 20 La expresión de acuaporina-4 (AQP4) está regulada al alza en modelos animales de traumatismo, apoplejía e intoxicación por agua, así como alrededor de tumores cerebrales malignos en seres humanos. Se ha demostrado que la acuaporina-4 (AQP4) desempeña un papel fundamental en el desarrollo del edema cerebral y de la médula espinal. AQP4 proporciona la ruta principal para el movimiento del agua a través de la barrera hematoencefálica (BBB) y *glia limitans*. Los ratones knockout AQP4, sin el gen AQP4, tienen una mayor supervivencia en comparación con los ratones silvestres en modelos de apoplejía isquémica, toxicidad por agua, meningitis bacteriana y compresión de la médula espinal.

- El edema cerebral (CE) se puede dividir generalmente en 2 categorías principales: vasogénico y citotóxico. El edema cerebral vasogénico puede ocurrir cuando una brecha en la BBB permite que el agua y los solutos se difundan al cerebro. Se ha informado que los ratones sin AQP4 tienen un mayor edema cerebral en un modelo de hemorragia subaracnoidea, lo que sugiere que puede ser necesaria la AQP4 para la eliminación del agua acumulada en el espacio intercelular. Por el contrario, el edema cerebral citotóxico puede iniciarse por isquemia que puede dar lugar a una menor osmolalidad plasmática en lugar de una BBB quebrantada. La isquemia puede provocar una caída en los niveles de ATP, que se cree que ralentiza la bomba de Na-K ATPasa, lo que da como resultado una absorción de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  a través de vías de fuga. El efecto neto puede ser un desequilibrio osmótico celular, que extrae  $\text{H}_2\text{O}$  en las células (astrocitos más que neuronas) y conduce a un aumento de la ICP. Los modelos en ratón para apoplejía isquémica, toxicidad por agua, meningitis bacteriana y compresión de la médula espinal entran en esta categoría. En estos modelos, se ha informado que los ratones sin AQP4 tienen una menor CE lo que apunta a AQP4 como la vía central para el movimiento del agua en el cerebro durante la formación de CE citotóxica. Sin embargo, los edemas citotóxico y vasogénico no son categorías muy divididas; una lesión que inicialmente causa edema citotóxico puede ser seguida más tarde, por ej., en las próximas horas o días, por edema vasogénico. Esto puede sugerir diferentes tratamientos para el edema cerebral en diferentes momentos.

- Los inhibidores de AQP4 pueden ser de mayor utilidad para ciertas dolencias en las que el control del movimiento del agua medido por AQP4 puede aumentar la neuroexcitación (mediante la alteración de la homeostasis neuronal del potasio) y resultar beneficiosos al reducir la excitación neuronal, por ej., dolencias tales como fibromialgia, esclerosis múltiple, migrañas y convulsiones (en particular, pero no limitadas a, convulsiones asociadas con la epilepsia).

El glioblastoma es un tumor cerebral primario maligno común y agresivo. La inhibición de AQP4 en líneas celulares de glioblastoma humano U87 induce apoptosis.

- La acuaporina-2 (AQP2) es la ruta principal de movimiento del agua en el conducto colector del riñón. El bloqueo de este canal de agua reduciría la reabsorción de agua sin incurrir en desequilibrios electrolíticos ni interferir con la transducción de señales mediada por los receptores de la vasopresina. La evidencia de que un agente bloqueante de AQP2 no produciría desequilibrios electrolíticos y, en cambio, sería un tratamiento eficaz para la hiponatremia, proviene de pacientes con diabetes insípida que carecen de AQP2 funcional. Presentan acuaresis crónica, pero, si se mantiene la hidratación normal, no demuestran ninguna otra consecuencia de su pérdida a largo plazo de la función de AQP2.

Ciertos inhibidores de las acuaporinas se describen en la Solicitud de Patente Internacional No. PCT/US2013/040194.

En la apoplejía u otras enfermedades o afecciones gravemente debilitantes, por ej., cuando el paciente puede estar inconsciente o no puede tragar, se puede preferir una infusión intravenosa o un bolo intravenoso. Además, cuando un paciente ha sufrido una apoplejía o una lesión traumática del cerebro o de la médula espinal, el logro rápido de cantidades terapéuticamente eficaces de agente terapéutico puede ser importante para un resultado terapéutico exitoso. Sin embargo, un agente terapéutico con solo una solubilidad limitada en agua /y/o medios fisiológicos, puede dificultar la administración intravenosa del agente terapéutico.

Las sales de profármacos de inhibidores selectivos de las acuaporinas pueden tener una mejor solubilidad en medios acuosos y/o fisiológicos, por ej., nuevas sales de profármacos de N-[3,5-bis(trifluorometil)fenil]-5-cloro-2-hidroxibenzamida que pueden tener una mejor solubilidad en medios acuosos /y/o fisiológicos.

Una forma de profármaco es un derivado de un ingrediente activo que se convierte en el cuerpo en el ingrediente activo, por ej., un profármaco de N-[3,5-bis(trifluorometil)fenil]-5-cloro-2-hidroxibenzamida es un derivado de N-[3,5-bis(trifluorometil)fenil]-5-cloro-2-hidroxibenzamida que se convierte en el cuerpo en N-[3,5-bis(trifluorometil)fenil]-5-cloro-2-hidroxibenzamida.

Como se usa en el presente documento, "alquilo" es un resto hidrocarbonado saturado, que preferiblemente tiene de uno a seis átomos de carbono, preferiblemente de uno a cuatro átomos de carbono, que puede ser lineal o ramificado. Un "C<sub>1-4</sub>-alquilo" es un alquilo que tiene de uno a cuatro átomos de carbono.

Como se usa en el presente documento, "alquileo" es un resto hidrocarbonado saturado, que preferiblemente tiene de uno a seis átomos de carbono, preferiblemente de uno a cuatro átomos de carbono, que puede ser lineal o ramificado y que tiene dos puntos de unión. Un alquileo C<sub>1-4</sub> es un alquileo que tiene de uno a cuatro átomos de carbono. Por ejemplo, alquileo C<sub>1</sub> es metileno (-CH<sub>2</sub>-).

Como se usa en el presente documento, "halógeno" es F, Cl, Br o I.

Como se usa en este documento, "haloalquilo" es un resto de hidrocarburo saturado, preferiblemente que tiene de uno a seis átomos de carbono, preferiblemente de uno a cuatro átomos de carbono, que puede ser lineal o ramificado, y está mono, di o trisustituido con un halógeno. Para haloalquilo di- o trisustituido, los halógenos pueden ser iguales (por ejemplo, diclorometilo) o diferentes (por ejemplo, clorofluorometilo). Un C<sub>1-4</sub>-haloalquilo es un haloalquilo que tiene de uno a cuatro átomos de carbono.

Como se usa en este documento, "arilo" es un hidrocarburo aromático mono o policíclico (por ej., bicíclico), preferiblemente fenilo, que puede estar opcionalmente sustituido, por ej., opcionalmente sustituido con uno o más grupos seleccionados independientemente de alquilo C<sub>1-6</sub> (por ej., metilo), halógeno (por ej., Cl o F), haloalquilo C<sub>1-6</sub> (por ej., trifluorometilo), hidroxi y carboxi. En algunas realizaciones, el arilo, además de estar sustituido con los grupos descritos en este documento, está además sustituido con un arilo o un heteroarilo para formar, por ej., bifenilo o piridilfenilo.

Como se usa en este documento, "heteroarilo" es un resto aromático mono o policíclico (por ej., bicíclico) en el que uno o más de los átomos que forman el anillo aromático es azufre o nitrógeno en lugar de carbono, por ej., piridilo o tiadiazolilo, que puede estar opcionalmente sustituido, por ej., opcionalmente sustituido con uno o más grupos seleccionados independientemente de alquilo C<sub>1-6</sub> (por ej., metilo), halógeno (por ej., Cl o F), haloalquilo C<sub>1-6</sub> (por ej., trifluorometilo), hidroxi y carboxi.

Como se usa en este documento, "hidroxi" es -OH.

Como se usa en este documento, "carboxi" es -COOH.

Como se usa en este documento, "paciente" incluye un paciente humano o no humano (es decir, animal). En una realización particular, el término abarca tanto humanos como no humanos. En otra realización, el término abarca no humanos. En otra realización, el término abarca humanos.

Como se usa en el presente documento, "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, cuando se administra a un paciente humano o no humano, para proporcionar un beneficio terapéutico tal como la mejora de los síntomas, la desaceleración de la progresión de la enfermedad o la prevención de la enfermedad. La dosis específica de sustancia administrada para obtener un beneficio terapéutico estará, por supuesto, determinada por las circunstancias particulares que rodean el caso, que incluyen, por ej., la sustancia específica administrada, la vía de administración, la afección que se está tratando y el individuo que está siendo tratado.

Como se usa en el presente documento, "bastante rápido" con respecto al inicio de la acción significa que el tiempo que tarda, después de que se administra un compuesto, en observarse una respuesta es 30 minutos o menos, por ejemplo 20 minutos o menos, por ejemplo 15 minutos o menos, por ejemplo 10 minutos o menos, por ejemplo 5 minutos o menos, por ejemplo 1 minuto o menos.

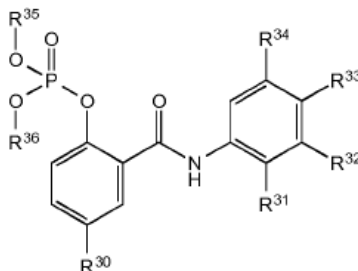
Como se usa en este documento, "fosfato de sodio" se refiere a dihidrógeno-fosfato de sodio (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), hidrógeno-

fosfato disódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) y fosfato trisódico ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ).

Como se usa en este documento, "fosfato de potasio" se refiere a dihidrógeno-fosfato de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), hidrógeno-fosfato dipotásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) y fosfato tripotásico ( $\text{K}_3\text{PO}_4$ ).

- 5 Como se usa aquí, "bolo" se refiere a la administración de un agente terapéutico en una única inyección que dura un período de tiempo relativamente corto, por ej., aproximadamente 5 minutos o menos, por ej., aproximadamente 3 minutos o menos. Un bolo puede administrar rápidamente una cantidad terapéuticamente eficaz del agente terapéutico a la sangre.

En una realización, se proporciona un compuesto de Fórmula III

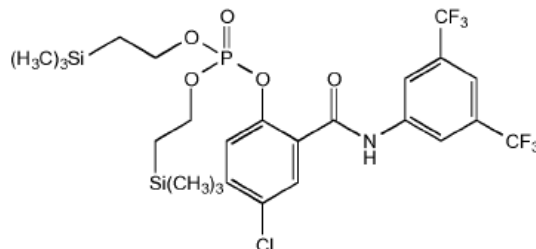


- 10 en donde:

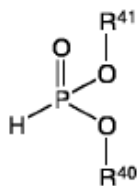
$\text{R}^{30}$  es halógeno (por ej., Cl o Br),  $\text{R}^{31}$  y  $\text{R}^{33}$  son H y  $\text{R}^{32}$  y  $\text{R}^{34}$  son independientemente haloalquilo  $\text{C}_{1-4}$  (por ej.,  $-\text{CF}_3$ ); y  $\text{R}^{35}$  y  $\text{R}^{36}$  son independientemente  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_n\text{-Si}(\text{R}^{37})_3$ , en donde cada  $\text{R}^{37}$  es independientemente alquilo  $\text{C}_{1-6}$  (por ej., alquilo  $\text{C}_{1-4}$ ) y n es 0 o 1.

Se proporciona además un compuesto de Fórmula III como sigue:

- 15 3.1 Fórmula III, en donde  $\text{R}^{30}$  es halógeno (por ej., Cl o Br),  $\text{R}^{31}$  y  $\text{R}^{33}$  son H y  $\text{R}^{32}$  y  $\text{R}^{34}$  son independientemente  $\text{C}_{1-4}$ -haloalquilo (por ej.,  $-\text{CF}_3$ ).
- 3.2 Fórmula 3.1, en donde  $\text{R}^{30}$  es Cl o Br y  $\text{R}^{32}$  y  $\text{R}^{34}$  son  $-\text{CF}_3$ .
- 3.3 Fórmula 3.2, en donde  $\text{R}^{30}$  es Cl.
- 3.4 Fórmula 3.2, en donde  $\text{R}^{30}$  es Br.
- 20 3.5 Fórmula III o 3.1-3.4, en donde  $\text{R}^{35}$  y  $\text{R}^{36}$  se seleccionan independientemente de  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_n\text{-Si}(\text{R}^{37})_3$ , en donde cada  $\text{R}^{37}$  es independientemente  $\text{C}_{1-6}$ -alquilo, por ej., alquilo  $\text{C}_{1-4}$ , por ej.,  $-\text{CH}_3$ , y n es 0 o 1, por ej., 0, por ej., 1.
- 3.6 Fórmula 3.5, en donde n es 1.
- 3.7 Fórmula III o 3.1-3.6, en donde  $\text{R}^{35}$  y  $\text{R}^{36}$  son los mismos.
- 25 3.8 Fórmula III o 3.1-3.7, en donde  $\text{R}^{35}$  y  $\text{R}^{36}$  son  $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-Si}(\text{CH}_3)_3$ .
- 3.9 Fórmula III, en donde el compuesto es



En otra realización más, se proporciona un compuesto de Fórmula XX



en donde:

$R^{40}$  y  $R^{41}$  son independientemente  $-(CH_2CH_2)_n-Si(R^{37})_3$ , en donde cada  $R^{37}$  es independientemente alquilo  $C_{1-6}$  (por ej., alquilo  $C_{1-4}$ ) y  $n$  es 0 o 1. Se proporciona además un compuesto de Fórmula XX como sigue:

5      20.1 Fórmula XX, en donde  $R^{40}$  y  $R^{41}$  se seleccionan independientemente de  $-(CH_2CH_2)_n-Si(R^{37})_3$ , en donde cada  $R^{37}$  es independientemente alquilo  $C_{1-4}$ , por ej.,  $-CH_3$  y  $n$  es 0 o 1.

20.2 Fórmula XX o 20.1, en donde es 1.

20.3 Fórmula XX, 20.1 o 20.2, en donde  $R^{40}$  y  $R^{41}$  son los mismos.

20.4 Fórmula XX o 20.1-20.3, en donde cada  $R^{37}$  es  $-CH_3$ .

10      20.5 Fórmula XX o 20.1-20.4, en donde  $R^{35}$  y  $R^{36}$  son  $-CH_2-CH_2-Si(CH_3)_3$ .

Los compuestos de Fórmula III, por ej., los compuestos de 3.1-3.9, o los compuestos de Fórmula XX, por ej., 20.1-20.5, incluyen sus polimorfos, hidratos, solvatos y complejos.

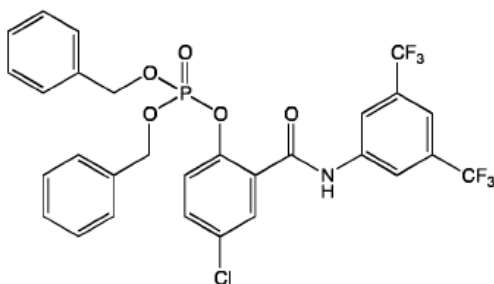
15      Algunos compuestos individuales dentro del alcance de esta descripción pueden contener dobles enlaces. Las representaciones de dobles enlaces en este documento pretenden incluir tanto el isómero E como el Z del doble enlace. Además, algunos compuestos dentro del alcance de esta descripción pueden contener uno o más centros asimétricos. Esta descripción incluye el uso de cualquiera de los estereoisómeros ópticamente puros, así como cualquier combinación de estereoisómeros.

