

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 378 620**

51 Int. Cl.:
C07D 295/16 (2006.01)
A61K 31/551 (2006.01)
A61K 31/553 (2006.01)
A61K 31/554 (2006.01)
A61K 31/497 (2006.01)
A61K 31/4965 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04758456 .0**
96 Fecha de presentación: **26.03.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1605752**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.12.2005**

54 Título: **SULFONAMIDAS PARA EL TRATAMIENTO DE INSUFICIENCIA CARDIACA CONGESTIVA, SUS COMPOSICIONES Y USOS.**

30 Prioridad:
27.03.2003 US 458702 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2012

73 Titular/es:
**CYTOKINETICS, INC.
280 EAST GRAND AVENUE
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080, US**

72 Inventor/es:
**MORGAN, Bradley, Paul;
MALIK, Fady;
KRAYNACK, Erica, Anne;
MUCI, Alexander, Ramon;
QIAN, Xiangping y
MORGANS, David, J., Jr.**

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 378 620 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

Sulfonamidas para el tratamiento de insuficiencia cardíaca congestiva, sus composiciones y usos.

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a derivados de sulfonamida sustituidos, en particular a compuestos que modulan selectivamente el sarcómero cardíaco, y específicamente a compuestos, formulaciones farmacéuticas y procedimientos de tratamiento para insuficiencia cardíaca sistólica, incluyendo insuficiencia cardíaca congestiva.

10

Antecedentes de la invenciónEl sarcómero cardíaco

15 El "sarcómero" es una estructura celular elegantemente organizada encontrada en el músculo cardíaco y esquelético formado por filamentos delgados y gruesos de interdigitación; Comprende casi el 60% de volumen celular cardíaco. Los filamentos gruesos están constituidos por "miosina," la proteína responsable de la transducción de la energía química (hidrólisis de ATP) en fuerza y movimiento directo. La miosina y sus especies funcionalmente relacionadas se denominan proteínas motoras. Los filamentos delgados están constituidos por un complejo de proteínas. Una de estas proteínas, la "actina" (un polímero filamentoso) es el sustrato en que se saca la miosina durante la generación de fuerza. Una serie de proteínas reguladoras están unidas a la actina, "complejo de troponina" y "tropomiosina." que hace la interacción actina-miosina dependiente de cambios en los niveles de Ca^{2+} intracelulares. Con cada latido del corazón, los niveles Ca^{2+} suben y bajan, iniciando la contracción muscular cardíaca y después la relajación muscular cardíaca (Robbins J y Lelwand LA. (1.999) Molecular Basis of Cardiovascular Disease, Capítulo 8. editor Chien, K. R., W. B. Sanders, Filadelfia). Cada uno de los componentes del sarcómero contribuye a su respuesta contráctil.

La miosina es la más extensamente estudiada de todas las proteínas motoras. De las trece clases diferentes de miosina en las células humanas, la clase miosina-II es responsable de la contracción del músculo esquelético, cardíaco y liso. Esta clase de miosina es significativamente diferente en la composición de aminoácidos y en la estructura total de la miosina, en las otras doce clases diferentes (Goodson HV y Spudich JA. (1.993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:659-663). La miosina-II consiste en dos dominios de cabeza globular unidos entre sí por una cola de doble arrollamiento alfa-helicoidal que se une con otras miosinas-II para formar el núcleo del filamento grueso de sarcómero. Las cabezas globulares tienen un dominio catalítico en que tiene lugar la unión de la actina y las funciones ATP de la miosina. Una vez unida a un filamento de actina, la liberación de fosfato (cf. ATP a ADP) conduce a un cambio en la conformación estructural del dominio catalítico que a su vez modifica la orientación del dominio de brazo palanca de unión a cadena ligera que se extiende desde la cabeza globular; este movimiento se denomina descarga eléctrica. Este cambio en la orientación de la cabeza de miosina en relación con actina ocasiona que el filamento grueso del que es una parte se mueva con respecto al filamento de actina delgado al que está unida (Spudich JA. (2.001) Nat Rev Mol Cell Biol. 2(5): 387-92). La unión no obligatoria de la cabeza globular del filamento de actina (también modulada en Ca^{2+}) acoplada con el retorno del dominio catalítico y la cadena ligera a su conformación/orientación de partida completa el ciclo de contracción y relajación.

El músculo cardíaco de los mamíferos consiste en dos formas de miosina cardíaca, alfa y beta, y están bien caracterizadas (Robbins, *supra*). La forma beta es la forma predominante (> 90 por ciento) en el músculo cardíaco humano adulto. Se ha observado que las dos regulan las afecciones por insuficiencia cardíaca humana en los niveles tanto transcripcional como traslacional (Miyata *supra*), estando la forma alfa regulada hacia abajo en la insuficiencia cardíaca.

Se han determinado las secuencias de todas las miosinas del músculo esquelético, cardíaco y liso, humanas. Mientras las alfa y beta miosinas cardíacas son muy similares (identidad del 93%), ambas son considerablemente diferentes de las miosinas del músculo liso humano (identidad del 42%) y más estrechamente relacionadas con miosinas esqueléticas (identidad del 80%). Convenientemente, las miosinas del músculo cardíaco se conservan increíblemente por especies de mamífero. Por ejemplo, tanto las Miosinas cardíacas alfa como las beta están conservadas > 96% entre los seres humanos y las ratas y la secuencia de 250 restos disponible de beta-miosina cardíaca porcina se conserva en un 100% con la secuencia de beta miosina cardíaca humana correspondiente. Tal conservación de secuencia contribuye a la capacidad para predecir la terapéutica basada en miosina de estudio en modelos basados en animales de insuficiencia cardíaca.

Los componentes del sarcómero cardíaco presentan dianas para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca, por ejemplo aumentando la contractilidad o facilitando la completa relajación para modular la función sistólica y diastólica, respectivamente.

Insuficiencia cardíaca

La insuficiencia cardíaca congestiva ("ICC") no es una enfermedad específica, sino más bien una constelación de signos y síntomas, todos los cuales están originados por una incapacidad del corazón para responder adecuadamente al esfuerzo por aumento del rendimiento cardíaco. La fisiopatología dominante asociada a ICC es la disfunción sistólica, una deficiencia de contractilidad cardíaca (con una consiguiente reducción en la cantidad de sangre expulsada con cada latido del corazón). La disfunción sistólica con dilatación compensatoria de las cavidades ventriculares da como resultado la forma más común de insuficiencia cardíaca, "cardiomiopatía dilatada," que con frecuencia se considera que es una de lo mismo que ICC. La contrapartida a la disfunción sistólica es la disfunción diastólica, una deficiencia de la capacidad para llenar los ventrículos de sangre, que también puede dar como resultado insuficiencia cardíaca incluso con función ventricular izquierda preservada. La insuficiencia cardíaca congestiva está asociada por último a la función incorrecta del propio miocito cardíaco, que implica una disminución en su capacidad para contraerse y relajarse.

Muchas de las afecciones subyacentes pueden dar lugar a disfunción sistólica y/o diastólica, tal como aterosclerosis, hipertensión, infección vírica, disfunción vascular y trastornos genéticos. Los pacientes con estas afecciones presentan típicamente los mismos síntomas clásicos: falta de aliento, edema y fatiga contundente. En aproximadamente la mitad de los pacientes con cardiomiopatía dilatada, la causa de su disfunción cardíaca es cardiopatía isquémica debida a aterosclerosis coronaria. Estos pacientes han tenido o un solo infarto de miocardio o múltiples infartos de miocardio; en la presente memoria, la consiguiente cicatrización y da como resultado remodelación en el desarrollo de un corazón dilatado e hipocontráctil. A veces el agente causante no se puede identificar, así la enfermedad se refiere como "cardiomiopatía dilatada idiopática." Con independencia de origen isquémico u otro origen, los pacientes con cardiomiopatía dilatada comparten un pésimo pronóstico, excesiva morbilidad y alta mortalidad.

La preponderancia de ICC ha crecido a proporciones epidémicas a medida que envejece la población y a medida que los cardiólogos han llegado a tener más éxito en la reducción de la mortalidad por cardiopatía isquémica, el preludio más común de ICC. A más o menos 4,6 millones de personas en los Estados Unidos se les ha diagnosticado ICC; la frecuencia de tal diagnóstico se aproxima a 10 por 1.000 después de los 65 años. La hospitalización por ICC es normalmente el resultado del inadecuado tratamiento del paciente externo. Las altas hospitalarias por ICC se elevan desde 377.000 (en 1.979) a 957.000 (en 1.997) haciendo a la ICC el diagnóstico de altas más común en personas de 65 años y más. La mortalidad a los cinco años por ICC se aproxima al 50% (Levy D. (2.002) New Engl J Med. 347 (18): 1.442-4). Por lo tanto, mientras los tratamientos para la insuficiencia cardíaca han mejorado enormemente y las esperanzas de vida se han prolongado durante los últimos años, se siguen buscando tratamientos nuevos y mejores, en particular para ICC.

La insuficiencia cardíaca congestiva "aguda" (también conocida como insuficiencia cardíaca "descompensada" aguda) implica una caída precipitada en la función cardíaca resultado de una variedad de causas. Por ejemplo, en un paciente que tiene ya insuficiencia cardíaca congestiva, un nuevo infarto de miocardio, suspensión de medicaciones y una mala dieta pueden conducir todos a la acumulación de fluido de edema e insuficiencia metabólica incluso en el estado de reposo. Un agente terapéutico que aumenta la función cardíaca durante tal episodio agudo podría ayudar a aliviar esta insuficiencia metabólica y acelerar la eliminación de edema, facilitando el retorno al estado más estable de insuficiencia cardíaca congestiva "compensada". Los pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva muy avanzada en particular los que están en la última fase de la enfermedad también se podrían beneficiar de un agente terapéutico que aumente la función cardíaca, por ejemplo, para estabilización mientras se espera un trasplante cardíaco. Otros beneficios potenciales se podían proporcionar a pacientes a los que se les quita una bomba *bypass*, por ejemplo, por administración de un agente que ayude al corazón parado o ralentizado en la reanudación de la función normal. Los pacientes que presentan disfunción diastólica (relajación insuficiente del músculo cardíaco) se podían beneficiar de un agente terapéutico que module la relajación.

Agentes activos terapéuticos

Los inótrópos son fármacos que aumentan la capacidad contráctil del corazón. Como grupo, todos los inótrópos actuales han fracasado en satisfacer el estándar de oro para el tratamiento de insuficiencia cardíaca, es decir, para prolongar la supervivencia del paciente. Además, los actuales agentes son poco selectivos para el tejido cardíaco, conduciendo en parte a efectos adversos reconocidos que limitan su uso. A pesar de este hecho, los inótrópos intravenosos continúan usándose extensamente en insuficiencia cardíaca aguda (por ejemplo, para permitir la reinstauración de medicaciones orales o salvar pacientes por trasplante de corazón) mientras en insuficiencia cardíaca crónica, se usa digoxina administrada por vía oral como un inótrópo para aliviar los síntomas del paciente, mejorar la calidad de vida y reducir las admisiones hospitalarias.

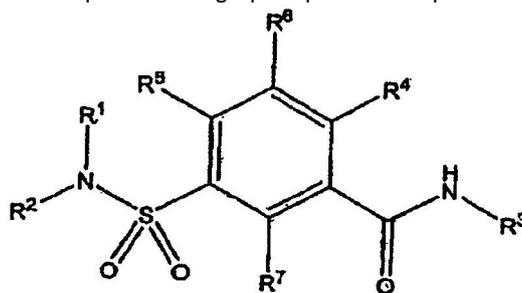
Dadas las limitaciones de los agentes actuales, se requieren nuevas propuestas para mejorar la función cardíaca en insuficiencia cardíaca congestiva. El agente intravenoso a corto plazo más recientemente homologado, la milrinona, tiene ahora casi quince años. El único fármaco oral disponible, la digoxina, tiene más de 200 años. Queda una gran necesidad de agentes que exploten nuevos mecanismos de acción y pueden tener mejores resultados en términos de alivio de los síntomas, seguridad y mortalidad de pacientes, tanto a corto como a largo plazo. Nuevos agentes

con un índice terapéutico mejorado sobre agentes actuales proporcionarán un medio para conseguir estos resultados clínicos.

5 La selectividad de los agentes dirigidos al sarcómero cardíaco (por ejemplo, mediante beta miosina cardíaca diana) se ha identificado como un medio importante para lograr este índice terapéutico mejorado. La presente invención proporciona tales agentes (en particular agentes de activación del sarcómero) y procedimientos para su identificación y uso.

Sumario de la invención

10 La presente invención proporciona compuestos, composiciones farmacéuticas y procedimientos para el tratamiento de insuficiencia cardíaca incluyendo ICC, en particular insuficiencia cardíaca sistólica. Las composiciones son moduladores selectivos del sarcómero cardíaco, por ejemplo, potenciadores de la miosina cardíaca. En un aspecto, la invención se refiere a uno o más compuestos del grupo representado por la Fórmula I:



Fórmula I

15 en la que:

R¹, R² y el nitrógeno al que están unidos forman un anillo heterocíclico de 5, 6 ó 7 miembros opcionalmente sustituido;

20 R³ es un grupo fenilo, isoxazolilo, oxazolilo, piridinilo, pirazinilo, pirimidinilo, tetrazol-5-ilo, tiazolilo, tiadiazolilo o imidazolilo que está opcionalmente sustituido con un halógeno, alcoxi inferior, un grupo arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido;

25 R⁴ es halógeno;

R⁵ es hidrógeno, halógeno, hidroxilo o alquilo inferior opcionalmente sustituido y

30 R⁶ y R⁷ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en: hidrógeno, halógeno, hidroxilo y alquilo inferior opcionalmente sustituido;

35 incluyendo simples estereoisómeros, mezclas de estereoisómeros y las sales farmacéuticamente aceptables, solvatos y solvatos de sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, en los que alquilo inferior se refiere a grupos alquilo de 1 a 5 átomos de carbono y alcoxi inferior se refiere a grupos alcoxi que contienen uno a cuatro carbonos. Los compuestos de Fórmula I son útiles como agentes activos para uso en procedimientos de tratamiento y en la fabricación de las formulaciones farmacéuticas de la invención y como intermedios en la síntesis de tales agentes activos.

40 Otros aspectos más de la invención se refieren a una formulación farmacéutica incluyendo un excipiente farmacéuticamente aceptable y a compuestos para uso en un procedimiento de tratamiento para insuficiencia cardíaca, implicando cada uno una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto, isómero, sal o solvato representado por la Fórmula I.

45 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona procedimientos de selección para compuestos que se unan a miosina (en particular miosina II o β miosina), por ejemplo compuestos que desplacen o compitan con la unión de los compuestos de Fórmula I. Los procedimientos comprenden combinar un compuesto de Fórmula I marcado opcionalmente, miosina, y al menos un agente candidato y determinar la unión del agente candidato a miosina.

50 En la presente memoria se divulgan procedimientos de selección para moduladores de la actividad de la miosina. Los procedimientos comprenden combinar un compuesto de Fórmula I, miosina, y al menos un agente candidato y determinar los efectos del agente candidato sobre la actividad de la miosina.

Otros aspectos y realizaciones serán evidentes para los expertos en la materia a partir de la siguiente descripción detallada.

Descripción detallada

5 La presente invención proporciona compuestos útiles en la modulación selectiva del sarcómero cardíaco, por ejemplo, por potenciación de miosina cardíaca. Los compuestos se pueden usar para tratar insuficiencia cardíaca incluyendo ICC, en particular insuficiencia cardíaca sistólica. La invención se refiere además a formulaciones farmacéuticas que comprenden compuestos de la invención, y a emplear tales compuestos o composiciones en procedimientos de tratamiento. Las composiciones son moduladores selectivos del sarcómero cardíaco, por ejemplo, 10 potenciando la miosina cardíaca.

DEFINICIONES

15 Como se usa en la presente memoria descriptiva, se desea en general que las siguientes palabras y expresiones tengan los significados como se explica a continuación, excepto hasta el punto que el contexto en que se usan lo indique de otro modo. Las siguientes abreviaturas y términos tienen los significados indicados en todo:

20 Ac = acetilo

Boc = terc-butiloxycarbonilo

c- = ciclo

25 CBZ = carbobenzoxi = benciloxycarbonilo

DCM = diclorometano = cloruro de metileno = CH_2Cl_2

DIEA = DIPEA = N,N-diisopropiletilamina

30 DMF = N,N-dimetilformamida

DMSO = dimetilsulfóxido

35 Et = etilo

EtOAc = acetato de etilo

EtOH = etanol

40 GC = cromatografía de gases

h = hora

45 HATU = hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N-tetrametiluronio

HBTU = hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio

HOAt = 7-aza-1-hidroxibenzotriazol

50 HOBt = 1-Hidroxibenzotriazol

Me = metilo

55 min = minuto

ml = mililitro

Ph = fenilo

60 ta = temperatura ambiente

s- = secundario

65 t- = terciario

TES = trietilsilano

TFA = ácido trifluoroacético

5 THF = tetrahidrofurano

TLC = cromatografía de capa fina

10 Los términos "opcional" u "opcionalmente" significan que los casos o circunstancias descritas con posterioridad pueden ocurrir o no y que la descripción incluye casos en que dicho caso o circunstancia tiene lugar y casos en que no tiene lugar. Por ejemplo, "alquilo opcionalmente sustituido" significa o "alquilo" o "alquilo sustituido," como se define a continuación. Se entenderá por los expertos en la materia con respecto a cualquier grupo que contenga uno o más sustituyentes de manera que no se pretende que los grupos introduzcan cualquier sustitución o modelos de sustitución que no sean prácticos desde el punto de vista estérico, no factible sintéticamente y/o inherentemente inestable.

15 Se desea que "alquilo" incluya estructuras hidrocarbonadas lineales, ramificadas o cíclicas y combinaciones de las mismas. Alquilo inferior se refiere a grupos alquilo de 1 a 5 átomos de carbono. Ejemplos de grupos alquilo inferior incluyen metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, s- y t-butilo y similares. Los grupos alquilo preferidos son aquéllos de 20 átomos de carbono o por debajo. Grupos alquilo más preferido son aquéllos de 13 átomos de carbono o menos. Grupos alquilo incluso más preferidos son aquéllos de 6 átomos de carbono y menos. Cicloalquilo es un subconjunto de alquilo e incluye grupos hidrocarbonados cíclicos de 3 a 13 átomos de carbono. Ejemplos de grupos cicloalquilo incluyen c-propilo, c-butilo, c-pentilo, norbornilo, adamantilo y similares. En esta solicitud, alquilo se refiere a restos alcanilo, alquenilo y alquinilo; se desea incluir ciclohexilmetilo, vinilo, alilo, isoprenilo y similares. Alquileno es otro subconjunto de alquilo, que se refiere a los mismos restos que alquilo, pero con dos puntos de unión. Ejemplos de alquileno incluyen etileno (-CH₂CH₂-), propileno (-CH₂CH₂CH₂-), dimetilpropileno (-CH₂C(CH₃)₂CH₂-) y ciclohexilpropileno (-CH₂CH₂CH(C₆H₁₃)-).

20 Cuando se nombra un resto alquilo con un número específico de carbonos, se desea que se incluyan todos los isómeros geométricos con ese número de carbonos; así, por ejemplo, "butilo" significa que se incluyen n-butilo, sec-butilo, isobutilo y t-butilo; "propilo" incluye n-propilo e isopropilo.

25 La expresión "alcoxi" o "alcoxilo" se refiere a los grupos alquil-O-, incluyendo preferiblemente de 1 a 8 átomos de carbono de una configuración lineal, ramificada, cíclica y combinaciones de las mismas unidas a la estructura precursora por un oxígeno. Ejemplos incluyen metoxi, etoxi, propoxi, isopropoxi, ciclopropiloxi, ciclohexiloxi y similares. Alcoxi inferior se refiere a grupos que contienen uno a cuatro carbonos.