20      También se pretende que los compuestos de Fórmula III, por ej., los compuestos de fórmula 3.1-3.9, abarquen sus isótopos estables e inestables. Los isótopos estables son isótopos no radiactivos que contienen un neutrón adicional en comparación con los abundantes nucleidos de la misma especie (es decir, elemento). Se espera que se retenga la actividad de los compuestos que comprenden tales isótopos, y tal compuesto también tendría utilidad para medir la farmacocinética de los análogos no isotópicos. Por ejemplo, el átomo de hidrógeno en una determinada posición en un compuesto de fórmula III, por ej., un compuesto de fórmula 3.1-3.9, puede reemplazarse con deuterio (un isótopo estable que no es radiactivo). Los ejemplos de isótopos estables conocidos incluyen, pero no se limitan a, deuterio,  $^{13}C$ ,  $^{15}N$ ,  $^{18}O$ . Alternativamente, los isótopos inestables, que son isótopos radiactivos que contienen neutrones adicionales en comparación con los abundantes nucleidos de la misma especie (es decir, elemento), por ej.,  $^{123}I$ ,  $^{131}I$ ,  $^{125}I$ ,  $^{11}C$ ,  $^{18}F$ , puede reemplazar las especies abundantes correspondientes de I, C y F. Otro ejemplo de un isótopo útil de un compuesto de Fórmula III, por ej., un compuesto de fórmula 3.1-3.9, es el isótopo  $^{11}C$ . Estos radioisótopos pueden ser útiles para la formación de imágenes por radio /y/o estudios farmacocinéticos de compuestos de Fórmula I, por ej., compuestos de 1.1-1.52, o, por ej., compuestos de Fórmula II, por ej., compuestos de 2.1-2.26.

30      Los compuestos de Fórmula III, por ej., 3.1-3.9, se pueden preparar usando los métodos descritos y ejemplificados en el presente documento y mediante métodos similares a los mismos y mediante métodos conocidos en la técnica química. Dichos métodos incluyen, pero no se limitan a, los que se describen a continuación. Si no están disponibles comercialmente, los materiales de partida para estos procedimientos se pueden preparar mediante procedimientos que se seleccionan de la técnica química usando técnicas que son similares o análogas a la síntesis de compuestos conocidos.

35      En otra realización más, se proporcionan nuevos procedimientos para la síntesis de nuevos intermediarios de Fórmula III, por ej., compuestos de fórmula 3.1-3.9.

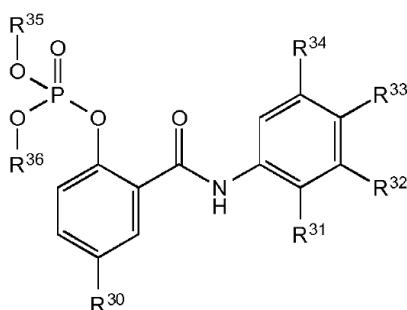
40      La patente de EE.UU. No. 7.626.042 informa de un procedimiento para preparar dihidrógeno-fosfato de 2-[[3,5-bis(trifluorometil)fenil]carbamoil]-4-clorofenilo a partir del Compuesto No. 50:



La patente de EE.UU. No. 7.626.042 describe que se añadió hidróxido de paladio sobre carbono al Compuesto No. 50 en acetato de etilo y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora en atmósfera de hidrógeno.

5 Los inventores han encontrado el procedimiento descrito en La patente de EE.UU. No. 7.626.042 da como resultado la decoloración del Compuesto No. 50, lo que da lugar a un contaminante que es difícil de eliminar.

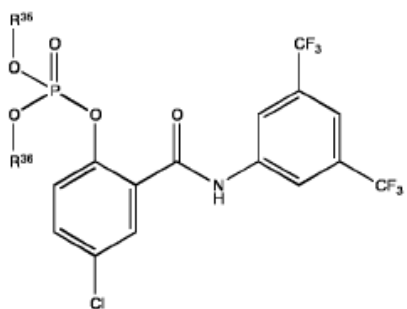
Por tanto, en otra realización más, se proporciona un procedimiento (Procedimiento I) que comprende desproteger un compuesto de Fórmula III



Fórmula III

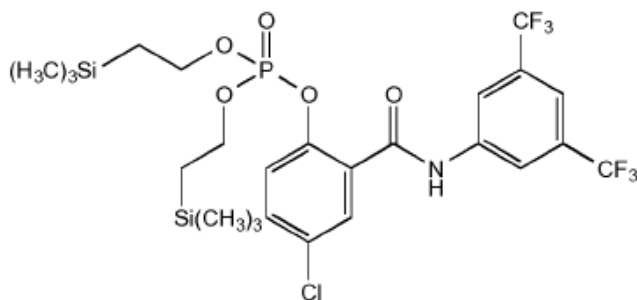
10 En donde R<sup>30</sup>, R<sup>31</sup>, R<sup>32</sup>, R<sup>33</sup>, R<sup>34</sup>, R<sup>35</sup> y R<sup>36</sup> son como se definieron anteriormente, por ej., un compuesto de Fórmula III, por ej., un compuesto de fórmula 3.1-3.9, para formar un compuesto de Fórmula IV.

1.1 Procedimiento I, en el que el compuesto de Fórmula III es



En donde R<sup>35</sup> y R<sup>36</sup> son como se definieron anteriormente, por ej., un compuesto de Fórmula III, por ej., un compuesto de fórmula 3.1-3.9.

15 1.2 Procedimiento I o 1.1, en el que el compuesto de Fórmula III es





1.3 Procedimiento I o 1.1-1.2, en el que el compuesto de Fórmula III se desprotege con un agente desprotector que comprende F.

1.4 Procedimiento 1.3, en el que el agente desprotector es fluoruro de tetra-n-butilamonio,  $\text{MgBr}_2$ -dietiléter o  $\text{BBr}_3$ .

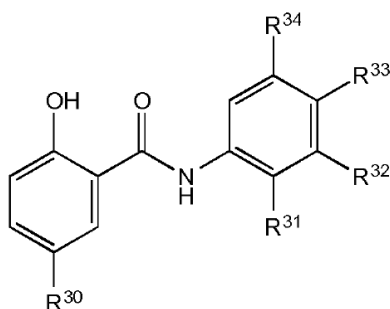
1.5 Procedimiento I o 1.1-1.3, en el que el agente desprotector es un ácido.

5 1.6 Procedimiento 1.5, en el que el ácido es  $\text{CF}_3\text{COOH}$  (también conocido como TFA y ácido trifluoroacético).

1.7 Procedimiento I o 1.1-1.6, en el que la reacción de desprotección se agita a temperatura ambiente.

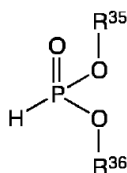
1.8 Procedimiento I o 1.1-1.7, en el que la reacción de desprotección se agita durante aproximadamente 2 horas.

1.9 Procedimiento I o 1.1-1.8, que además comprende hacer reaccionar un compuesto de Fórmula V



Fórmula V

10 con un compuesto de Fórmula VI

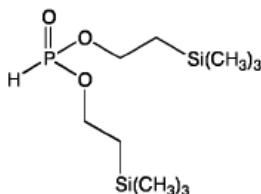


Fórmula VI

para formar un compuesto de Fórmula III, en donde  $\text{R}^{30}$ ,  $\text{R}^{31}$ ,  $\text{R}^{32}$ ,  $\text{R}^{33}$ ,  $\text{R}^{34}$ ,  $\text{R}^{35}$  y  $\text{R}^{36}$  son como se definieron anteriormente para el compuesto de Fórmula III, por ej., el compuesto de fórmula 3.1-3.9, por ej., en donde el compuesto de Fórmula VI es un compuesto de Fórmula XX, por ej., 20.1-20.5.

15 1.10 Procedimiento 1.9, en el que el compuesto de Fórmula V se hace reaccionar con un compuesto de Fórmula XX, por ej., 20.1-20.5.

1.11 Procedimiento 1.9 o 1.10, en donde el compuesto de Fórmula V se hace reaccionar con



1.12 Procedimiento 1.9-1.11, en el que la reacción se produce en presencia de una base.

20 1.13 Procedimiento 1.12, en el que la base comprende nitrógeno.

1.14 Procedimiento 1.13, en el que la base es una trialquilamina (p. ej.,  $(\text{C}_{1-4}\text{-alquilo})_3\text{N}$ ).

1.15 Procedimiento 1.14, en el que la base es N,N-diisopropiletilamina (también conocida como base de Hünig).

1.16 Procedimiento 1.9-1.15, en el que la reacción se produce en presencia de un catalizador.

1.17 Procedimiento 1.16, en el que el catalizador comprende nitrógeno.

25 1.18 Procedimiento 1.17, en el que el catalizador es 4-dimetilaminopiridina (también conocida como DMAP), 1,8-

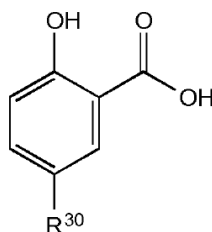
diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (también conocido como DBU) o 1,5-diazabicyclo[4.3.0]non-5-eno (también conocido como DBN).

1.19 Procedimiento 1.9-1.18, en donde la reacción ocurre en  $\text{CH}_3\text{CN}$  y  $\text{CCl}_4$ .

5 1.20 Procedimiento 1.9-1.19, en el que se deja calentar la reacción desde aproximadamente  $0^\circ\text{C}$  hasta temperatura ambiente.

1.21 Procedimiento 1.9-1.20, en el que la reacción se agita durante aproximadamente 20 horas.

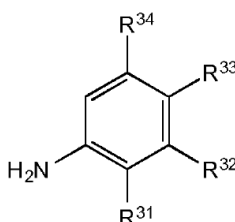
1.22 También se describe en el presente documento adicionalmente al Procedimiento I o 1.1-1.21, un compuesto de Fórmula VII



Fórmula VII

10 se puede hacer reaccionar para formar un compuesto de Fórmula V, en donde  $\text{R}^{30}$  se definió anteriormente para el compuesto de fórmula III, por ej., el compuesto de fórmula 3.1-3.9.

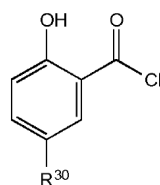
1.23 También se describe en este documento el siguiente procedimiento y/o Procedimiento 1.24-1.30: Procedimiento 1.22, en el que el compuesto de Fórmula VII se hace reaccionar con un compuesto de Fórmula VIII



Fórmula VIII

15 En donde  $\text{R}^{31}$ ,  $\text{R}^{32}$ ,  $\text{R}^{33}$  y  $\text{R}^{34}$  son como se definieron anteriormente para el compuesto de Fórmula III, por ej., 3.1-3.9.

1.24 Procedimiento 1.22 o 1.23, que además comprende convertir primero el compuesto de Fórmula VII en un compuesto de Fórmula IX



Fórmula IX

En donde  $\text{R}^{30}$  es como se definió anteriormente.

20 1.25 Procedimiento 1.24, en donde la Fórmula IX se forma por reacción con un compuesto que comprende P o S.

1.26 Procedimiento 1.25, en donde la Fórmula IX se forma por reacción con  $\text{PCl}_3$ ,  $\text{PCl}_5$ , o  $\text{SOCl}_2$ .

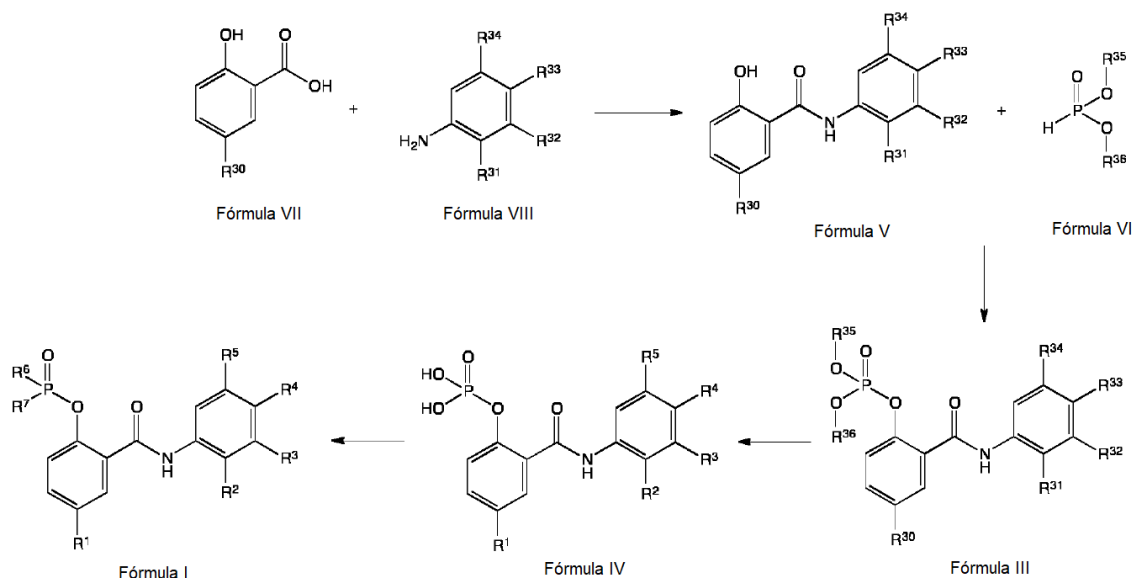
1.27 Procedimiento 1.23-1.26, en el que la reacción se produce en un disolvente apolar.

1.28 Procedimiento 1.27, en el que el disolvente apolar es tolueno.

1.29 Procedimiento 1.23-1.28, en el que la reacción se calienta a reflujo.

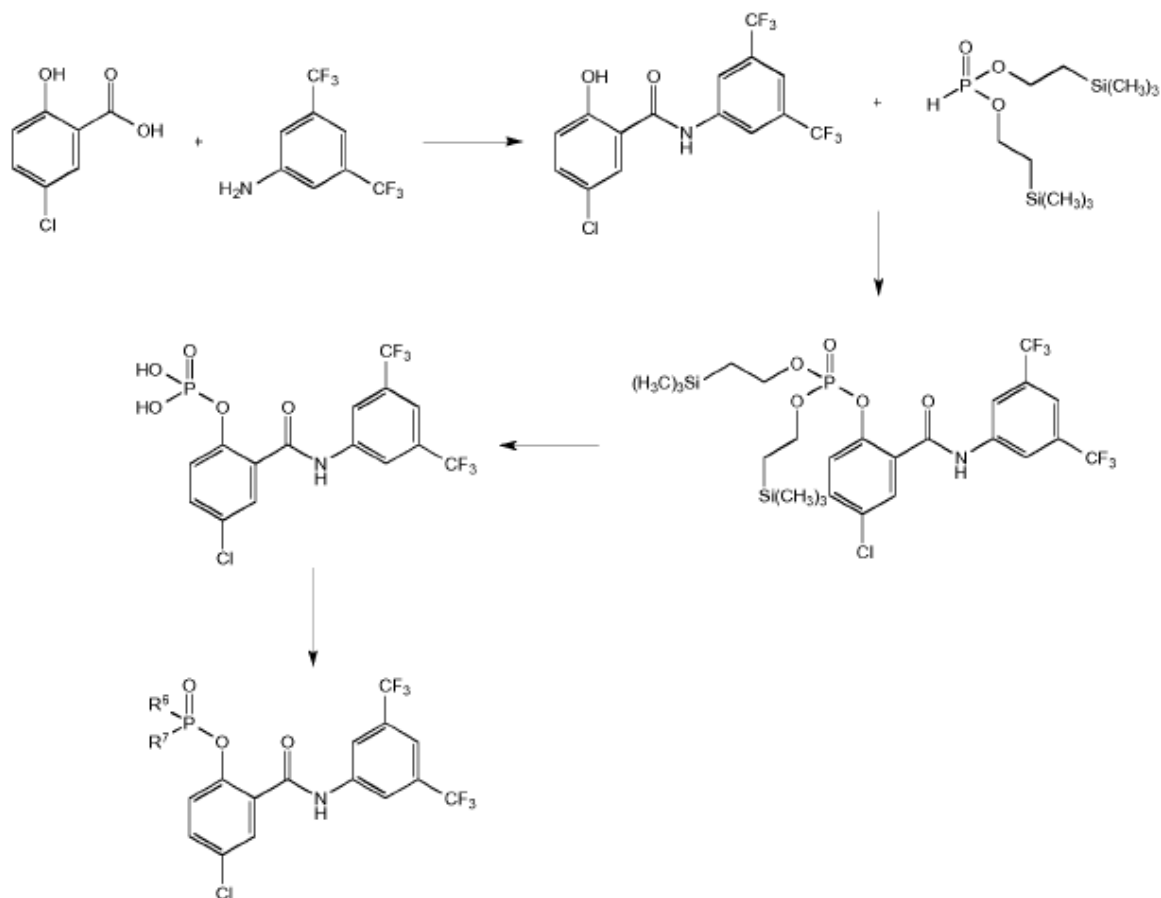
25 1.30 Procedimiento 1.23-1.29, en el que la reacción se agita durante aproximadamente 12 horas.

1.31 Procedimiento I o 1.1-1.30, en donde el procedimiento que se describe a continuación se describe en este documento:

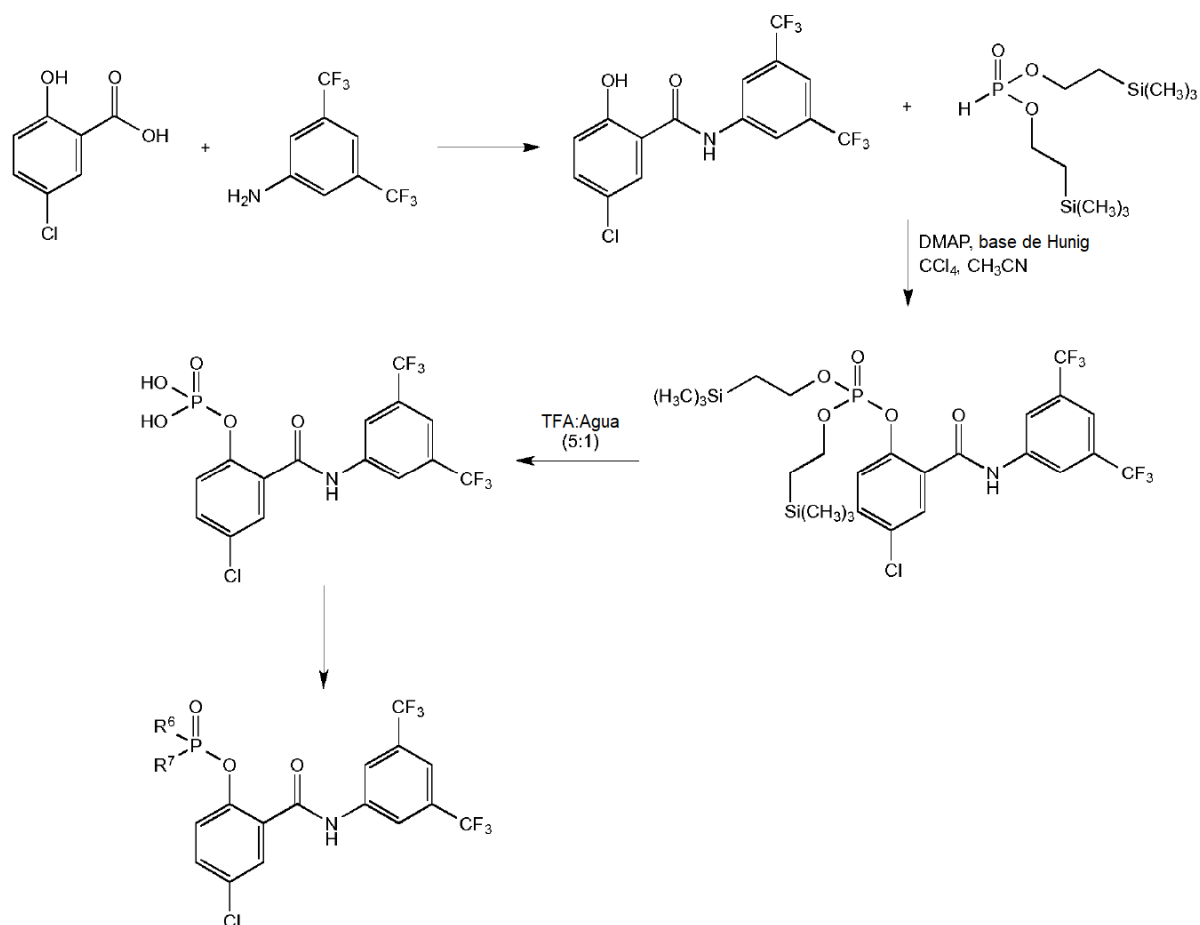


En donde R<sup>30</sup>, R<sup>31</sup>, R<sup>32</sup>, R<sup>33</sup>, R<sup>34</sup>, R<sup>35</sup> y R<sup>36</sup> son como se definieron anteriormente.

5 1.32 Procedimiento I o 1.1-1.31, en donde el procedimiento que se describe a continuación se describe en este documento:



1.33 Procedimiento I o 1.1-1.32, en donde el procedimiento que se describe a continuación se describe en este documento:



Como se usa en todas partes, los intervalos se utilizan como forma abreviada para describir todos y cada uno de los valores que están dentro del intervalo. Cualquier valor dentro del intervalo se puede seleccionar como el término del intervalo.

## 5 Ejemplos

Los métodos sintéticos para los diversos compuestos se ilustran a continuación. Los compuestos intermedios se pueden preparar usando los métodos que se describen de manera similar a continuación y/o mediante métodos hechos usando los métodos que se describen de manera similar a continuación y/o mediante métodos similares a los descritos generalmente en la descripción detallada y mediante métodos conocidos en la técnica química.

## 10 Términos y abreviaturas:

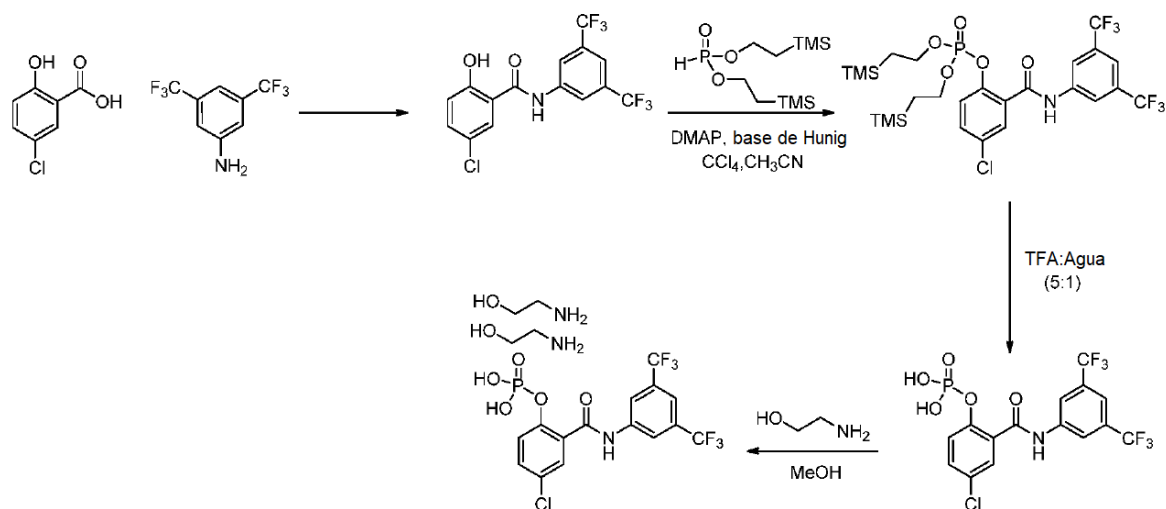
DMAP = 4-(dimetilamino) piridina

Base de Hünig = N,N-diisopropiletilamina

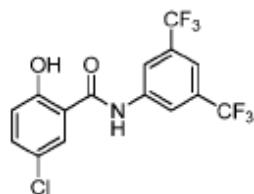
TFA = ácido trifluoroacético

Ejemplo 1

## 15 Dihidrógeno-fosfato de 2- {[3,5-bis(trifluorometil)fenil]carbamoil}-4-clorofenilo

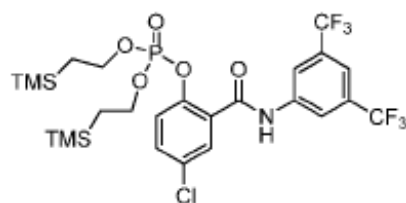


Etapla 1: N-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-5-cloro-2-hidroxibenzamida (Compuesto 1)



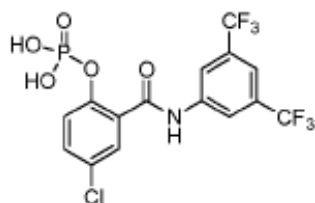
- Se disuelve ácido 5-cloro-salicílico (8,75 g, 50 mmoles, 1 eq) en tolueno (300 mL) bajo atmósfera de  $N_2$  y luego se añade gota a gota tricloruro de fósforo (2,2 mL, 25 mmoles, 0,5 eq) seguido de 3,5-bis(trifluorometil)anilina (10 g, 43,7 mmoles, 0,87 eq). La mezcla de reacción se agita a reflujo durante 12 h, luego se enfría a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se inactiva con una solución saturada de  $NaHCO_3$  y se agita durante 10 min. A esta solución se añade HCl 1M (100 mL) hasta que el pH de la capa acuosa es 5 y la capa acuosa se extrae con acetato de etilo (2 x 300 mL). Las fases orgánicas combinados se secan luego sobre sulfato de sodio y se concentran a vacío para producir el producto bruto que se purifica mediante cromatografía ultrarrápida (EtOAc 5-20%/hex). El rendimiento de producto puro como un sólido blanco es 16 g (rendimiento 85%) que es > 95% puro por  $^1H$  RMN.  $^1H$  RMN (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  11,35 (bs, 1 H), 10,85 (bs, 1 H), 8,40 (s, 2 H), 7,80-7,79 (m, 2 H), 7,50 (dd, 1 H), 7,00 (d, 1 H).

Etapla 2: fosfato de 2-((3,5-bis(trifluorometil)fenil)carbamoil)-4-clorofenilo bis(2-(trimetilsilil)etilo)



- Se disuelve N-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-5-cloro-2-hidroxibenzamida (4,0 g, 0,01 moles, 1 eq) en  $CH_3CN$  (104 mL) luego se añaden DMAP (0,08 g, 0,001 moles, 0,06 eq), base de Hunig (7,36 mL, 0,021 moles, 2 eq) y  $CCl_4$  (8,02 g, 0,052 moles, 5 eq) en este orden. La solución se enfría a  $0^\circ C$  y se añade gota a gota  $HP(O)(OCH_2CH_2Si(CH_3)_3)_2$  (4,66 g, 0,016 moles, 1,5 eq) en  $CH_3CN$  (5 mL). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 20 h, luego se agrega agua y se extrae dos veces con EtOAc. Las capas orgánicas combinadas se lavan con una solución saturada de NaCl, se secan sobre  $Na_2SO_4$ , se filtra y el disolvente se concentra a vacío para dar el material crudo que se utiliza como tal para la siguiente etapa.  $^1H$  RMN (200 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  10,20 (bs, 1 H), 8,32 (s, 2 H), 7,90 (s, 1 H), 7,62 (s, 1 H), 7,45-7,40 (m, 1 H), 7,30-7,28 (m, 1 H), 4,40-4,30 (m, 4 H), 1,20-1,00 (m, 4 H), 0,0 (s, 18 H).

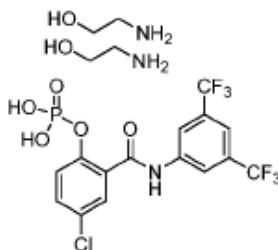
Etapla 3: dihidrógeno-fosfato de 2-((3,5-bis(trifluorometil)fenil)carbamoil)-4-clorofenilo



Se disuelve fosfato de 2-((3,5-bis(trifluorometil)fenil)carbamoil)-4-clorofenilo bis(2-(trimetilsilil)etilo) (6,64 g, 0,01 moles, 1 eq) en una mezcla de TFA:agua (5:1, 50 mL). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 2 h, luego se concentra el disolvente a vacío. El sólido blanco resultante se disuelve en Et<sub>2</sub>O (20 mL) luego se concentra a vacío. Esta operación se repite dos veces o hasta que el compuesto se vuelve mucho menos soluble en Et<sub>2</sub>O. El material resultante se suspende en una mezcla Et<sub>2</sub>O:Hex (6:1, 50 mL) y se filtra para dar el material deseado como un sólido rojo claro. Finalmente, el sólido se disuelve en agua (100 mL), se filtra y la solución acuosa resultante se liofiliza para dar el producto deseado como un sólido blanco (rendimiento 76% en dos etapas, 97% puro por HPLC). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 8,38 (s, 2 H), 7,78 (s, 1 H), 7,70 (s, 1 H), 7,55-7,50 (m, 1 H), 7,45-7,43 (m, 1 H).

## Ejemplo 2

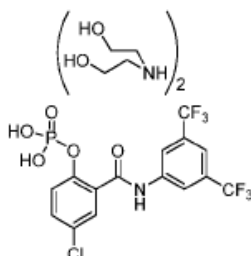
- 10 Sal de bis-etanolamina de fosfato de 2-((3,5-bis(trifluorometil)fenil)carbamoil)-4-clorofenilo



- 15 Se disuelve dihidrógeno-fosfato de 2-((3,5-bis(trifluorometil)fenil)carbamoil)-4-clorofenilo (2,14 g, 0,005 moles, 1 eq) en MeOH (46 mL) y luego se añade etanolamina (0,56 mL, 0,009 moles, 2 eq). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 2 h, luego se concentra el disolvente a vacío para dar el producto deseado como un sólido blanco (rendimiento 84%, 97% puro por HPLC). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 8,15 (s, 2 H), 7,85 (d, 2 H), 7,37-7,34 (m, 2 H), 3,62 (t, 4 H), 2,95 (t, 4 H).

## Ejemplo 3

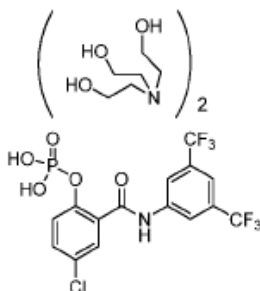
Sal de bis-etanolamina de fosfato de 2-((3,5-bis(trifluorometil)fenil)carbamoil)-4-clorofenilo



- 20 Se disuelve dihidrógeno-fosfato de 2-((3,5-bis(trifluorometil)fenil)carbamoil)-4-clorofenilo (300 mg, 0,647 mmoles, 1 eq) en MeOH (3,2 mL) y luego se añade dietanolamina (0,124 mL, 1,294 mmoles, 2 eq). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 2 h, luego se concentra el disolvente a vacío para dar el producto deseado como una espuma amarilla (rendimiento 100%, 95% puro por HPLC). <sup>1</sup>H RMN (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 8,52 (s, 2 H), 7,76 (s, 1 H), 7,62 (s, 1 H), 7,48 (d, 1 H), 7,37 (d, 1 H), 3,55 (s, 8 H), 2,80 (s, 8 H).

## Ejemplo 4

Sal de bis-etanolamina de fosfato de 2-((3,5-bis(trifluorometil)fenil)carbamoil)-4-clorofenilo

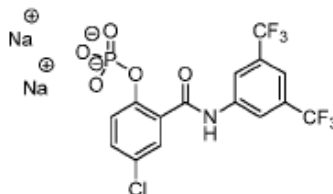


- 30 Se disuelve dihidrógeno-fosfato de 2-((3,5-bis(trifluorometil)fenil)carbamoil)-4-clorofenilo (300 mg, 0,647 mmoles, 1 eq) en MeOH (3,2 mL) y luego se añade trietanolamina (0,172 mL, 1,294 mmoles, 2 eq). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 2 h, luego se concentra el disolvente a vacío para dar el producto deseado como un aceite amarillo (rendimiento 100%, 98% puro por HPLC). <sup>1</sup>H RMN (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 8,50 (s, 2 H), 7,76 (s, 1

H), 7,62 (s, 1 H), 7,52 (d, 1 H), 7,29 (d, 1 H), 3,55 (s, 12 H), 2,82 (s, 12 H).