30 La expresión "alcoxi sustituido" se refiere a los grupos -O-(alquilo sustituido). Un grupo alcoxi sustituido preferido es "polialcoxi" u -O-(alquileno opcionalmente sustituido)-(alcoxi opcionalmente sustituido) e incluyen grupos tales como -OCH₂CH₂OCH₃, y éteres de glicol tales como polietilenglicol y -O(CH₂CH₂O)_xCH₃, en la que x es un número entero de 2-20, preferiblemente 2-10 y más preferiblemente 2-5. Otro grupo alcoxi sustituido preferido es hidroxialcoxi u -OCH₂(CH₂)_yOH, en la que y es un número entero de 1-10, preferiblemente 1-4.

35 "Acilo" se refiere a grupos de 1 a 10 átomos de carbono de una configuración lineal, ramificada, cíclica, saturada, insaturada y aromática y combinaciones de las mismas, unidos a la estructura padre a través de una funcionalidad carbonilo. Uno o más carbonos en el resto acilo se pueden reemplazar por nitrógeno, oxígeno o azufre siempre que el punto de unión al padre permanezca en el carbonilo. Ejemplos incluyen acetilo, benzilo, propionilo, isobutirilo, t-butoxicarbonilo y benciloxicarbonilo. "Acilo inferior" se refiere a grupos que contienen uno a cuatro carbonos y "aciloxi" se refiere a los grupos acil-O.

40 El término "amino" se refiere a los grupos-NH₂. La expresión "amino sustituido" se refiere al grupo -NHR o -NRR en el que cada R se selecciona independientemente del grupo: alquilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, amino opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, heterocicliilo opcionalmente sustituido, acilo, alcoxycarbonilo sulfanilo, sulfino y sulfonilo, por ejemplo, dietilamino, metilsulfonilamino, furanil-oxi-sulfonamino.

45 "Ariilo" significa un anillo aromático de 5 ó 6 miembros, un sistema de anillo aromático de 9 ó 10 miembros bicíclico o un sistema de anillo aromático de 12 a 14 miembros tricíclico. Ejemplos incluyen ciclopenta-1,3-dieno, fenilo, naftilo, indano, tetralina, fluoreno, ciclopenta[b]naftaleno y antraceno.

50 "Aralcoxi" se refiere a los grupos-O-aralquilo. Similarmente, "heteroaralcoxi" se refiere a los grupos-O-heteroaralquilo; "ariloxi" se refiere a -O-arilo; y "heteroariloxi" se refiere a los grupos-O-heteroarilo.

55 "Aralquilo" se refiere a un resto en que un resto arilo se une a la estructura padre mediante un resto alquilo. Ejemplos incluyen bencilo, fenetilo, fenilvinilo y fenilalilo. "Heteroaralquilo" se refiere a un resto en que un resto

heteroarilo se une a la estructura padre mediante un resto alquilo. Ejemplos incluyen furanilmetilo, piridinilmetilo y pirimidinilmetilo.

5 "ATPasa" se refiere a una enzima que hidroliza ATP. ATPasas incluyen proteínas que comprenden motores moleculares tales como las miosinas.

10 "Halógeno" o "halo" se refiere a flúor, cloro, bromo o yodo. Se prefieren flúor, cloro y bromo. Dihaloarilo, dihaloalquilo, trihaloarilo, etc. se refieren a arilo y alquilo sustituidos con una pluralidad de halógenos, pero no necesariamente una pluralidad del mismo halógeno; así 4-cloro-3-fluorofenilo está dentro del ámbito de dihaloarilo.

15 "Heteroarilo" significa un anillo aromático de 5 ó 6 miembros que contiene 1-4 heteroátomos, un sistema de anillo aromático de 8, 9 ó 10 miembros bicíclico que contiene 1-4 (o más) heteroátomos o un sistema de anillo aromático de 11 a 14 miembros tricíclico que contiene 1-4 (o más) heteroátomos; los heteroátomos se seleccionan de O, N y S. Ejemplos incluyen furano, pirrol, tiofeno, pirazol, imidazol, triazol, tetrazol, ditiol, oxazol, isoxazol, oxadiazol, tiazol, tiopirano, piridina, piridazina, pirimidina, pirazina, indol, benzofurano, benzotiofeno, quinolina, isoquinolina y quinoxalina. "Heterociclo" o "heterociclilo" se refiere a un resto cicloalquilo en que uno a cuatro de los carbonos es reemplazado por un heteroátomo tal como oxígeno, nitrógeno o azufre. Un anillo no aromático de 4, 5, 6 ó 7 miembros que contiene 1-4 heteroátomos, un sistema de anillo no aromático de 8, 9 ó 10 miembros bicíclico que contiene 1-4 (o más) heteroátomos o un sistema de anillo no aromático de 11 a 14 miembros tricíclico que contiene 1-4 (o más) heteroátomos; los heteroátomos se seleccionan de O, N y S. Ejemplos incluyen pirrolidina, tetrahidrofurano, tetrahidro-tiofeno, tiazolidina, piperidina, tetrahidro-pirano, tetrahidro-tiopirano, piperazina, morfina, tiomorfolina y dioxano. Heterociclilo incluye también sistemas de anillo que incluyen enlaces insaturados a condición de que el número y la posición de la insaturación no haga aromático al grupo.

25 Ejemplos incluyen imidazolina, oxazolina, tetrahydroisoquinolina, benzodioxano, benzodioxol y 3,5-dihidrobenzoxazinilo. Ejemplos de heterociclilo sustituido incluyen 4-metil-1-piperazinilo y 4-bencil-1-piperidinilo.

30 Son "isómeros" diferentes compuestos que tienen la misma fórmula molecular. "Estereoisómeros" son isómeros que difieren sólo en la manera en que los átomos se disponen en el espacio. "Enantiómeros" son un par de estereoisómeros que son imágenes especulares no superponibles entre sí. Una mezcla 1:1 mezcla de un par de enantiómeros es una mezcla "racémica". La expresión "(±)" se usa para designar una mezcla racémica cuando sea apropiado. "Diaestereoisómeros" son estereoisómeros que tienen al menos dos átomos asimétricos, pero que no son imágenes especulares entre sí. La estereoquímica absoluta se especifica de acuerdo con el sistema R-S de Cahn-Ingold-Prelog. Cuando un compuesto es un enantiómero puro la estereoquímica en cada carbono quiral se puede especificar mediante un R o S. los compuestos resueltos cuya configuración absoluta es desconocida se pueden denominar (+) o (-) dependiendo de la dirección (dextro- o levorotatoria) que hacen rotar la luz polarizada plana a la longitud de onda de la línea D del sodio. Algunos compuestos descritos en la presente memoria contienen uno o más centros asimétricos y así pueden dar lugar a enantiómeros, diastereómeros y otras formas estereoisómeras que se pueden definir, en términos de estereoquímica absoluta, como (R)- o (S)-. La presente invención pretende incluir todos los isómeros posibles, incluyendo mezclas racémicas, formas ópticamente puras y mezclas intermedias. Isómeros (R)- y (S)- ópticamente activos se pueden preparar usando sintones quirales o agentes reaccionantes quirales o resolver usando técnicas convencionales. Cuando los compuestos descritos en la presente memoria contienen dobles enlaces olefínicos u otros centros de asimetría geométrica y a menos que se especifique de otro modo, se desea que los compuestos incluyan tanto isómeros geométricos E como Z. asimismo, también se desea que estén incluidas todas las formas tautómeras.

50 La expresión "portador farmacéuticamente aceptable" o "excipiente farmacéuticamente aceptable" incluye cualquier y todos los disolventes, medio de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares. El uso de dicho medio y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica. Excepto en la medida en que dicho medio o agente es incompatible con el ingrediente activo, se considera su uso en las composiciones terapéuticas. También se pueden incorporar ingredientes activos suplementarios a las composiciones.

55 La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a sales que retienen la eficacia biológica y las propiedades de los compuestos de esta invención y, que no son indeseables biológicamente o de otro modo. En muchos casos, los compuestos de esta invención pueden formar sales de ácido y/o base debido a la presencia de grupos amino y/o carboxilo o grupos similares a los mismos. se pueden formar sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables con ácidos inorgánicos y ácido orgánicos. Los ácidos inorgánicos de los que pueden proceder las sales incluyen, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico y ácido fosfórico. Los ácidos orgánicos de los que pueden proceder las sales incluyen, por ejemplo, ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido maleico, ácido malónico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico y ácido salicílico. Se pueden formar sales de adición de bases farmacéuticamente aceptables con bases inorgánicas y orgánicas. Las bases inorgánicas de las que pueden proceder las sales incluyen, por ejemplo, sodio, potasio, litio, amonio, calcio, magnesio, hierro, cinc, cobre, manganeso y aluminio; se prefieren en particular las sales de amonio, potasio, sodio, calcio y magnesio. Las bases

orgánicas de las que pueden proceder las sales incluyen, por ejemplo, aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas incluyendo aminas sustituidas naturales, aminas cíclicas y resinas de intercambio iónico básicas, específicamente tales como isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina y etanolamina.

5 La expresión "solvato" se refiere a un compuesto (por ejemplo, un compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo) en asociación física con una o más moléculas de un disolvente farmacéuticamente aceptable. Se entenderá que se desea que las expresiones tales como "un compuesto de Fórmula I o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo" incluya el compuesto de Fórmula I, una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto, un solvato del compuesto y un solvato de una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto.

Alquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo "sustituido" se refiere respectivamente a alquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo en el que uno o más (hasta 5, preferiblemente hasta 3) átomos de hidrógeno son reemplazados por un sustituyente seleccionado independientemente del grupo: acilo, alquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, fluoroalquilo), alcoxi opcionalmente sustituido, alquilenodioxo (por ejemplo, metilendioxo), amino opcionalmente sustituido (por ejemplo, alquilamino y dialquilamino), amidino opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, fenilo), aralquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, bencilo), ariloxi opcionalmente sustituido (por ejemplo, fenoxi), aralcoxi opcionalmente sustituido (por ejemplo, benciloxi), carboxi (-COOH), aciloxi (-OOCR), alcoxycarbonilo (es decir, ésteres o -COOR), aminocarbonilo, benciloxicarbonilamino (CBZ-amino), ciano, carbonilo, halógeno, hidroxilo, heteroarilo opcionalmente sustituido, heteroaralquilo opcionalmente sustituido, heteroariloxi opcionalmente sustituido, heteroaralcoxi opcionalmente sustituido, nitro, sulfanilo, sulfinilo, sulfonilo y tio.