#### Ejemplo 5

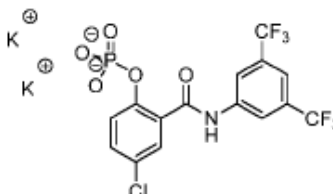
Sal bisódica de fosfato de 2-((3,5-bis(trifluorometil)fenil)carbamoil)-4-clorofenilo



- 5 Se suspende dihidrógeno-fosfato de 2-((3,5-bis(trifluorometil)fenil)carbamoil)-4-clorofenilo (300 mg, 0,647 mmoles, 1 eq) en agua (6,4 mL) y luego se añade NaOH (1 M) (1,29 mL, 1,294 mmoles), 2 eq). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 2 h, luego la solución se filtra y se liofiliza para dar el producto deseado como un sólido blanco (rendimiento 100%, 93% puro por HPLC).

#### Ejemplo 6

- 10 Sal bispotásica de fosfato de 2-((3,5-bis(trifluorometil)fenil)carbamoil)-4-clorofenilo



- 15 Se suspende dihidrógeno-fosfato de 2-((3,5-bis(trifluorometil)fenil)carbamoil)-4-clorofenilo (300 mg, 0,647 mmoles, 1 eq) en agua (6,4 mL) y luego se añade KOH (1 M) (1,29 mL, 1,294 mmoles), 2 eq.). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 2 h, luego la solución se filtra y se liofiliza para dar el producto deseado como un sólido blanco (rendimiento 100%, 82% puro por HPLC).

#### Ejemplo 7

Sal monosódica de hidrógeno-fosfato de 2-((3,5-bis(trifluorometil)fenil)carbamoil)-4-clorofenilo, sal bisódica de hidrógeno-fosfato de 2-((3,5-bis(trifluorometil)fenil)carbamoil)-4-clorofenilo, y sal de bis-etanolamina de hidrógeno-fosfato de 2-((3,5-bis(trifluorometil)fenil)carbamoil)-4-clorofenilo

- 20 La sal monosódica de hidrógeno-fosfato de 2-((3,5-bis(trifluorometil)fenil)carbamoil)-4-clorofenilo, la sal bisódica de hidrógeno-fosfato de 2-((3,5-bis(trifluorometil)fenil)carbamoil)-4-clorofenilo, y la sal de bis-etanolamina de hidrógeno-fosfato de 2-((3,5-bis(trifluorometil)fenil)carbamoil)-4-clorofenilo se preparan como sigue: Se disuelve una solución 2 mM de dihidrógeno-fosfato de 2-((3,5-bis(trifluorometil)fenil)carbamoil)-4-clorofenilo en 50 mL de etanol y se añaden los equivalentes apropiados de cada base. La evaporación da sales que se disuelven en agua y se liofilizan.

#### Ejemplo 8

Sal de monoetanolamina de fosfato de 2-((3,5-bis(trifluorometil)fenil)carbamoil)-4-clorofenilo (Compuesto 2.19)

- 30 La sal de monoetanolamina de hidrógeno-fosfato de ((3,5-bis(trifluorometil)fenil)carbamoil)-4-clorofenilo se prepara como sigue: Se disuelve 1 g de dihidrógeno-fosfato de 2-((3,5-bis(trifluorometil)fenil)carbamoil)-4-clorofenilo en isopropanol y se añade 1 eq de etanolamina. La evaporación dio la sal de monoetanolamina de hidrógeno-fosfato de 2-((3,5-bis(trifluorometil)fenil)carbamoil)-4-clorofenilo.

#### Ejemplo 9

Estabilidad y solubilidad

- 35 Para comprender la estabilidad y solubilidad de las nuevas sales de profármacos, se purifica un lote puro al 95% de dihidrógeno-fosfato de 2-((3,5-bis(trifluorometil)fenil)carbamoil)-4-clorofenilo de la siguiente manera. Se disuelven 15 g en 1,2 L de agua con hidróxido de sodio 120 mM y se extrae con 500 mL de acetato de etilo para eliminar el fenol y las impurezas no ácidas. La capa acuosa se acidifica con HCl concentrado a pH 1,2 y se extrae con 1 L de acetato de etilo seguido de 600 mL. La capa de acetato de etilo se seca con  $\text{MgSO}_4$  y sulfato de sodio, se filtra y se evapora para dar aproximadamente 13 g de dihidrógeno-fosfato de 2-((3,5-bis(trifluorometil)fenil)carbamoil)-4-clorofenilo puro al 98%. La RMN mostró 1 mol de acetato de etilo atrapado en un sólido. El acetato de etilo se elimina añadiendo 100 mL de metanol y evaporando. El dihidrógeno-fosfato de 2-((3,5-bis(trifluorometil)fenil)carbamoil)-4-clorofenilo es estable a

temperatura ambiente durante una semana o más. La muestra se mantiene a temperatura ambiente. Es soluble a razón de 5 mg/mL en  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  al 1% dando un pH de aproximadamente 7. Disuelto en  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  al 2% a razón de 5 mg/mL da un pH de 7,4.

5 Se preparan la sal monosódica de hidrógeno-fosfato de 2-((3,5-bis(trifluorometil)fenil)carbamoil)-4-clorofenilo ("sal monosódica"), la sal bisódica de fosfato de 2-((3,5-bis(trifluorometil)fenil)carbamoil)-4-clorofenilo ("sal bisódica") y sal de bis-etanolamina de fosfato de 2-((3,5-bis(trifluorometil)fenil)carbamoil)-4-clorofenilo ("sal de bis-etanolamina") y se liofilizan como en el Ejemplo 7. En todos los casos, los estudios de estabilidad muestran hidrólisis en estado sólido a razón de aproximadamente 1% por día. Las solubilidades en agua son de aproximadamente 5 mg/mL para la sal monosódica y de 10 mg/mL para la sal bisódica y de bis-etanolamina.

10 El pH final de las soluciones en agua es de aproximadamente 7,5 para la sal de bis-etanolamina, pH 8,5 para la sal monosódica y pH 9,5 para la sal bisódica. En todos los casos, las soluciones de estas sales muestran menos que 1% de fenol en 12 horas. A largo plazo, su estabilidad es la misma que la de las muestras sólidas (alrededor del 1% por día a temperatura ambiente). Se espera que la velocidad de hidrólisis sea más rápida a pH más alto.

15 Se prepara la sal de monoetanolamina de fosfato de 2-((3,5-bis(trifluorometil)fenil)carbamoil)-4-clorofenilo ("sal de monoetanolamina") como en el Ejemplo 8. Sorprendentemente, la sal de monoetanolamina solo muestra aproximadamente un 1% de hidrólisis después de 5 días a temperatura ambiente. Su solubilidad en agua es de aproximadamente 5 mg/mL. Se espera que la solubilidad sea mayor a pH más alto.

#### Ejemplo 10 - Relación estructura-actividad de fenilbenzamida-AQP

20 Las relaciones estructura-actividad (SAR) se determinan ensayando análogos de éxitos seleccionados para guiar la química para la preparación de nuevas moléculas que se probarán para mejorar la potencia. Para este procedimiento iterativo se utilizó un ensayo cinético cuantitativo, el ensayo de cambio de volumen celular mediado por acuaporinas, en un lector de placas múltiples de 96 pocillos. Detecta cambios en la dispersión de la luz mediante una monocapa de células CHO que expresan la AQP deseada a medida que se encogen cuando se exponen a una solución hipertónica (300 mOsm  $\rightarrow$  530 mOsm). La Figura 1 representa el ensayo de cambio de volumen celular mediado por acuaporinas con células que expresan AQP4 (Figura 1A) y células que expresan AQP2 (Figura 1B). Las células que expresan acuaporinas se encogen más rápidamente que las células de control, debido al aumento del flujo de agua, cuya contracción puede ser inhibida por un compuesto que inhibe la acuaporina.

25 En la Figura 1, se muestran las células que expresan acuaporinas en presencia de DMSO (triángulos) o en presencia del compuesto de ensayo (aquí, Compuesto 3) a 10  $\mu\text{M}$  (cuadrados), junto con células de control que expresan CHO-CD81 en presencia de DMSO (diamantes). Cada curva representa un promedio de 16 pocillos en la placa de 96 pocillos.

30 En la Figura 1A, cuando las células AQP4b tratadas con DMSO se exponen a un choque hipertónico, las células muestran un encogimiento rápido, lo que aumenta la dispersión de la luz (aumento del cambio relativo en la absorbancia,  $\text{Abs}/\text{Abs}_0$ ) seguido de un decaimiento a medida que las células se desprenden de la placa. La línea celular CHO-AQP4b muestra un aumento de 4,5 veces en la velocidad de contracción en comparación con las células de control CHO-CD81 (ajustadas a un modelo exponencial doble). Las células CHO-AQP4b tratadas con el análogo del Compuesto 3 a 10  $\mu\text{M}$  (cuadrados) muestran una velocidad de encogimiento más lenta (inhibición del 55%) como se ve por la característica "inflexión" de la curva de dispersión de luz. De manera similar, la Figura 1B representa un experimento que compara CHO-AQP2 tratadas con DMSO o con el Compuesto 3 a 10  $\mu\text{M}$ . La acuaporina-2 tiene una permeabilidad al agua intrínseca más baja que AQP4 como se observa aquí. Las líneas celulares CHO-AQP2 tratadas con DMSO (Figura 1B, triángulos) muestran un aumento de 1,7 veces en la velocidad de contracción en comparación con las células de control CHO-CD81 (diamantes) también tratadas con DMSO (ajustadas a un modelo exponencial doble) (Figura 1B). Las células CHO-AQP2 tratadas con el Compuesto 3 a 10  $\mu\text{M}$  (cuadrados) muestran una velocidad de encogimiento más lenta (81% de inhibición), cuando se compara el cambio relativo en Abs ( $\text{Abs}/\text{Abs}_0$ ) (Figura 1B).

40 Los datos indican que, en este ensayo, el Compuesto 3 es capaz de inhibir significativamente la actividad de AQP2 y AQP4, p. ej., en más que 50%, a una concentración de 10  $\mu\text{M}$ .

#### Ejemplo 11 - Especificidad por las acuaporinas de los compuestos tipo fenilbenzamidias

45 La especificidad de los compuestos se ensaya contra las más estrechamente relacionadas de las 13 acuaporinas conocidas: AQP1, AQP2, AQP5 y ambas variantes de empalme de AQP4 (A y B). Se crea una línea celular CHO estable para cada una de las acuaporinas anteriores y se ensaya la inhibición de la permeabilidad al agua usando el ensayo de cambio de volumen celular mediado por acuaporinas con el compuesto 3 10  $\mu\text{M}$ . El compuesto 3 inhibe AQP2 y 4, mientras que inhibe mal AQP1 y 5 (Figura 2).

#### Ejemplo 12 - Interacciones directas fármaco-diana entre fenilbenzamidias y AQP4

50 Para respaldar el mecanismo de acción por el cual las fenilbenzamidias bloquean directamente AQP4, se realizaron estudios de unión *in vitro* utilizando AQP4b purificada y compuesto 4 radiomarcado con  $^3\text{H}$ . Usando un ensayo de estilo Hummel-Dryer, se equilibra una columna de filtración en gel con tampón que contiene detergente, para mantener



la solubilidad de AQP4b y [ $^3\text{H}$ ]-Compuesto 4 1  $\mu\text{M}$ . Se diluye AQP4b hasta 250  $\mu\text{M}$  en este tampón de la columna y se incuba a temperatura ambiente durante 30 min. A continuación, la muestra se aplica a la columna, se recogen las fracciones y la presencia de [ $^3\text{H}$ ]-Compuesto 4 se detecta por recuento de centelleo líquido. La Figura 3 muestra el perfil de elución de [ $^3\text{H}$ ]-Compuesto 4 de la columna de filtración en gel con las posiciones de elución de AQP4b tetrámero y monómero indicadas. El aumento de [ $^3\text{H}$ ]-Compuesto 4 a partir de un valor de línea base de 1  $\mu\text{M}$  representa la unión a cada una de estas proteínas. Aunque no se puede detectar fácilmente AQP4b monómero en la AQP4b altamente purificada por medios convencionales, este ensayo revela la presencia de una pequeña cantidad de monómero, aunque desvaneciéndose. Las afinidades relativas por el Compuesto 4 son  $\sim 100 \mu\text{M}$  y menos que 1  $\mu\text{M}$  para el tetrámero y el monómero, respectivamente. Este ensayo muestra una unión relativamente débil del Compuesto 4 a AQP4b solubilizada; sin embargo, demuestra claramente que esta fenilbenzamida interactúa directamente con AQP4b.

#### Ejemplo 13 - Prueba de concepto farmacológica

Modelo de toxicidad del agua en ratones - Curvas de supervivencia: La eficacia *in vivo* de los compuestos se ensayó usando el modelo de toxicidad del agua en ratón, en el que se inyecta agua a un ratón al 20% de su peso corporal. Manley, G. T. et al. *Aquaporin 4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke*. Nat Med 6, 159-163 (2000); Gullans, S. R. y Verbalis, J. G. *Control of brain volume during hyperosmolar and hyposmolar conditions*. Annual Review of Medicine 44, 289-301 (1993). La hiponatremia eurolémica resultante conduce rápidamente a EC, lo que lo convierte en un modelo práctico para ensayar un inhibidor de la acuaporina del SNC, AQP4b.

La capacidad de los ratones para sobrevivir a la toxicidad del  $\text{H}_2\text{O}$  se determina en tres experimentos usando 10-12 ratones en cada uno (machos/hembras de 16-19 semanas de edad). Se prepara agua desionizada para inyección con 0,39 mg/kg de fenilbenzamida (placebo) o 0,76 mg/kg de compuesto de ensayo. La Figura 4 muestra los resultados combinados de estos experimentos ( $n = 33$  placebo,  $n = 34$  Compuesto 1). El porcentaje de supervivencia de las cohortes del Compuesto 1 mejora 3,2 veces y el tiempo hasta el 50% de supervivencia de los animales tratados con el Compuesto 1 mejora en aproximadamente 52 min.

Modelo de toxicidad del agua en ratón - Volumen cerebral por imágenes de resonancia magnética (MRI): La MRI se utiliza para medir los cambios en el volumen cerebral en respuesta al choque por agua, utilizando el modelo de toxicidad del agua. Como se describió anteriormente para los estudios de supervivencia y contenido de agua en el cerebro, se inyecta a los ratones, IP, un bolo de agua solo o un bolo de agua y compuesto de ensayo a razón de 0,76 mg/kg, y se monitorizan los cambios en el volumen cerebral detectados por MRI. Los volúmenes del cerebro de los ratones se evalúan usando barridos de MRI recolectados con un escáner de MRI Bruker Biospec 9.4T en el Centro Case for Imaging Research de la Universidad Case Western Reserve. Se ha descubierto que este método de obtención de imágenes proporciona suficiente contraste y resolución para detectar con sensibilidad cambios en el volumen cerebral total en el modelo de toxicidad del agua en ratón para el edema cerebral. Se obtienen barridos sagitales ponderados en T2 de alta resolución (resolución = 0,1 mm x 0,1 mm x 0,7 mm) de la cabeza del ratón antes de la inyección de agua, 5,67 min después de la inyección de agua, y luego cada 5,2 minutos hasta que el animal expira desde la carga de agua. Cada barrido contiene veinticinco cortes de imágenes contiguos de 0,7 mm de los cuales 14-15 cortes contienen una porción del cerebro. El área de la sección transversal del cerebro en cada corte de imágenes se mide mediante la selección manual de la región de interés utilizando ImageJ. A continuación, se calculan los volúmenes cerebrales para cada barrido sumando las áreas cerebrales transversales individuales y multiplicando por el grosor del corte (0,7 mm).

El tratamiento con el Compuesto 1 a razón de 0,76 mg/kg reduce la velocidad de desarrollo del CE de 0,081 a 0,032  $\text{min}^{-1}$  (o 2,5 veces) ajuste a un solo modelo exponencial (Figura 5). Además, se reduce la extensión del CE durante el período de observación (Figura 5). Además, se encuentra que los niveles plasmáticos en el mismo ensayo oscilan entre 0,03-0,06  $\mu\text{g}$  según se determina por LC-MS/MS (realizada en Lerner Center, Cleveland Clinic, Cleveland, OH) y son suficientes para demostrar la eficacia en este modelo para CE.

El volumen del cerebro mediante el experimento de formación de imágenes por resonancia magnética también se realiza con fenilbenzamida (0,39 mg/kg) y el Compuesto 4 (0,83 mg/kg). El Compuesto 4 reduce la velocidad de desarrollo del CE de 0,081 a 0,022  $\text{min}^{-1}$  (Tabla 1). La fenilbenzamida no muestra una reducción en la velocidad de desarrollo del CE en ratones (Tabla 1).

Tabla 1. Eficacia de los compuestos sobre la formación de CE en el modelo de toxicidad del agua en ratones

Compuesto	Ensayo de inhibición de AQP basado en células (%)	Velocidad de edema cerebral por MRI ( $\text{min}^{-1}$ )
Ningún fármaco	0	0,081
Compuesto 1	47,9	0,032
Fenilbenzamida	4,5	0,096
Compuesto 4	38,9	0,022

Para ningún fármaco y Compuesto 1, n = 14 ratones cada uno. Para fenilbenzamida y Compuesto 4, n = 12 ratones cada uno.

#### Ejemplo 14 - Ensayo de exploración de alto rendimiento

5 Bajo choque hipotónico, tanto las células no transfectadas como las células que expresan una proteína transmembrana no relacionada (CD81, a niveles equivalentes a AQP4b) se hinchan lentamente, pero permanecen intactas. Estas observaciones se utilizan para desarrollar el ensayo de exploración de alto rendimiento (HTS) de esta memoria.

Después del choque hipotónico en un formato de placa de 384 pocillos, se retorna la osmolalidad a la normalidad (300 mOsm) agregando a cada pocillo una solución salina tamponada con fosfato 2x concentrada suplementada hasta 2  $\mu$ M con un derivado acetoximetílico no fluorescente de calceína (calceína-AM). Las células intactas absorben calceína-AM y la convierten en el colorante fluorescente calceína, lo que da una medida cuantitativa de las células intactas restantes. Las células reventadas no convierten el precursor en colorante. La captación de agua por las células que expresan AQP4 es relativamente rápida, y la mayoría de las células de ensayo revientan dentro de los 4 min después del choque hipotónico, mientras que la mayoría de las células que expresan CD81 permanecen viables después de 8 min. En este ensayo, la conversión intracelular de calceína-AM proporciona una señal fuerte y fácilmente detectable a 535 nM (Figura 6).

Ensayo de punto final de fluorescencia de calceína: Las células se siembran 24 horas antes del ensayo para alcanzar una confluencia del 100%. El medio de cultivo se reemplaza con H<sub>2</sub>O durante 5:30 min (choque osmótico). A continuación, se normaliza la osmolalidad con la adición de 2x PBS más calceína-AM 2  $\mu$ M. A continuación, las células se incuban a 37°C durante 30 minutos más y se mide la fluorescencia en un lector de placas. Las filas 1-22 se siembran con células CHO-AQP4 y las filas 23-24 con células CHO-CD81 (placa de 384 pocillos). Téngase en cuenta que se descartan todos los bordes de la placa. La intensidad relativa de la fluorescencia se calcula como la intensidad de fluorescencia (FI) de cada pocillo dividida por la FI media de las células AQP4 tratadas con DMSO (control). Criterios para un ensayo exitoso: coeficientes de variación (CV) < 15% y factores Z > 0,5. El análisis estadístico muestra que 5,5 min de choque osmótico proporcionan la relación señal-ruido óptima.

25 Tabla 2. Estadísticas para el ensayo de punto final de 'calceína' en la Figura 6; mostrado el punto de tiempo de 5:30 min:

	Media	Desviación estándar	CV	Z'	S/B
AQP4	581618	66311	11%	0,629	5,0
CD81	2910106	221240	8%		

30 Como se observará, la señal para las células CD81 es aprox. 5 veces más alta que la señal para las células AQP4, porque a los 5,5 minutos, la mayoría de las células AQP4 han estallado, mientras que la mayoría de las células CD81 permanecen intactas. Por lo tanto, sería de esperar que la inhibición de AQP4 proporcionara una señal más alta, más parecida a las células CD81.

Este ensayo se aplica en una pantalla piloto de las bibliotecas MicroSource GenPlus 960 y Maybridge Diversity™ 20k (aproximadamente 21.000 compuestos ensayados, cada compuesto a 10-20  $\mu$ M).

35 A partir de este ensayo, se identifica una serie química específica, fenilbenzamidas, que representa 3 de los 234 aciertos principales.

Los aciertos del HTS se validan utilizando el mismo ensayo utilizando una disposición de placas diferente. En la Figura 7 se muestra este ensayo de validación usado para examinar el Compuesto 3. Las células se siembran en un formato multiplaca de 96 pocillos omitiendo los bordes de las placas (carriles 1 y 24) y se usa una columna completa (n = 16) para ensayar la capacidad de un compuesto para bloquear el estallido de células mediado por AQP4 con choque de H<sub>2</sub>O. Las células CHO que expresan CD81 se siembran en los carriles 2-3 como control, y las células CHO que expresan AQP4, en los carriles 4-23. Las células se tratan con DMSO al 0,1% en FBS al 10%, DMEM (columnas pares) o Compuesto 1 10  $\mu$ M (columnas con número impar) en DMSO al 0,1%, FBS al 10%, DMEM durante 30 minutos. Las células se someten a un choque con H<sub>2</sub>O durante 5:30 minutos, luego la osmolalidad se retornó a 300 mOsm en presencia de calceína-AM 1  $\mu$ M, como se describió anteriormente. Las células se incuban a 37°C durante 30 minutos y se mide la fluorescencia relativa (ex 495/em 535 nM) en un lector de placas de fluorescencia. Los datos de la Figura 7 representan las unidades relativas de fluorescencia promedio (RFU  $\pm$  SEM, n = 16).

#### Ejemplo 15 - Modelo de toxicidad del agua para CE: presión intracraneal (ICP)

50 La ICP se monitoriza usando un sensor Samba 420, transductor de presión, con una unidad de control Samba 202 (Harvard Apparatus, Holliston, MA). Este sistema de monitorización de la ICP consta de un elemento sensor de silicio de 0,42 mm montado en una fibra óptica. Se implanta una aguja de jeringa de calibre 20 a través de la cisterna magna hasta una profundidad de ~ 1 cm. Luego, la aguja actúa como guía para la inserción del sensor Samba y el sitio de

implantación y el extremo abierto de la aguja se sellan con sellador de silicona al 100%. Se establece una lectura de ICP de línea base seguida de una inyección IP de un bolo de agua (20% del peso del animal) con o sin el Compuesto 1. Se monitoriza la ICP hasta que el animal expira desde de la aplicación de la carga de agua.

- 5 Ajustando el ligero aumento de la ICP observado en los animales cuando se monitorizan sin la inyección del bolo de agua (Figura 8, sin toxicidad por agua), el Compuesto 1 a razón de 0,76 mg/kg reduce la tasa relativa de aumento de la ICP en un 36%, de  $3,6 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$  hasta  $2,3 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$  ( $n = 6$  ratones/tratamiento, media  $\pm$  SEM).

Ejemplo 16 - Conversión de la sal de bis-etanolamina de fosfato de 2-[[3,5-bis(trifluorometil)fenil]carbamoil]-4-clorofenilo en el Compuesto 1

- 10 Los niveles plasmáticos o séricos del Compuesto 1 se miden mediante LC-MS/MS en las instalaciones centrales de espectrometría de masas II del Lerner Research Institute de la Cleveland Clinic Foundation. Las mediciones se toman a los 15 minutos y 24 horas después de una administración i.p. de una dosis de carga 10 mg/kg y una dosis de mantenimiento de 1 mg/mL a 8  $\mu\text{L/h}$  (administrada por una bomba osmótica Alzet i.p., Durect Corp., Cupertino, CA) de sal de bis-etanolamina de fosfato de 2-[[3,5-bis(trifluorometil)fenil]carbamoil]-4-clorofenilo ( $n = 5$  ratones/punto de tiempo, media  $\pm$  SEM) (Figura 9). Después del procesamiento inicial para eliminar las proteínas (extracción con acetonitrilo al 75%), se introduce el Compuesto 3 para mejorar la cuantificación usando una monitorización múltiple de la reacción (MRM). Las muestras se analizan mediante LC-MS/MS en tándem usando cromatografía de fase inversa C18 y análisis de masas con un espectrómetro de masas de triple cuadrupolar. El método de LC es suficiente para separar el Compuesto 1 del Compuesto 3 y la MRM posterior dio una cuantificación confiable con una respuesta lineal de 0,004-0,4 ng de Compuesto 1 para su ion hijo más abundante. La línea discontinua en la Figura 9 es la concentración plasmática efectiva relativa del Compuesto 1 observada en el modelo de toxicidad del agua en ratón. La inclusión de una bomba osmótica Alzet (Durect Corp., Cupertino, CA) que contenga sal de bis-etanolamina de fosfato de 2-[[3,5-bis(trifluorometil)fenil]carbamoil]-4-clorofenilo en el peritoneo es suficiente, junto con una dosis de carga inicial, para mantener el Compuesto 1 por encima de la concentración plasmática eficaz esperada de 20 ng/mL durante 24 horas (Figura 9).

- 25 La solubilidad del Compuesto 1 en agua es de 3,8  $\mu\text{g/mL}$ . La solubilidad del Compuesto 5 en agua es de 1 mg/mL.

- Los experimentos iniciales muestran una rápida bioconversión de fosfato de bis-etanolamina y 2-[[3,5-bis(trifluorometil)fenil]carbamoil]-4-clorofenilo al Compuesto 1 cuando se agrega al plasma en ratón *in vitro*. Menos que 5 minutos a 20°C es suficiente para hacer indetectable el fosfato de bis-etanolamina y 2-[[3,5-bis(trifluorometil)fenil]carbamoil]-4-clorofenilo. Además, la sal de bis-etanolamina de fosfato y 2-[[3,5-bis(trifluorometil)fenil]carbamoil]-4-clorofenilo es indetectable en muestras de plasma tomadas de ratones inyectados IP con fosfato de monoetanolamina y 2-[[3,5-bis(trifluorometil)fenil]carbamoil]-4-clorofenilo. En su lugar, el Compuesto 1 se detecta a una concentración consistente con buena biodisponibilidad y conversión casi completa de fosfato de bis-etanolamina y 2-[[3,5-bis(trifluorometil)fenil]carbamoil]-4-clorofenilo. Con fosfato de bis-etanolamina y 2-[[3,5-bis(trifluorometil)fenil]carbamoil]-4-clorofenilo, se pueden usar dosis de 10 mg/kg y volúmenes de inyección IP en solución salina (0,5 mL para un ratón de 30 g), que dan concentraciones en suero de Compuesto 1 superiores a 400 ng/mL (Figura 9). Los parámetros PK clave son: velocidad de absorción 0,12  $\text{min}^{-1}$ ; velocidad de eliminación 0,017  $\text{min}^{-1}$ .

Ejemplo 17 - Modelo de apoplejía en animales

- La mayoría de las apoplejías isquémicas (~ 80%) ocurren en la región de la arteria cerebral media (MCA). Para imitar esta lesión en ratones, se usa un modelo de monofilamento intraluminal de oclusión de la arteria cerebral media (MCAo). La oclusión se logra insertando un filamento quirúrgico en la arteria carótida externa (ECA) y enroscándolo hacia adelante en la arteria carótida interna (ICA) hasta que la punta bloquea el origen de la MCA. El cese resultante del flujo sanguíneo da lugar a un infarto cerebral posterior en el territorio de la MCA (Longa, E.Z. et al., *Reversible Middle Cerebral Artery Occlusion Without Craniectomy in Rats*, *Stroke*, 20, 84-91 (1989)). Esta técnica se utiliza para estudiar una oclusión temporal en la que la MCA se bloquea durante una hora. A continuación, se retira el filamento permitiendo que se produzca la reperusión durante 24 horas antes de que se obtengan imágenes del cerebro del animal utilizando barridos ponderados en T2 en un escáner de MRI Bruker 9,4T en el Case Center for Imaging Research (Figura 10). La Figura 10 muestra un solo corte de una MRI ponderada en T2 que muestra el centro del cerebro que muestra la corteza cerebral, el hipocampo, el tálamo, la amígdala y el hipotálamo para un ratón "normal" (paneles de la izquierda) y un ratón que recibe MCAo durante una hora seguida por 24 horas de reperusión (paneles de la derecha). Las líneas discontinuas marcan la línea media del cerebro y muestran un gran cambio en el cerebro MCAo debido al edema cerebral. La línea continua resalta la región de infarto en el cerebro MCAo.

- Supervivencia - Los ratones se tratan con el Compuesto 5 usando una dosis de carga i.p. de 2 mg/kg y 1 mg/mL a una dosis de mantenimiento de 8  $\mu\text{L/h}$  (administrada por una bomba osmótica i.p.) del Compuesto 5, o solución salina administrada (controles;  $n = 17$ ) usando un enfoque idéntico. En este modelo, se observó una mejora del 29,4% en la supervivencia global a las 24 h cuando los animales se tratan con el Compuesto 5 ( $X^2(1) = 4,26$ ;  $P < 0,05$ ).

Edema cerebral - A los ratones se les administra solución salina o se tratan con el Compuesto 5 mediante dosis múltiples de 5 mg/kg i.p. cada tres horas ( $n = 8$  por tratamiento). Este régimen de dosificación es suficiente para mantener una concentración plasmática de Compuesto 1  $> 20 \text{ ng/mL}$  durante la duración del estudio. El volumen

hemisférico ipsilateral y contralateral se mide a partir de las imágenes de MR ponderadas en T2 de ratones 24 horas post-*icus*. El cambio relativo en el volumen hemisférico se calcula como un porcentaje de la diferencia entre el volumen cerebral ipsilateral ( $V_i$ ) y volumen cerebral contralateral ( $V_c$ ) relativo al volumen cerebral contralateral (cambio porcentual en el volumen cerebral hemisférico =  $((V_i - V_c)/V_c) \times 100\%$ ).

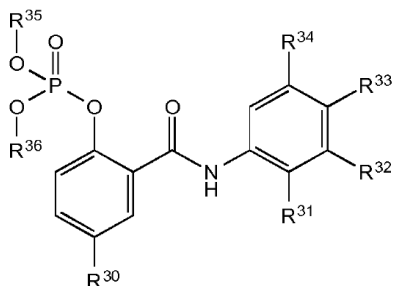
- 5 Los animales de control muestran inflamación en el hemisferio ipsilateral con un cambio relativo en el volumen cerebral ipsilateral de  $13,4\% \pm 1,9\%$ , mientras que los animales que recibieron el Compuesto 5 muestran un cambio de  $4,2 \pm 1,7\%$  ( $P = 0,003$ ,  $\pm$  SEM, véase la Figura 11). Esto representa una reducción de 3,2 veces en la inflamación del cerebro después de MCAo.

- 10 Resultado neurológico - En el mismo experimento anterior, los animales se puntúan en función del resultado neurológico en una escala simple de 5 puntos descrita en Manley, G.T. et al., *Aquaporin-4 Deletion in Mice Reduces Brain Edema after Acute Water Intoxication and Ischemic Stroke*, Nature Medicine, 6, 159-163 (2000). Se observa una mejora en el resultado neurológico para los animales que recibieron el Compuesto 5. Los animales de control tienen una puntuación neurológica media de  $2,77 \pm 0,66$ , mientras que los animales que recibieron el compuesto 5 tienen una puntuación media de  $0,88 \pm 0,31$  (Figura 12, recuadro,  $P = 0,025$ ,  $n = 9$  por tratamiento). Los animales que
- 15 recibieron el Compuesto 5 no progresaron a un estado de parálisis grave o muerte.

Los datos del modelo de apoplejía MCAo junto con el modelo de toxicidad del agua (edema cerebral) vinculan la farmacología del Compuesto 5/Compuesto 1 con mejores resultados en la apoplejía.