La expresión "sulfanilo" se refiere a los grupos: -S-(alquilo opcionalmente sustituido), -S-(arilo opcionalmente sustituido), -S-(heteroarilo opcionalmente sustituido) y -S-(heterociclilo opcionalmente sustituido).

25 La expresión "sulfinilo" se refiere a los grupos: -S(O)-H, -S(O)-(alquilo opcionalmente sustituido), -S(O)-(amino opcionalmente sustituido), -S(O)-(arilo opcionalmente sustituido), -S(O)-(heteroarilo opcionalmente sustituido) y -S(O)-(heterociclilo opcionalmente sustituido).

30 La expresión "sulfonilo" se refiere a los grupos: -S(O₂)-H, -S(O₂)-(alquilo opcionalmente sustituido), -S(O₂)-(amino opcionalmente sustituido), -S(O₂)-(arilo opcionalmente sustituido), -S(O₂)-(heteroarilo opcionalmente sustituido), -S(O₂)-(heterociclilo opcionalmente sustituido), -S(O₂)-(alcoxi opcionalmente sustituido), -S(O₂)-ariloxi opcionalmente sustituido, -S(O₂)-(heteroariloxi opcionalmente sustituido) y -S(O₂)-(heterocicloxio opcionalmente sustituido).

35 La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad de un compuesto de Fórmula I que es suficiente para efectuar el tratamiento como se define más adelante cuando se administra a un mamífero con necesidad de tal tratamiento. La cantidad terapéuticamente eficaz variará dependiendo del individuo y la afección que se esté tratando, el peso y la edad del individuo, la importancia de la afección, el compuesto particular de Fórmula I elegido, la pauta posológica a seguir, frecuencia de administración, la manera de administración y similares, todos los cuales se pueden determinar fácilmente por un experto en la materia.

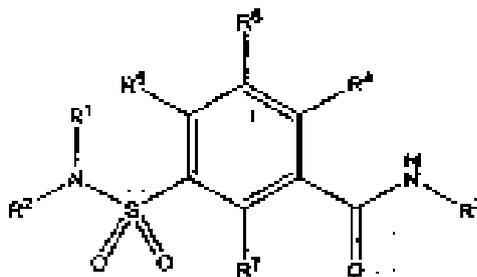
La expresión "tratamiento" o "tratar" significa cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, incluyendo:

- 45 a) evitar la enfermedad, es decir, hacer que no se desarrollen los síntomas clínicos de la enfermedad;
- b) inhibir la enfermedad, es decir, retardar o detener el desarrollo de síntomas clínicos y/o
- c) aliviar la enfermedad, es decir, causando la regresión de los síntomas clínicos

50 Compuestos de la presente invención

La presente invención se dirige a los compuestos que son moduladores selectivos del sarcómero cardíaco (por ejemplo, por estimulación o potenciación de otro modo de la actividad de la miosina cardíaca), como se representa por la Fórmula I: Los compuestos de Fórmula I son útiles como agentes activos para uso en procedimientos de tratamiento y en la fabricación de las formulaciones farmacéuticas de la invención y como intermedios en la síntesis de tales agentes activos.

NOMENCLATURA



Fórmula I

5 en la que:

R³ es un grupo fenilo, isoxazolilo, oxazolilo, piridinilo, pirazinilo; pirimidinilo, tetrazol-5-ilo, tiazolilo, tiadiazolilo o imidazolilo, que está opcionalmente sustituido con un halógeno, alcoxi inferior, un grupo arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido;

10

R⁴ es halógeno;

R⁵ es hidrógeno, halógeno, hidroxilo o alquilo inferior opcionalmente sustituido y

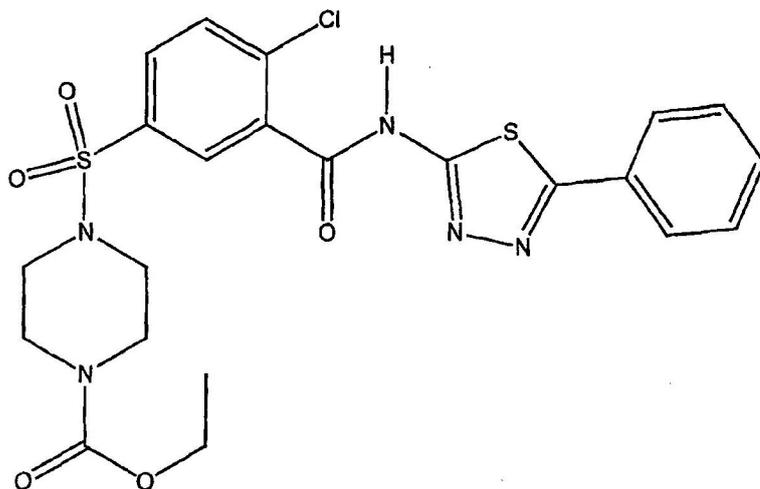
15

R⁶ y R⁷ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en: hidrógeno, halógeno, hidroxilo y alquilo inferior opcionalmente sustituido;

20

Incluyendo simples estereoisómeros, mezclas de estereoisómeros y las sales farmacéuticamente aceptables, solvatos y solvatos de sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, en los que alquilo inferior se refiere a grupos alquilo de 1 a 5 átomos de carbono y alcoxi inferior se refiere a grupos alcoxi que contienen uno a cuatro carbonos.

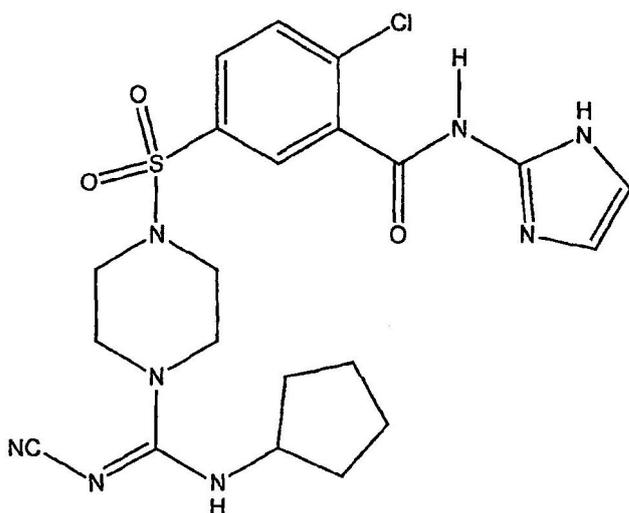
Los compuestos de Fórmula I se pueden nombrar y numerar (por ejemplo, usando la versión 2.2 AutoNom) como se describe a continuación. Por ejemplo, el compuesto:



25

es decir, el compuesto según la Fórmula I en la que R¹ y R² junto con el nitrógeno al que están unidos forman un anillo de piperazina sustituido; R³ es un anillo de tiadiazol sustituido; R⁴ es cloro y R⁵, R⁶ y R⁷ son hidrógeno se puede nombrar éster etílico del ácido 4-[4-cloro-3-(5-fenil-[1,3,4]tiadiazol-2-ilcarbamoyl)-bencenosulfonil]-piperazin-1-carboxílico. Asimismo, el compuesto:

30



es decir, el compuesto según la Fórmula I en la que R¹ y R² junto con el nitrógeno al que están unidos forman un anillo de piperazina sustituido; R³ es un anillo de imidazol; R⁴ es cloro y R⁵, R⁶ y R⁷ son hidrógeno se puede nombrar 2-cloro-5-[4-(N-ciclopentil-N'-ciano-carbamimidoyl)-piperazin-1-sulfonyl]-N-(1H-imidazol-2-il)-benzamida.

5

Síntesis de los compuestos de fórmula 1

Los compuestos de la invención se pueden sintetizar utilizando técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, como se ilustra a continuación con referencia a los Esquemas de Reacción.

10

Parámetros de reacción sintéticos

A menos que se especifique lo contrario, las reacciones descritas en la presente memoria tienen lugar a presión atmosférica, generalmente dentro de un intervalo de temperatura de -10°C a 110°C. Además, excepto como se emplea en los Ejemplos o como se especifique de otro modo, se desea que los tiempos de reacción y las condiciones sean aproximadas, por ejemplo, teniendo lugar a aproximadamente presión atmosférica dentro de un intervalo de temperatura de -10°C a 110°C durante un periodo de 1 a 24 horas; se dejan desarrollar las reacciones de promedio durante la noche un periodo de 16 horas.

15

Los términos "disolvente", "disolvente orgánico" o "disolvente inerte" significan cada uno un disolvente inerte en las condiciones de la reacción que se está describiendo con ellos [incluyendo, por ejemplo, benceno, tolueno, acetonitrilo, tetrahidrofurano ("THF"), dimetilformamida ("DMF"), cloroformo, cloruro de metileno (o diclorometano), dietil éter, metanol y piridina. A menos que se especifique lo contrario, los disolventes usados en las reacciones de la presente invención son disolventes orgánicos inertes.

20

25

El aislamiento y la purificación de los compuestos e intermedios descritos en la presente invención se pueden realizar, si se desea, por cualquier procedimiento de separación o purificación adecuado tal como, por ejemplo, filtración, extracción, cristalización, cromatografía en columna, cromatografía de capa fina o cromatografía de capa gruesa o una combinación de estos procedimientos. Ilustraciones específicas de procedimientos de separación y aislamiento adecuados se pueden tener como referencia a los ejemplos a continuación. Sin embargo, también se pueden usar, por supuesto, otros procedimientos de separación y aislamiento equivalentes.

30

Cuando se desea, los isómeros (R)- y (S) se pueden resolver por procedimientos conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo por formación de sales diastereómeras o complejos que se pueden separar, por ejemplo, por cristalización; por formación de derivados diastereómeros que se pueden separar, por ejemplo, por cristalización, cromatografía gas-líquido o líquida; reacción selectiva de un enantiómero con un reactivo específico de enantiómeros, por ejemplo oxidación o reducción enzimática, seguida de separación de los enantiómeros modificados y no modificados o cromatografía gas-líquido o líquida en un entorno quiral, por ejemplo en un soporte quiral, tal como sílice con un ligando quiral unido o en presencia de un disolvente quiral. Por ejemplo, se puede disolver un compuesto de Fórmula I en un alcohol inferior y ponerlo en una columna Chiralpak AD (205 x 20 mm) (Chiral Technologies, Inc.) acondicionada durante 60 min en EtOAc al 70% en Hexano. Se apreciará que en el caso de que se convierta el enantiómero deseado en otra entidad química por uno de los procedimientos de separación descritos anteriormente, se puede requerir una etapa más para liberar la forma enantiomérica deseada. Alternativamente, se puede sintetizar un enantiómero específico por síntesis asimétrica usando reactivos ópticamente activos, sustratos, catalizadores o disolventes o convirtiendo un enantiómero en otro por transformación asimétrica.

35

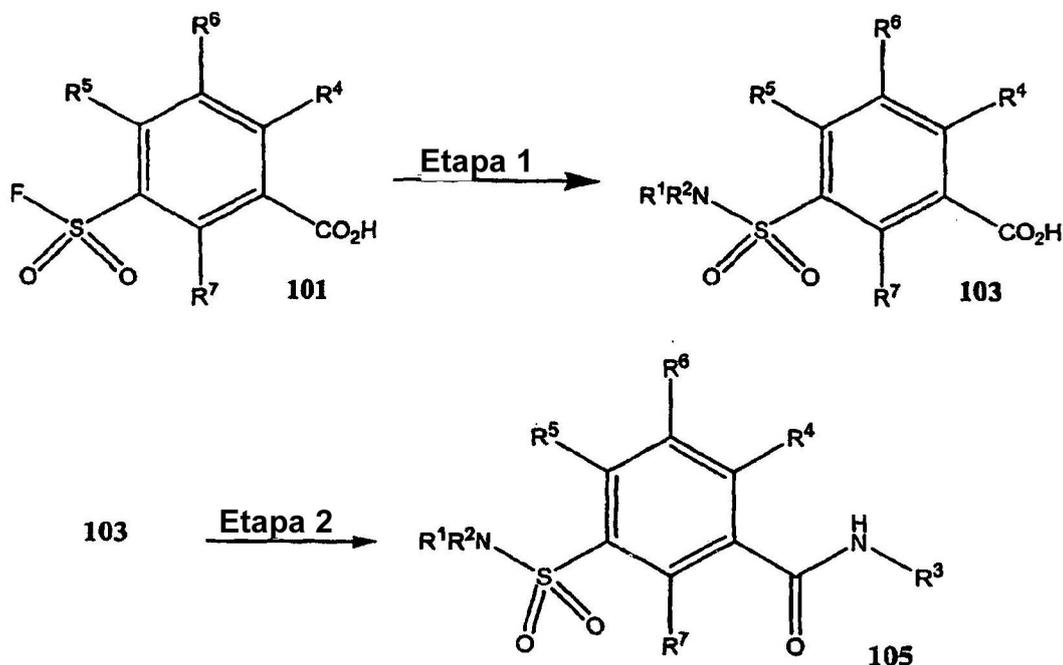
40

45

Materiales de partida

Los ácidos benzoicos opcionalmente sustituidos de Fórmula 101 están comercialmente disponibles, por ejemplo, de Acros Organic o Aldrich Chemical Company, Milwaukee, WI, o se pueden preparar fácilmente por los expertos en la materia usando metodología sintética empleada comúnmente. Un experto en la materia apreciará que los compuestos comercialmente disponibles pueden carecer de un grupo PG protector de carboxilo. Otros reactivos están asimismo comercialmente disponibles o se pueden preparar fácilmente por los expertos en la materia usando metodología sintética comúnmente empleada.

ESQUEMA DE REACCIÓN 1

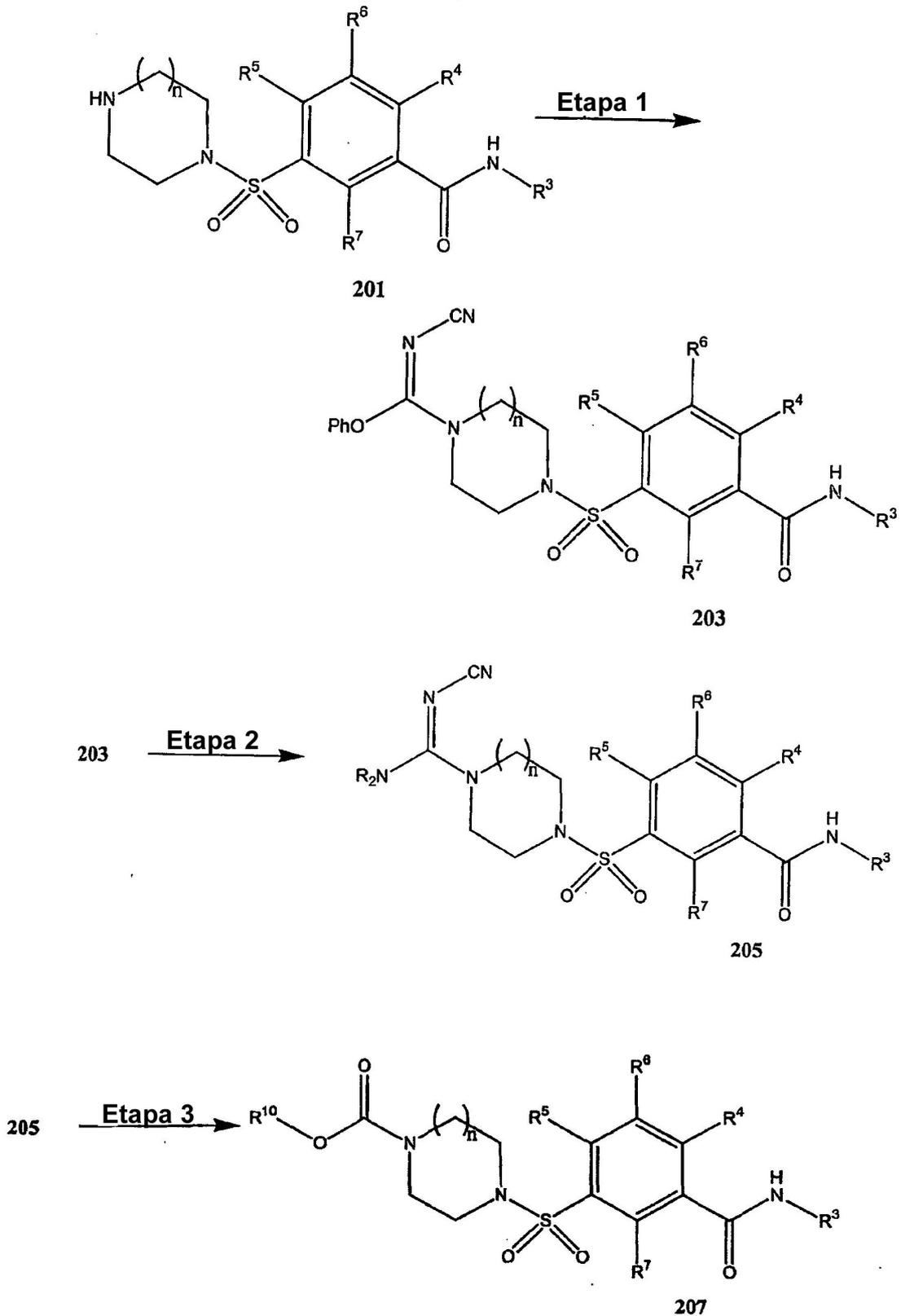
**Preparación de Compuestos de Fórmula 103**

Con referencia al Esquema de Reacción 1, Etapa 1, se pone un compuesto de Fórmula 101 en un vial. El vial se descarga con nitrógeno y se mantiene una presión positiva. Se añade un disolvente no polar, anhidro, tal como diclorometano, seguido por un exceso (preferiblemente aproximadamente 1,2 equivalentes) de un compuesto de fórmula R^1R^2NH y una base tal como etildisopropilamina. Se agita la mezcla durante aproximadamente 1,5 horas tiempo después del cual se añade una alícuota adicional (preferiblemente aproximadamente 0,8 equivalentes) de la amina de fórmula R^1R^2NH . Después de aproximadamente 14 horas se analiza la mezcla HPLC-MS de fase inversa en modo ionización negativa. Si hay el material de partida fluoruro de sulfonilo, se añade una cantidad (preferiblemente aproximadamente 0,35 equivalentes) de la amina de fórmula R^1R^2NH y etildisopropilamina y se agita la mezcla durante aproximadamente 4 horas. Esto se puede repetir de nuevo cuando sea necesario. El producto resultante, se puede recuperar un compuesto de Fórmula 103, por procedimientos convencionales, tales como cromatografía, filtración, evaporación y cristalización o, alternativamente, usar en la siguiente etapa sin purificación y/o aislamiento. Se debería observar que la adición de exceso de amina nucleófila en el comienzo de la reacción puede dar como resultado una adición bis significativa, dando sulfonamida y carboxamida producto. La adición poco a poco de amina nucleófila cuando sea necesario suprime la formación de este producto secundario.

Preparación de Compuestos de Fórmula 105

Con referencia al Esquema de Reacción 1, Etapa 2, un compuesto de Fórmula 103 se pone en un vial junto con un exceso (preferiblemente aproximadamente 1,2 equivalentes) de un compuesto de Fórmula R^3NH_2 , un exceso (preferiblemente aproximadamente 1,5 equivalentes) de HBTU y un exceso (preferiblemente aproximadamente 1,5 equivalentes) de hidrato de HOBt. El vial se lava con nitrógeno y se mantiene una presión positiva. Se añade un disolvente anhidro, tal como dimetilformamida, seguido por una base tal como etildisopropilamina y se agita la mezcla durante aproximadamente 14 horas. El producto resultante, un compuesto de Fórmula 105, se puede recuperar por procedimientos convencionales, tales como cromatografía, filtración, evaporación y cristalización o, alternativamente, se puede usar en la siguiente etapa sin purificación y/o aislamiento.