REIVINDICACIONES

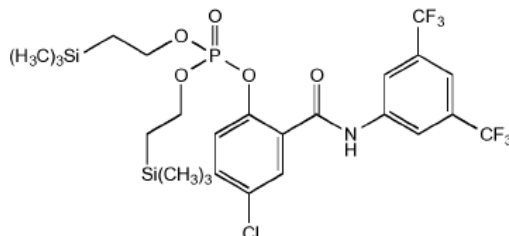
1. Un compuesto de Fórmula III



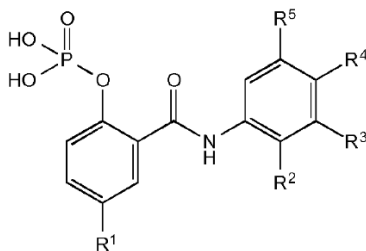
Fórmula III

En donde:

- 5  $R^{30}$  es halógeno,  $R^{31}$  y  $R^{33}$  son H y  $R^{32}$  y  $R^{34}$  son independientemente haloalquilo  $C_{1-4}$ ; y  $R^{35}$  y  $R^{36}$  son independientemente  $-(CH_2CH_2)_n-Si(R^{37})_3$ , en donde cada  $R^{37}$  es independientemente alquilo  $C_{1-6}$  y n es 0 o 1.
2. El compuesto según la reivindicación 1, en el que  $R^{30}$  es Cl y  $R^{32}$  y  $R^{34}$  son  $-CF_3$ .
3. El compuesto según la reivindicación 1 o 2, en el que cada  $R^{37}$  es independientemente alquilo  $C_{1-4}$ .
- 10 4. El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que  $R^{35}$  y  $R^{36}$  son los mismos, en donde opcionalmente  $R^{35}$  y  $R^{36}$  son  $-CH_2-CH_2-Si(CH_3)_3$ .
5. El compuesto según la reivindicación 1, en el que el compuesto es



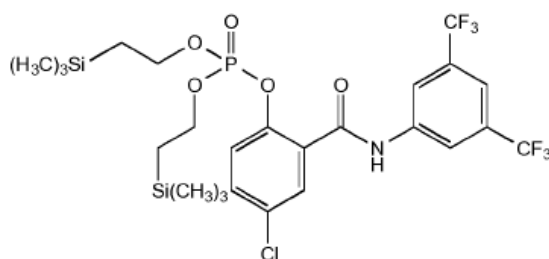
6. Un procedimiento para sintetizar un compuesto de Fórmula IV



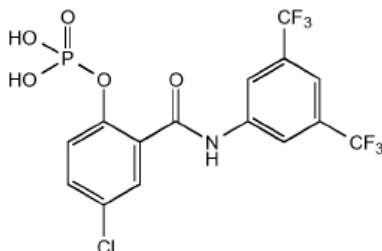
Fórmula IV

que comprende desproteger un compuesto de Fórmula III como se definió en la reivindicación 1, en donde  $R^1$  es halógeno,  $R^2$  y  $R^4$  son H y  $R^3$  y  $R^5$  son independientemente haloalquilo  $C_{1-4}$ .

7. El procedimiento según la reivindicación 6, en el que el compuesto de Fórmula III es



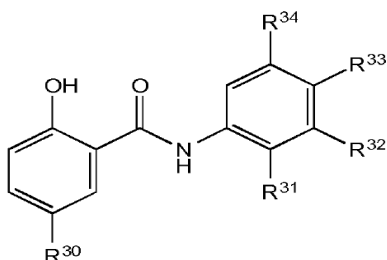
8. El procedimiento según la reivindicación 6 o 7, en donde el compuesto de Fórmula IV es



9. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que el compuesto de Fórmula III se desprotege con un agente desprotector que comprende F, en el que opcionalmente el agente desprotector es fluoruro de tetra-n-butilamonio.

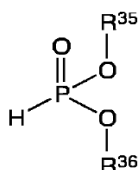
10. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que el compuesto de Fórmula III se desprotege con un agente desprotector que es un ácido, opcionalmente en el que el ácido es CF<sub>3</sub>COOH (TFA).

11. Un procedimiento para sintetizar un compuesto de Fórmula III según la reivindicación 1, que comprende hacer reaccionar un compuesto de Fórmula V



Fórmula V

con un compuesto de Fórmula VI



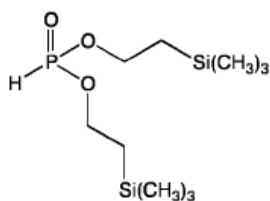
Fórmula VI

En donde:

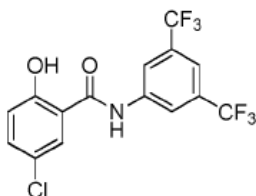
R<sup>30</sup> es halógeno, R<sup>31</sup> y R<sup>33</sup> son H y R<sup>32</sup> y R<sup>34</sup> son independientemente C<sub>1-4</sub>-haloalquilo; y

R<sup>35</sup> y R<sup>36</sup> son independientemente -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-Si(R<sup>37</sup>)<sub>3</sub>, en donde cada R<sup>37</sup> es independientemente alquilo C<sub>1-6</sub> y n es 0 o 1.

12. El procedimiento según la reivindicación 11, en donde el compuesto de Fórmula VI es



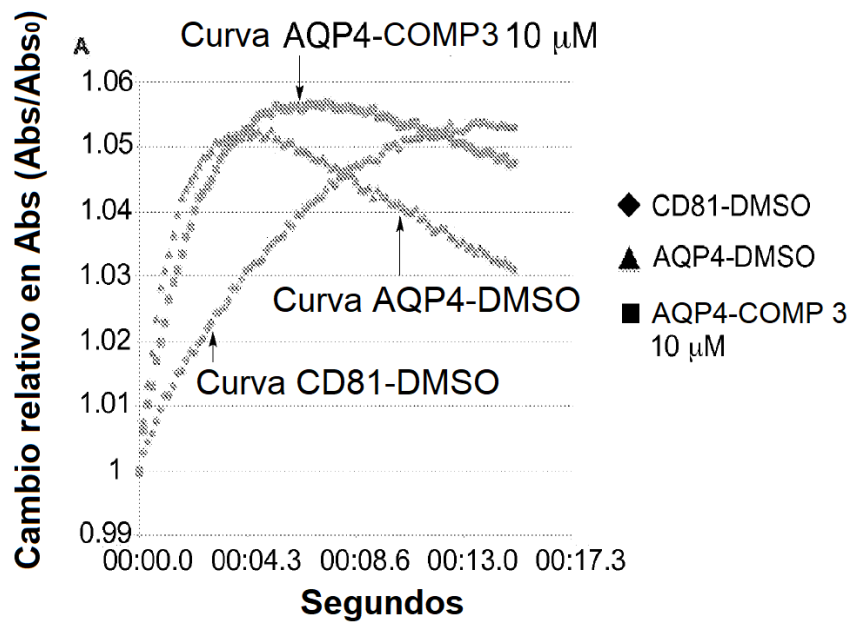
13. El procedimiento según la reivindicación 11 o 12, en donde el compuesto de Fórmula V es



5 14. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 11-13, en el que la reacción se produce en presencia de una base, opcionalmente en el que la base es N,N-diisopropiletilamina.

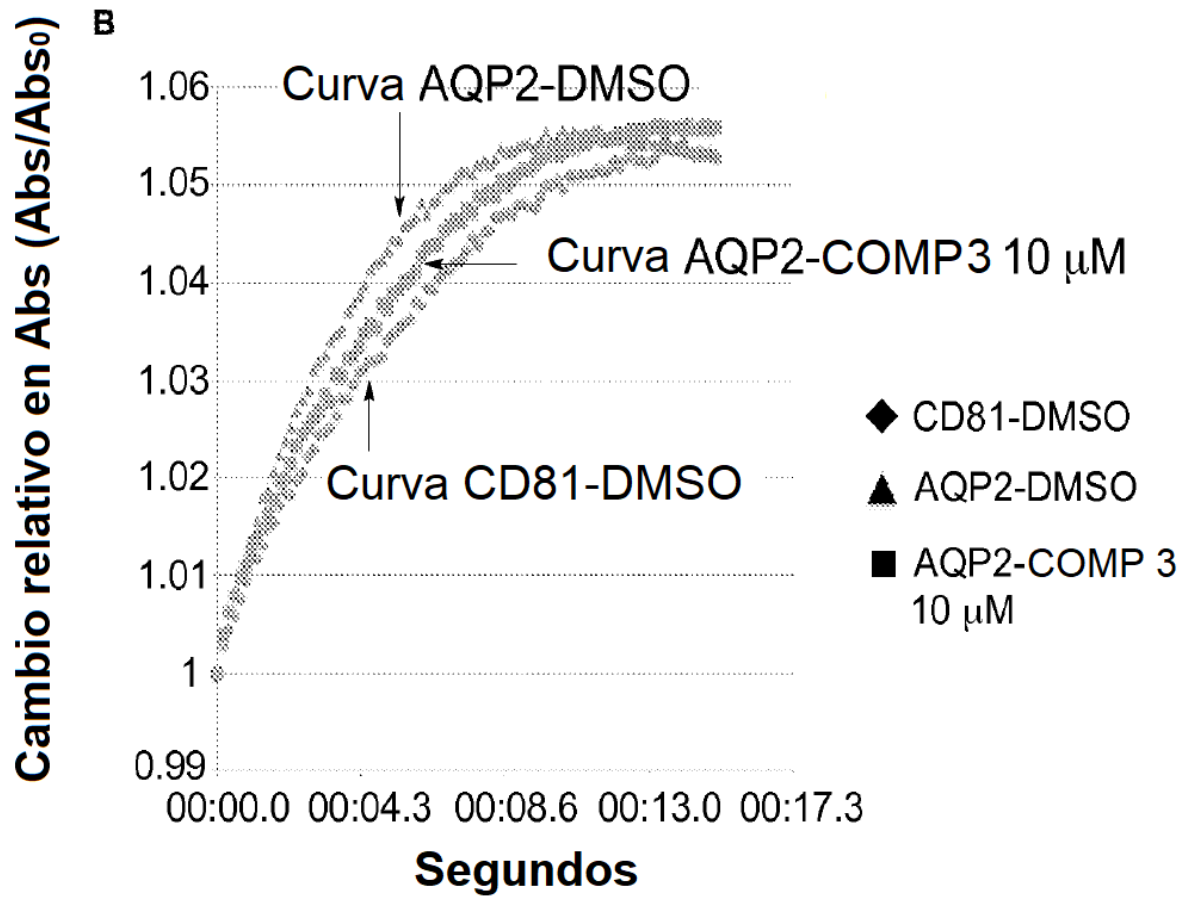
15. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 11-14, en el que la reacción se produce en presencia de un catalizador, en el que opcionalmente el catalizador es 4-dimetilaminopiridina (DMAP), 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU) o 1,5-diazabicyclo[4.3.0]non-5-eno (DBN).

16. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 11-15, en donde la reacción ocurre en  $\text{CH}_3\text{CN}$  y  $\text{CCl}_4$ .