ESQUEMA DE REACCIÓN 2



5 Preparación de Compuestos de Fórmula 203

Con referencia al Esquema de Reacción 2, Etapa 1, se añade un exceso (preferiblemente aproximadamente 10 equivalentes) de difenilcianocarbonimidato a un compuesto de Fórmula 201 en la que n es 1 ó 2. Se tapa el vial, se lava con nitrógeno y se mantiene una presión positiva. Se añade un disolvente anhidro tal como THF, seguido por

una base tal como etildiisopropilamina. Se agita la mezcla durante aproximadamente una hora. El producto resultante, un compuesto de Fórmula 203, se puede recuperar por procedimientos convencionales, tal como cromatografía, filtración, evaporación y cristalización o, alternativamente, se puede usar en la siguiente etapa sin purificación y/o aislamiento.

5

Preparación de Compuestos de Fórmula 205

Con referencia al Esquema de Reacción 2, Etapa 2, se pone un compuesto de Fórmula 203 en un vial. El vial se lava con nitrógeno y se mantiene una presión positiva. Se añade un disolvente inerte anhidro tal como THF seguido por un exceso (especialmente aproximadamente cinco equivalentes) de una amina de fórmula $R^{10}NH_2$ en la que R^{10} es alquilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, aralquilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido o heteroaralquilo opcionalmente sustituido. Se agita la mezcla hasta que se completa la reacción. El producto resultante, un compuesto de Fórmula 205, se puede recuperar por procedimientos convencionales, tal como cromatografía, filtración, evaporación y cristalización o, alternativamente, se puede usar en la siguiente etapa sin purificación y/o aislamiento.

10

15

Se pueden identificar compuestos preparados por los procesos ya descritos de la invención, por ejemplo, por presencia de una cantidad detectable de uno o más de los materiales o reactivos de partida. Aunque se sabe que los productos farmacéuticos deben satisfacer los estándares de la farmacopea antes de la homologación y/o comercialización y que los reactivos sintéticos (tales como las diversas aminas o alcoholes sustituidos) y los precursores no deberían exceder los límites prescritos por los estándares de la farmacopea, los compuestos finales preparados por un procedimiento de la presente invención pueden tener cantidades minoritarias, pero detectables, de tales materiales presentes, por ejemplo a niveles en el intervalo de pureza del 95% sin impureza sola mayor que el 1%. Estos niveles se pueden detectar, por ejemplo, por espectroscopía de emisión. Es importante controlar la pureza de compuestos farmacéuticos por la presencia de tales materiales, presencia que se describe adicionalmente como un procedimiento de detectar el uso de un procedimiento sintético de la invención.

20

25

Procedimientos particulares y etapas últimas

Se pone una mezcla racémica de isómeros de un compuesto de Fórmula I en una columna cromatográfica y se separa en enantiómeros (R) y (S).

30

Se pone en contacto un compuesto de Fórmula I con un ácido farmacéuticamente aceptable para formar la correspondiente sal de adición de ácido.

35

Se pone en contacto una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable de Fórmula I con una base para formar la correspondiente base libre de Fórmula I.

40

Compuestos particulares

Se proporcionan para los compuestos, formulaciones farmacéuticas y usos de la presente invención y para los procedimientos de fabricación descritos en la presente memoria las siguientes combinaciones y permutaciones de grupos sustituyentes de Fórmula I. Realizaciones particulares de la invención incluyen o emplean los compuestos de Fórmula I con las siguientes combinaciones y permutaciones de grupos sustituyentes. Se presentan como soporte de las reivindicaciones adjuntas para respaldar otras combinaciones y permutaciones de grupos sustituyentes, que por brevedad no se han reivindicado específicamente, pero se debería apreciar que se incluyen en las explicaciones de la presente descripción.

45

50

R^1 y R^2

Cuando se hace referencia a los compuestos de Fórmula I, R^1 , R^2 y el nitrógeno al que están unidos forman un anillo heterocíclico de 5, 6 ó 7 miembros opcionalmente sustituido. En una realización más particular, R^1 , R^2 y el nitrógeno al que están unidos forman un piperidin-1-ilo; piperazin-1-ilo; morfolin-4-ilo; pirrolidin-1-ilo; tiomorfolin-4-ilo o diazepam-1-ilo, que opcionalmente está sustituido con uno, dos o tres de los grupos siguientes: alquilo opcionalmente sustituido, halógeno, hidroxilo, alcoxi, alquilenodioxi (por ejemplo, metilenodioxi), carboxi (-COOH), aciloxi opcionalmente sustituido (RCOO-), alcoxycarbonil- opcionalmente sustituido (-COOR), aminocarbonilo opcionalmente sustituido, ciano, acilo opcionalmente sustituido, oxo, nitro, amino opcionalmente sustituido, suffanilo, sulfonilo, sulfonilo, aminosulfonilo opcionalmente sustituido, amidino, fenilo, bencilo, heteroarilo, heterociclilo, heterociclilo sustituido, ariloxi, aralcoxi, heteroariloxi y heteroaralcoxi.

60

Cuando R^1 , R^2 y el nitrógeno al que están unidos forman un anillo de diazepam-1-ilo opcionalmente sustituido, en una realización particular, el nitrógeno del diazepam se sustituye además con acilo opcionalmente sustituido, alcoxycarbonilo opcionalmente sustituido o aminosulfonilo opcionalmente sustituido.

Cuando R^1 , R^2 y el nitrógeno al que están unidos forman un anillo de piperazin-1-ilo opcionalmente sustituido, en una realización particular, el nitrógeno de la piperazina está sustituido además con hidrógeno, un acilo

65

opcionalmente sustituido, alcoxicarbonilo opcionalmente sustituido, aminosulfonilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, alquilo opcionalmente sustituido o sulfonilo opcionalmente sustituido.

5 Cuando R¹, R² y el nitrógeno al que están unidos forman un anillo de piperidin-1-ilo opcionalmente sustituido, en una realización particular, el anillo de piperidina está sustituido además con hidrógeno, alcoxicarbonilo opcionalmente sustituido, aminocarbonilo opcionalmente sustituido, amino opcionalmente sustituido, hidroxilo, alcoxi opcionalmente sustituido o alquilenodioxo.

10 Cuando R¹, R² y el nitrógeno al que están unidos forman un anillo de pirrolidin-1-ilo opcionalmente sustituido, en una realización particular, el anillo de pirrolidina está sustituido además con amino opcionalmente sustituido.

R³

15 Cuando se hace referencia a compuestos de Fórmula I, R³ es fenilo, isoxazolilo, oxazolilo, piridinilo, pirazinilo, pirimidinilo, tetrazol-5-ilo, tiazolilo, tiadiazolilo o imidazolilo, que está opcionalmente sustituido con un halógeno, alcoxi inferior, un grupo arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido.

20 En una realización particular, R³ es fenilo que está opcionalmente sustituido con halógeno (especialmente flúor) o alcoxi inferior (especialmente metoxi). En otra realización particular, R³ es un grupo heteroarilo como se describe en la reivindicación 1, que está opcionalmente sustituido con un grupo arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido. Aún más en particular, R³ es [1,3,4]tiadiazol-2-ilo que está opcionalmente sustituido con un grupo fenilo opcionalmente sustituido o R³ es 1H-imidazol-2-ilo. En una realización más particular, R³ es oxazol-2-ilo, 5-fenil-[1,3,4]tiadiazol-2-ilo o 1H-imidazol-2-ilo.

25 R⁴

Cuando se hace referencia a compuestos de Fórmula I, en una realización particular, R⁴ es halógeno. Más en particular, R⁴ es cloro.

30 R⁶, R⁵ y R⁷

35 Cuando se hace referencia a compuestos de Fórmula I, en una realización particular, R⁵ es hidrógeno, halógeno, hidroxilo o alquilo inferior opcionalmente sustituido y R⁶ y R⁷ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, hidroxilo y alquilo inferior opcionalmente sustituido. En otra realización, R⁶, R⁶ y R⁷ son hidrógeno.

Subgénero Particular

40 Cuando se consideran los compuestos de Fórmula I, en una realización particular, R⁶, R⁶ y R⁷ son hidrógeno.

En otra realización particular, R⁴ es cloro y R⁵, R⁶ y R⁷ son hidrógeno.

45 En otra realización particular, R³ es [1,3,4]tiadiazol-2-ilo que está opcionalmente sustituido con un grupo fenilo opcionalmente sustituido o R³ es un grupo 1H-imidazol-2-ilo; R⁴ es un halógeno y R⁶, R⁶ y R⁷ son hidrógeno.

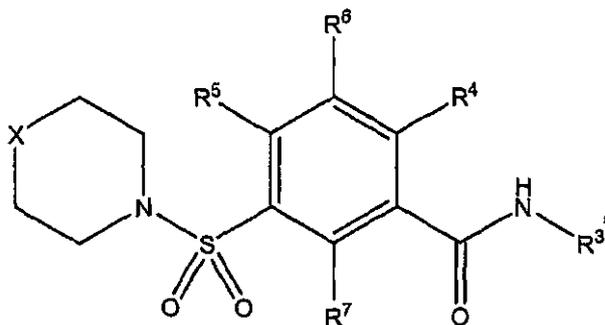
En otra realización particular, R³ es [1,3,4]tiadiazol-2-ilo que está opcionalmente sustituido con un grupo fenilo opcionalmente sustituido o R³ es un grupo 1H-imidazol-2-ilo; R⁴ es cloro y R⁵, R⁶ y R⁷ son hidrógeno.

50 En otra realización particular, R³ es 5-fenil-[1,3,4]tiadiazol-2-ilo o 1H-imidazol-2-ilo; R⁴ es halógeno y R⁵, R⁶ y R⁷ son hidrógeno.

En otra realización particular, R³ es 5-fenil-[1,3,4]tiadiazol-2-ilo o 1H-imidazol-2-ilo; R⁴ es cloro y R⁵, R⁶ y R⁷ son hidrógeno.