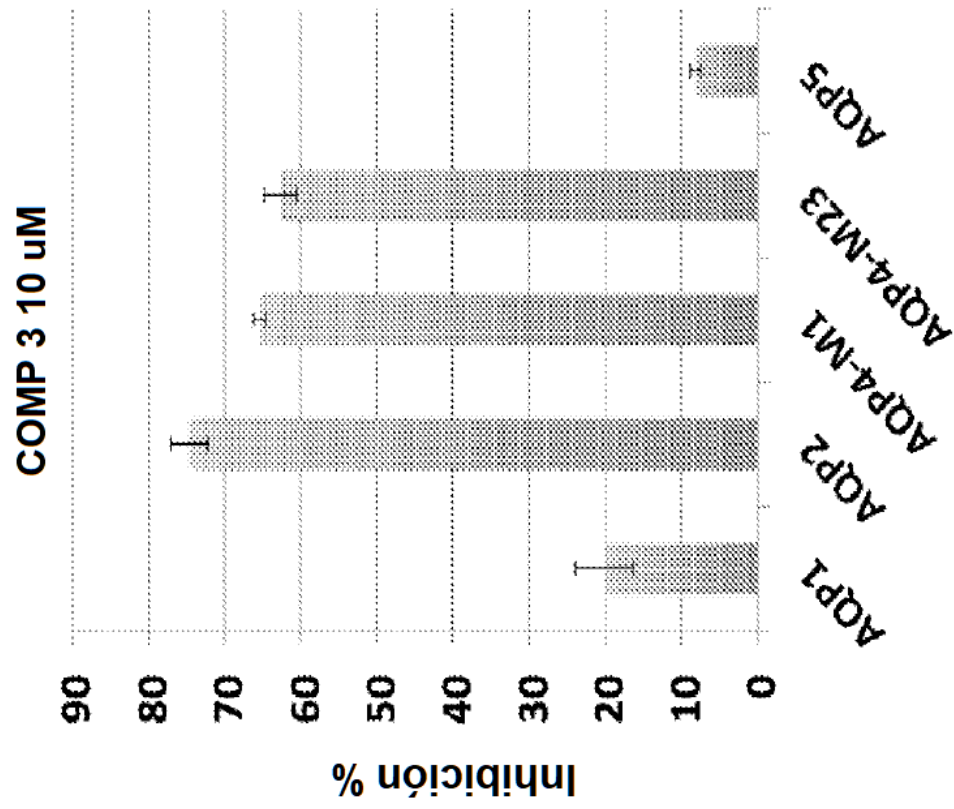


**FIGURA 1A**





**FIGURA 1B**



**FIGURA 2**

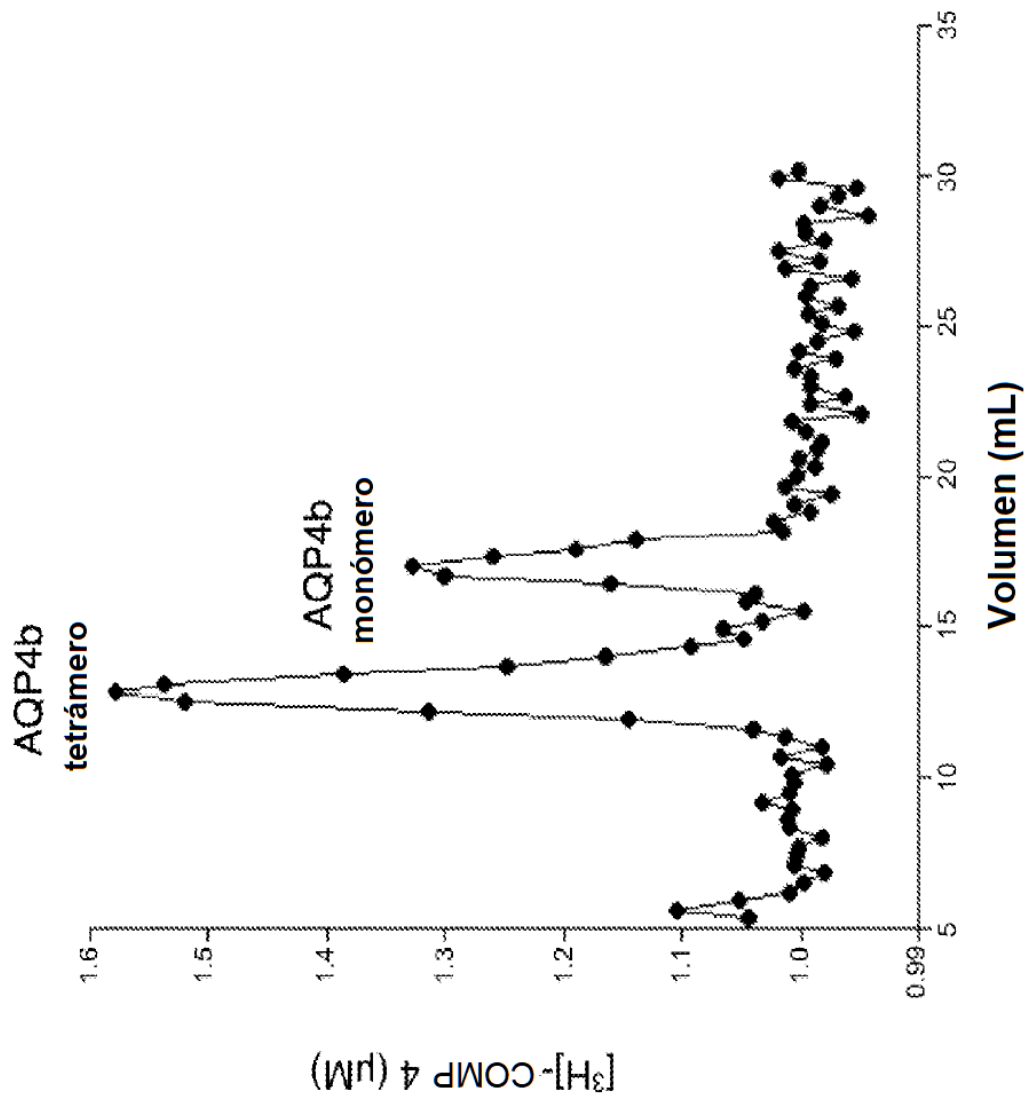


FIGURA 3

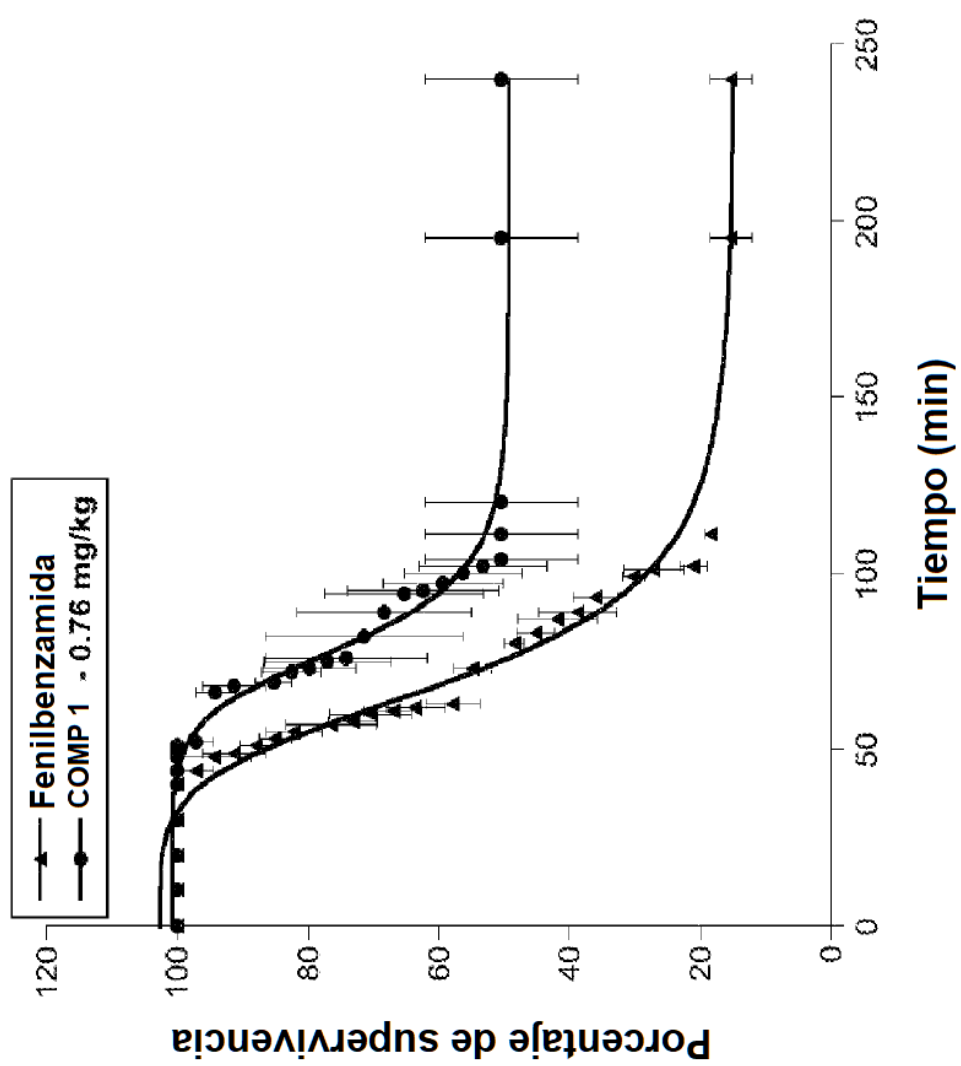


FIGURA 4

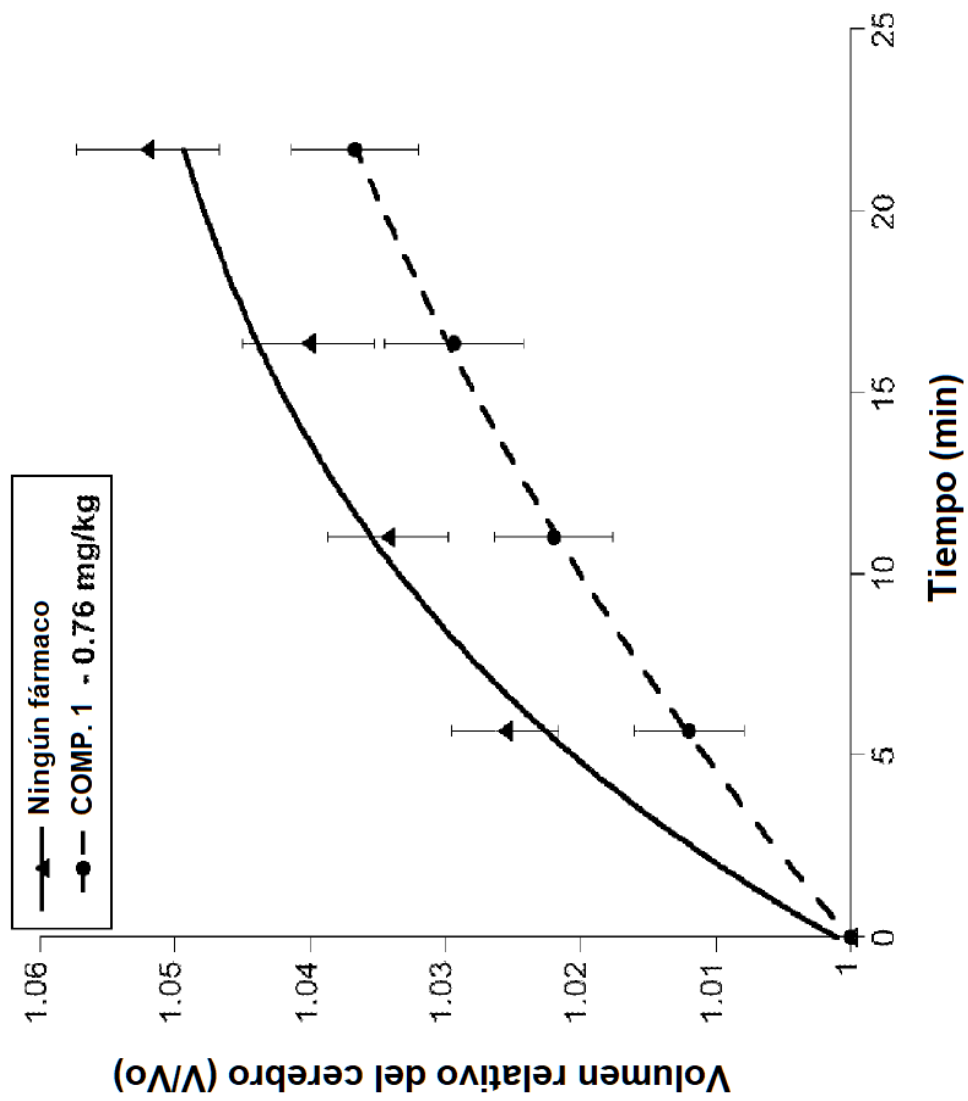
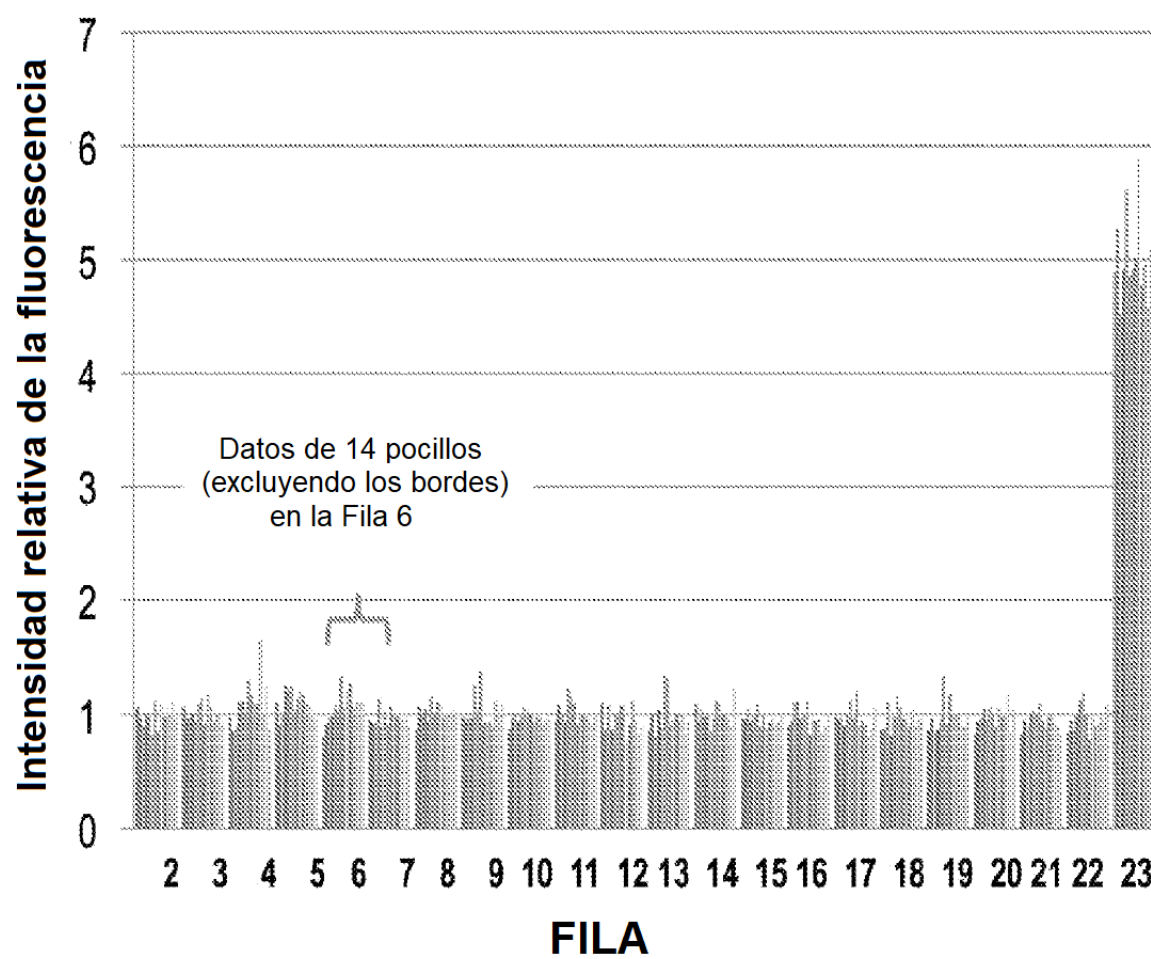


FIGURA 5



**FIGURA 6**

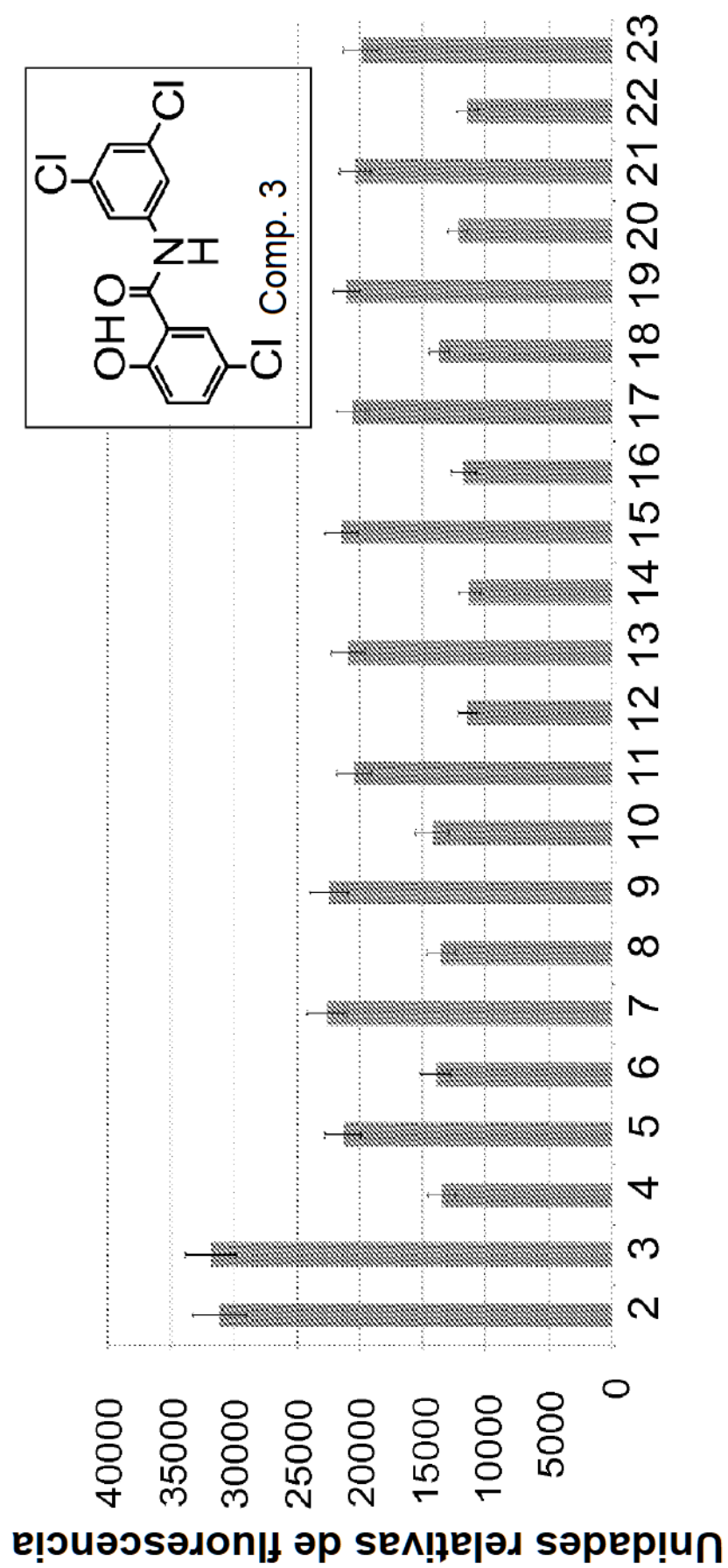


Figura 7

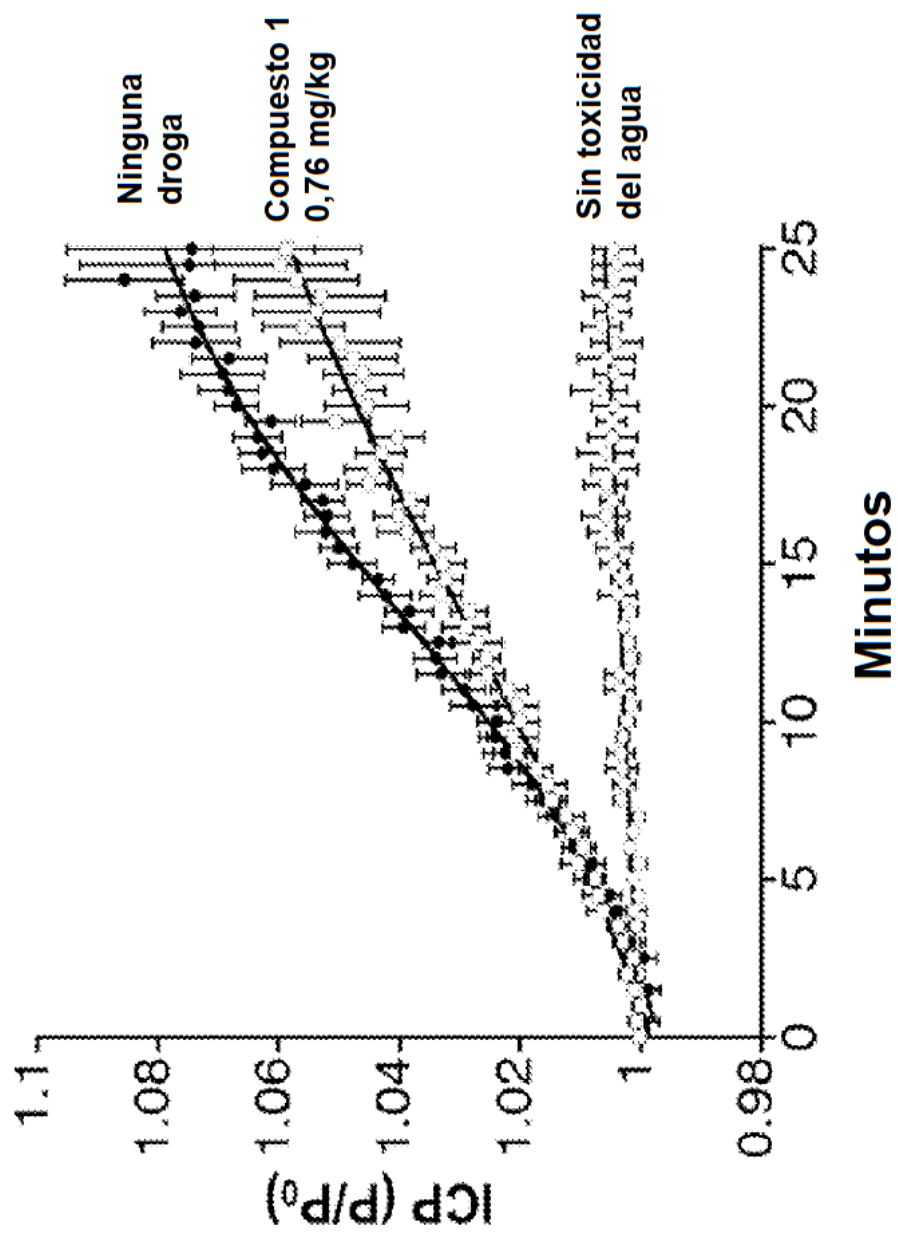
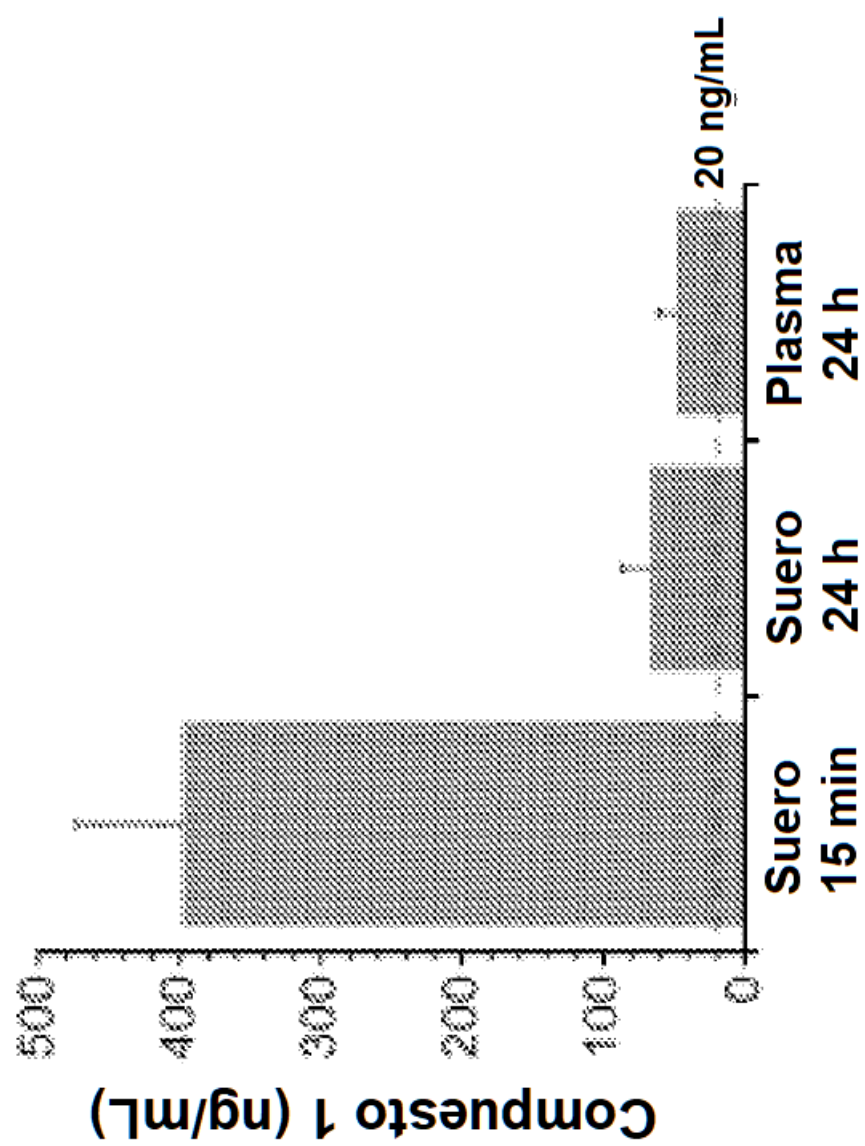


Figura 8



**Figura 9**

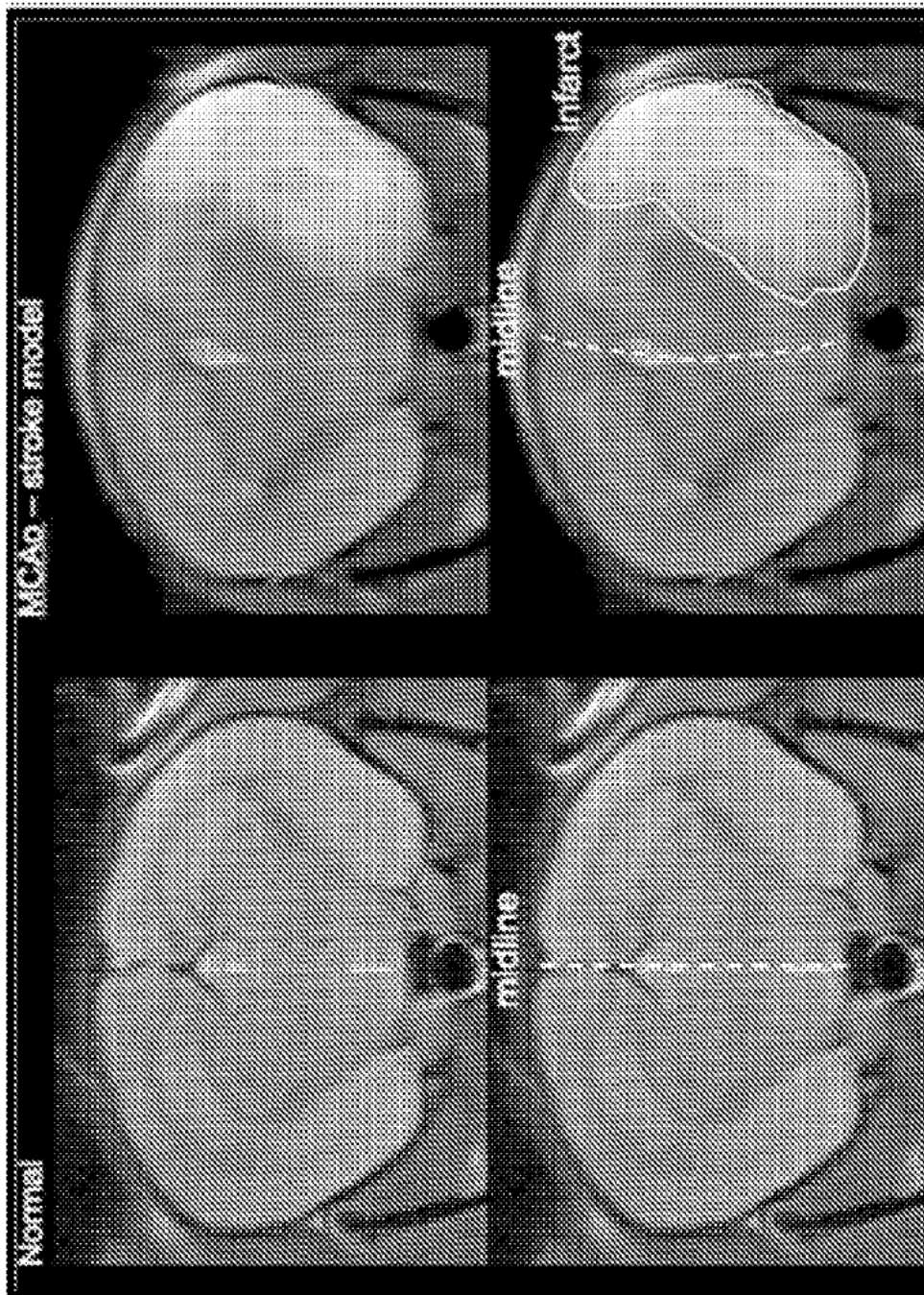


Figure 10

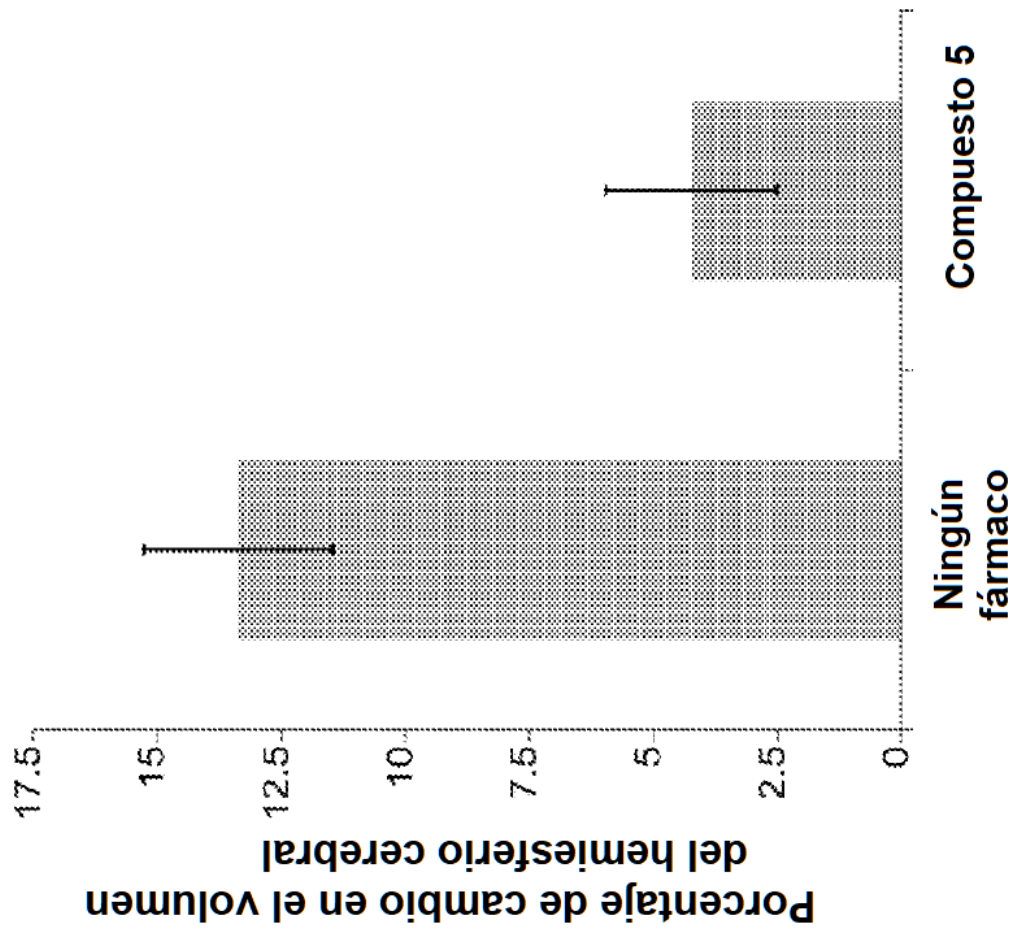


FIGURA 11

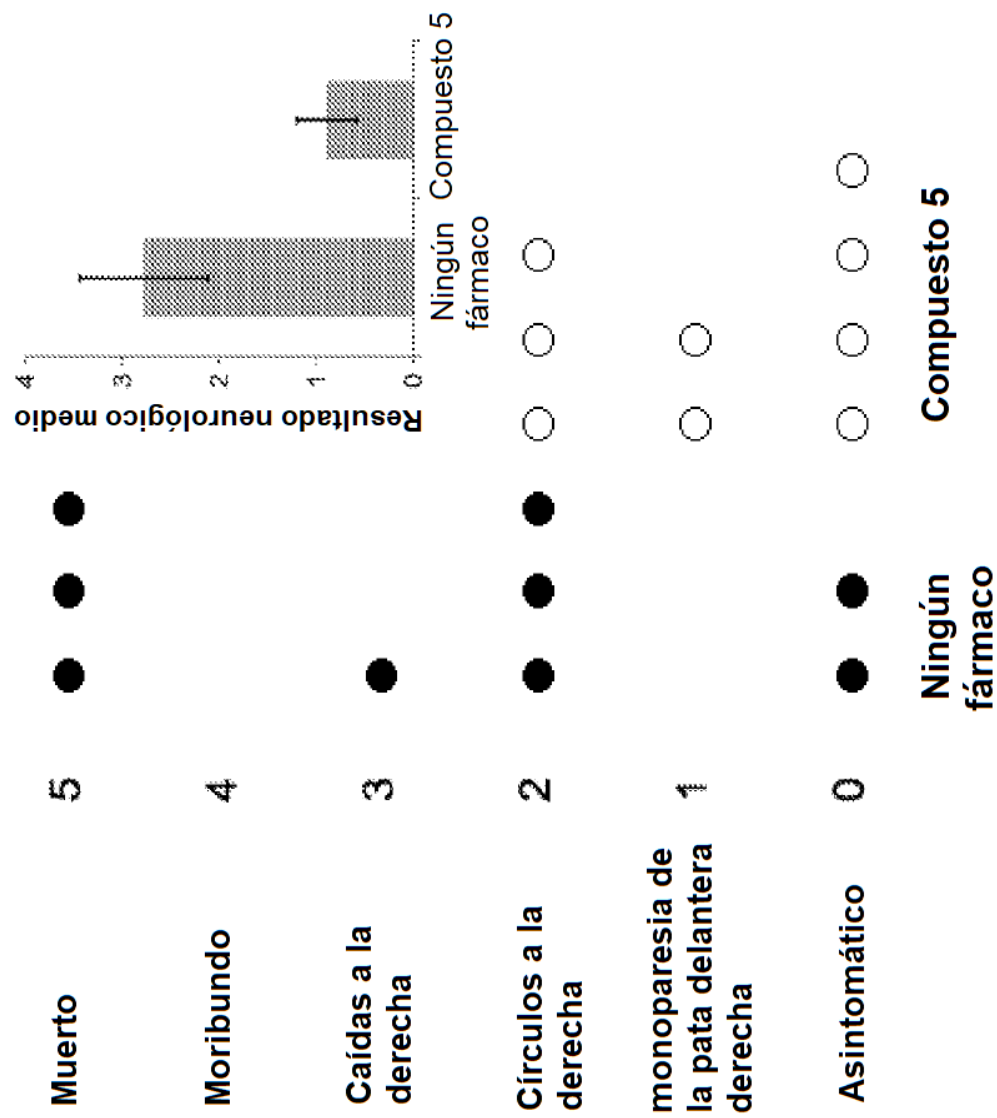


FIGURA 12