55

Compuestos particulares incluyen



X	R ⁸	R ⁹	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	R ⁷
CHR ⁹ NR ⁸	t-Butoxicarbonil-	H	1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H
CHR ⁹ NR ⁸	Acetil-	H	1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H
CHR ⁹ NR ⁸	i-Propoxicarbonil-	H	1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H
CHR ⁹ NR ⁸	Metoxicarbonil-	H	1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H
CHR ⁹ NR ⁸	3-Metilbutanoil-	H	1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H
CHR ⁹ NR ⁸	Isobutiril-	H	1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H
CHR ⁹ NR ⁸	Ciclopropilacetil-	H	1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H
CHR ⁹ NR ⁸	Dimetilaminosulfonil-	H	1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H
CHR ⁹ NR ⁸	sec-Butoxi-carbonil-	H	1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H
CHR ⁹ R ⁸	Propanoil-	H	1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H
CHR ⁹ NR ⁸	Ciclohexiloxicarbonil-	H	1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H
CHR ⁹ NR ⁸	Acetil-	H	5-Fenil-[1,3,4]tiadiazol-2-ilo	Cl	H	H	H
CR ⁹ R ⁸	Hidrógeno	H	5-Fenil-[1,3,4]tiadiazol-2-ilo	Cl	H	H	H
CR ⁹ R ⁸	Hidrógeno	H	5-Fenil-[1,3,4]tiadiazol-2-ilo	Cl	H	H	H
CR ⁹ R ⁸	Metoxicarbonil-	H	5-Fenil-[1,3,4]tiadiazol-2-ilo	Cl	H	H	H
CR ⁹ R ⁸	Hidrógeno	H	1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H
CR ⁹ R ⁸	Carbamoil-	H	1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H
CR ⁹ R ⁸	Metoxicarbonil-	H	1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H
CR ⁹ R ⁸	N-(t-butoxicarbonil)-N-metilamino-	H	1 H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H
CR ⁹ R ⁸	Acetamido-	H	1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H
CR ⁹ R ⁸	N-acetil-N-metilamino-	H	1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H
CR ⁹ R ⁸	Metilaminocarbonil-	H	1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H
CR ⁹ R ⁸	Etoxicarbonil-	H	1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H
CR ⁹ R ⁸	OH	H	1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H
CR ⁹ R ⁸	N-(t-butoxicarbonil)amino-	H	5-Fenil-[1,3,4]tiadiazol-2-ilo	Cl	H	H	H
CR ⁹ R ⁸	Metoxicarbonil-	H	5-Fenil-[1,3,4]tiadiazol-2-ilo	Cl	H	H	H
CR ⁹ R ⁸	Carbamoil-	H	5-Fenil-[1,3,4]tiadiazol-2-ilo	Cl	H	H	H
CR ⁹ R ⁸	Hidroxi-	H	5-Fenil-[1,3,4]tiadiazol-2-ilo	Cl	H	H	H
CR ⁹ R ⁸	Etilenodioxi-		5-Fenil-[1,3,4]tiadiazol-2-ilo	Cl	H	H	H
CR ⁹ R ⁸	Etilenodioxi-		1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H
CR ⁹ R ⁸	Etilenodioxi-		5-Fenil-[1,3,4]tiadiazol-2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	Etoxicarbonil-	-	5-Fenil-[1,3,4]tiadiazol-2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	Acetil-	-	5-Fenil-[1,3,4]tiadiazol-2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	Metoxicarbonil-	-	5-Fenil-[1,3,4]tiadiazol-2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	Metoxiacetil-	-	5-Fenil-[1,3,4]tiadiazol-2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	3-Metilbutanoil-	-	5-Fenil-[1,3,4]tiadiazol-2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	Propoxicarbonil-	-	5-Fenil-[1,3,4]tiadiazol-2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	i-Propoxicarbonil-	-	5-Fenil-[1,3,4]tiadiazol-2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	Dimetilaminocarbonil-	-	5-Fenil-[9,3,4]tiadiazol-2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	Propoxicarbonil-	-	1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	sec-Butoxicarbonil- (especialmente el isómero R)		1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	2-Ciclopentilacetil-	-	1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	2-Ciclohexilacetil-	-	1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	Etoxicarbonil-	-	5-Fenil-[1,3,4]tiadiazol-2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	Metoxiacetil-	-	5-Fenil-[1,3,4]tiadiazol-2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	Acetil-	-	5-Fenil-[1,3,4]tiadiazol-2-ilo	Cl	H	H	H

(cont.)

X	R ⁸	R ⁹	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	R ⁷
NR ⁸	Metil-	-	5-Fenil-[1,3,4]tiadiazol-2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	Etoxicarbonil-	-	Fluorofenil-	F	H	H	H
NR ⁸	Piridinil-	-	Metoxifenil-	F	H	H	H
NR ⁸	Metil-	-	5-Fenil-[1,3,4]tiadiazol-2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	Butiril-	-	5-Fenil-[1,3,4]tiadiazol-2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	Etilcarbamoil-	-	5-Fenil-[1,3,4]tiadiazol-2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	Etoxicarbonil-	-	1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	Etoxicarbonil-	-	Isoxazol-3-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	Butil-	-	5-Fenil-[1,3,4]tiadiazol-2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	Formil-	-	5-Fenil-[1,3,4]tiadiazol-2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	Isobutiril-	-	5-Fenil-[1,3,4]tiadiazol-2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	2,3-Dihidroxiopropionil-	-	5-Fenil-[1,3,4]tiadiazol-2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	(1-hidroxiopropan-2-ilo) carbonil-	-	5-Fenil-[1,3,4]tiadiazol-2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	Etoxicarbonil-	-	Oxazol-2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	Etoxicarbonil-	-	2H-tetrazol-5-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	t-Butoxicarbonil-	-	1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	Acetil-	-	1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	Etoxicarbonil-	-	4-Metil-1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	i-Propoxicarbonil-	-	1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	Metoxicarbonil-	-	1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	Butiril-	-	1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	Dimetilaminocarbonil-	-	1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	Metoxiacetil-	-	1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	2-Metilpropan-1-oxicarbonil-	-	1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	3-Metilbutiril-	-	1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	2,2-Dimetilpropan-1-oxicarbonil-	-	1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	Isobutiril-	-	1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	Etilsulfonil-	-	1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	Butoxicarbonil-	-	1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	Ciclohexiloxicarbonil-	-	1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	Ciclopentiloxicarbonil-	-	1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	Formil-	-	1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	sec-butoxicarbonil-(especialmente el isómero S)		1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	Piperidin-1-ilocarbonil-	-	1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	pirrolidin-1-ilocarbonil -	-	1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	4-metilpiperazin-1-ilocarbonil-	-	1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	Dietilaminocarbonil-	-	1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	Etilaminocarbonil-	-	1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	Ciclohexillocarbonil-	-	1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	2-(tetrahidro-2H-piran-4-il) acetil-	-	1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	2-(1-(terc-butoxicarbonil) piperidin-4-il)acetil-	-	1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	2-(piperidin-4-il)acetil-	-	1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	Pentanoil-	-	1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	Ciclopropilacetil-	-	1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	Propanoil-	-	1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	3,3-dimetilbutanoil-	-	1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	Ciclopentillocarbonil-	-	1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	t-butoxicarbonil-	-	4,5-Dihidro-5-oxo-1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	Ciclopropilcarbonil-	-	1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	Etoxiacetil-	-	1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	Benciloxiacetil-	-	1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	tetrahidrofurano-2-ilocarbonil-	-	1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	Dimetilaminosulfonil-	-	1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H

(cont.)

X	R ⁸	R ⁹	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	R ⁷
NR ⁸	N-(t-butoxicarbonil) aminosulfonil-	-	1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	Aminosulfonil-	-	1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	t-butoxicarbonil-	-	Pirazin-2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	t-butoxicarbonil-	-	Piridinil-	Cl	H	H	H
NR ⁸	t-butoxicarbonil-	-	Metil-piridinil-	Cl	H	H	H
NR ⁸	t-butoxicarbonil-	-	Isoxazol-3-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	Metoxicarbonil-	-	1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	Acetil-	-	Piridinilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	Metoxicarbonil-	-	Piridinilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	t-butoxicarbonil-	-	5-Fenil-[1,3,4]tiadiazol-2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸ CH ₂	2-ciclohexiloacetil-	-	1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸ CH ₂	sec-butoxicarbonil-(especialmente el isómero S)	-	1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸ CH ₂	Etoxicarbonil-	-	5-Fenil-[1,3,4]tiadiazol-2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸ CH ₂	Isobutiril-	-	5-Fenil-[1,3,4]tiadiazol-2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸ CH ₂	Metoxicarbonil-	-	5-Fenil-[1,3,4]tiadiazol-2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸ CH ₂	Isobutiril-	-	5-Fenil-[1,3,4]tiadiazol-2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸ CH ₂	Formil-	-	5-Fenil-[1,3,4]tiadiazol-2-ilo	Cl	H	H	H
O	-	-	5-Fenil-[1,3,4]tiadiazol-2-ilo	Cl	H	H	H
O	-	-	5-Fenil-[1,3,4]tiadiazol-2-ilo	Cl	H	H	H
O	-	-	1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H
O	-	-	Tiazol-2-ilo	Cl	H	H	H
O	-	-	Tiazol-2-ilo	Cl	H	H	H
O	-	-	5-Fenil-[1,3,4]tiadiazol-2-ilo	Cl	H	H	H
O	-	-	5-(p-Cloro-fenil)-[1,3,4]tiadiazol-2-ilo	Cl	H	H	H
O	-	-	5-Fenil-[1,3,4]tiadiazol-2-ilo	F	H	H	H
O	-	-	1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H
O	-	-	5-fenil-1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H
O	-	-	5-fenilpirimidin-2-ilo	Cl	H	H	H
S	-	-	1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H

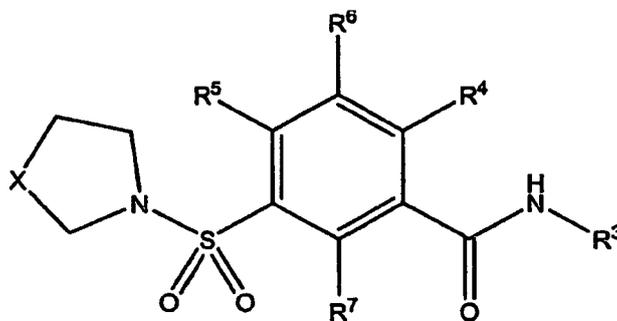
Ejemplos Comparativos

5

10

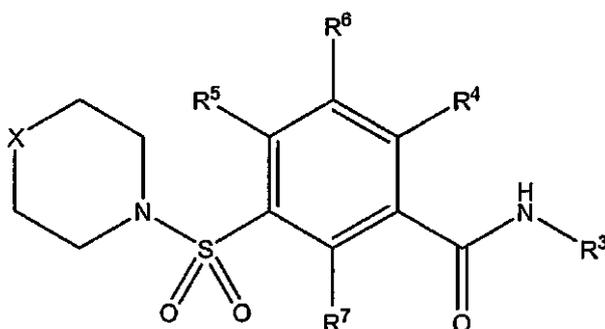
15

20



X	R ⁸	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	R ⁷
CHR ⁸	N-metil-N-acetil-amino-	1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H
CHR ⁸	N-(t-butoxicarbonil)-N-metilamino-	1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H
CHR ⁸	Hidrógeno	1H-imidazol-2-ilo	Cl	H	H	H
CHR ⁸	N-(Dimetilaminocarbonil)-N-metilamino-	5-Fenil-[1,3,4]tiadiazol -2-ilo	Cl	H	H	H
CHR ⁸	N-(3-metilbutiril)-N-metilamino-	5-Fenil-[1,3,4]tiadiazol -2-ilo	Cl	H	H	H
CHR ⁸	N-(Propoxicarbonil)-N-metilamino-	5-Fenil-[1,3,4]tiadiazol -2-ilo	Cl	H	H	H
CHR ⁸	N-(i-propoxicarbonil)-N-metilamino-	5-Fenil-[1,3,4]tiadiazol -2-ilo	Cl	H	H	H
CHR ⁸	N-butiril-N-metilamino-	5-Fenil-[1,3,4]tiadiazol -2-ilo	Cl	H	H	H
CHR ⁸	N-(etoxicarbonil)-N-metilamino-	5-Fenil-[1,3,4]tiadiazol -2-ilo	Cl	H	H	H
CHR ⁸	N-(Etoxicarbonil)amino-	5-Fenil-[1,3,4]tiadiazol -2-ilo	Cl	H	H	H
CHR ⁸	N-(isopropoxicarbonil)amino-	5-Fenil-[1,3,4]tiadiazol -2-ilo	Cl	H	H	H
CHR ⁸	N-(metoxicarbonil)amino-	5-Fenil-[1,3,4]tiadiazol -2-ilo	Cl	H	H	H

Más en particular, compuestos de la invención incluyen



5

X	R ⁸	R ⁹	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	R ⁷
CHR ⁸	Metoxicarbonil-	H	5-Fenil-[1,3,4]tiadiazol -2-ilo	Cl	H	H	H
CR ⁹ R ⁸	Metilenodioxi-		5-Fenil-[1,3,4]tiadiazol-2-ilo	Cl	H	H	H
CR ⁹ R ⁸	Etilenodioxi-		5-Fenil-[1,3,4]tiadiazol -2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	Etoxicarbonil-	-	5-Fenil-[1,3,4]tiadiazol -2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	Acetil-	-	5-Fenil-[1,3,4]tiadiazol -2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	Metoxicarbonil-	-	5-Fenil-[1,3,4]tiadiazol -2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	Metoxiacetil-	-	5-Fenil-[1,3,4]tiadiazol -2-ilo	Cl	H	H	H
MR ⁸	3-Metilbutanoil-	-	5-Fenil-[1,3,4]tiadiazol -2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	Propoxicarbonil-	-	5-Fenil-[1,3,4]tiadiazol -2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	/-Propoxicarbonil-	-	5-Fenil-[1,3,4]tiadiazol -2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	Dimetilaminocarbonil-	-	5-Fenil-[1,3,4]tiadiazol -2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	Propoxicarbonil-	-	1H-imidazol-2ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	sec-Butoxicarbonil- (especialmente el isómero R)	-	1H-imidazol-2ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	2-Ciclopentiloacetil-	-	1H-imidazol-2ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	2-Ciclohexiloacetil-	-	1H-imidazol-2ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	Butiril-	-	5-Fenil-[1,3,4]tiadiazol -2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	Etoxicarbonil-	-H	5-Fenil-[1,3,4]tiadiazol -2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	Metoxiacetil-	-	5-Fenil-[1,3,4]tiadiazol -2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	Acetil-	-	5-Fenil-[1,3,4]tiadiazol -2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸	Metil-	-	5-Fenil-[1,3,4]tiadiazol -2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸ CH ₂	Acetil-	-	5-Fenil-[1,3,4]tiadiazol -2-ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸ CH ₂	2-Ciclohexiloacetil-	-	1H-imidazol-2ilo	Cl	H	H	H
NR ⁸ CH ₂	sec-Butoxicarbonil- (especialmente el isómero S)	-	1H-imidazol-2ilo	Cl	H	H	H
O	-	-	5-Fenil-[1,3,4]tiadiazol -2-ilo	Cl	H	H	H
O	-	-	5-Fenil-[1,3,4]tiadiazol -2-ilo	Cl	H	H	H
O	-	-	1H-imidazol-2ilo	Cl	H	H	H
O	-	-	Tiazol-2-ilo	Cl	H	H	H

UTILIDAD, ENSAYO Y ADMINISTRACIÓN

UTILIDAD

5 Los compuestos de la presente invención son selectivos y modulan el sarcómero cardíaco y son útiles para unirse y/o potenciar la actividad de la miosina cardíaca, aumentando la velocidad a la que la miosina hidroliza el ATP. Como se usa en este contexto, "modular" significa aumentar o disminuir la actividad de la miosina, mientras que "potenciar" significa aumentar la actividad. También se ha determinado en el ensayo de compuestos representativos de la invención, que su administración también puede aumentar la fuerza contráctil en la fibra del músculo cardíaco.

10 Los compuestos, las formulaciones farmacéuticas y los medicamentos de la invención se usan para tratar la enfermedad cardíaca, incluyendo pero no limitándose a: insuficiencia cardíaca congestiva aguda (o descompensada) e insuficiencia cardíaca congestiva crónica; en particular enfermedades asociadas a disfunción cardíaca sistólica. Utilidades terapéuticas adicionales incluyen administración para estabilizar la función cardíaca en pacientes que esperan un trasplante de corazón y ayudar a que un corazón parado o relentizado recupere la función normal después del uso de una bomba bypass.

PRUEBA

20 Se emplea la hidrólisis de ATP por miosina en el sarcómero para producir fuerza. Por lo tanto, un aumento en la hidrólisis del ATP correspondería a un aumento en la fuerza o velocidad de contracción muscular. En presencia de actina, se estimula la actividad de la miosina ATPasa >100 veces. Así, la hidrólisis del ATP no sólo mide la actividad enzimática de la miosina sino también su interacción con el filamento de la actina. Se puede identificar un compuesto que modula el sarcómero cardíaco mediante un aumento o disminución de la velocidad de hidrólisis del ATP por miosina, preferiblemente presentando un aumento de 1,4 veces a concentraciones menores que 10 µM (más preferiblemente, menor que 1 µM). Los ensayos preferidos para tal actividad emplearán miosina de una fuente humana, aunque la miosina de otros organismos también se puede usar. También se prefieren sistemas que modelan el papel regulador del calcio en la unión de miosina.

30 Alternativamente, se puede usar una preparación de sarcómero con funciones bioquímicas para determinar la actividad de la ATPasa *in vitro*, por ejemplo, como se describe en el documento de EE.UU. Número de Serie 09/539.164, presentado el 29 de marzo de 2.000. el comportamiento bioquímico funcional del sarcómero, incluyendo la sensibilidad del calcio de hidrólisis de la ATPasa, se puede reconstituir combinando sus componentes individuales purificados (en particular incluyendo sus componentes reguladores y miosina). Otra preparación funcional es el ensayo de motilidad *in vitro*. Se puede realizar añadiendo compuesto de ensayo a un portaobjetos de unión de miosina y observando la velocidad de desplazamiento de los filamentos de actina sobre la superficie de vidrio cubierta de miosina (Kron SJ. (1.991) Procedimientos Enzymol. 196: 399-416).

40 La velocidad *in vitro* de hidrólisis de ATP se correlaciona con la actividad de potenciación de la miosina, que se puede determinar por control de la producción o de ADP o de fosfato, por ejemplo como se describe en el N° de Serie 09/314.464, presentado el 18 de mayo de 1.999. La producción de ADP también se puede controlar por acoplamiento de la producción de ADP a la oxidación NADH (usando las enzimas piruvato cinasa y lactato deshidrogenasa) y controlando el nivel de NADH o por absorbancia o por fluorescencia (Greengard, P., Nature 178 (Parte 4.534): 632-634 (1.956); Mol Pharmacol enero de 1.970; 6(1): 31-40). La producción de fosfato se puede controlar usando purina nucleósido fosforilasa para acoplar la producción de fosfato a la escisión de un análogo de purina, que da como resultado o un cambio en la absorbancia (Proc Natl Acad Sci U S A junio de 1.992 1; 89(11): 4.884-7) o en la fluorescencia (Biochem J 1 de marzo de 1.990; 266 (2): 611-4). Aunque se puede emplear una sola medida, se prefiere tomar múltiples medidas de la misma muestra en momentos diferentes para determinar la velocidad absoluta de la actividad proteínica; tales medidas presentan especificidad superior en particular en presencia de compuestos de ensayo que presentan similares propiedades de absorbancia o fluorescencia que los de la lectura de salida enzimática.

50 Los compuestos de ensayo se pueden ensayar de un modo muy paralelo usando placas de múltiples pocillos poniendo los compuestos o individualmente en los pocillos o ensayándolos en mezclas. Se pueden añadir entonces a los pocillos componentes de ensayo incluyendo el complejo de proteína diana, que acoplen enzimas y sustratos, y ATP y se puede medir la absorbancia o la fluorescencia de cada pocillo de la placa con un lector de placas.

60 Un procedimiento de preferencia usa un formato de placa de 384 pocillos y un volumen de reacción de 25 µl. Un sistema enzimático acoplado a piruvato cinasa/lactato deshidrogenasa (Huang TG y Hackney DD. (1.994) J Biol Chem 269 (23):16.493-16.501) se usa para medir la velocidad de hidrólisis de ATP en cada pocillo. Como apreciarán los expertos en la materia, los componentes de ensayo se añaden en tampones y reactivos. Puesto que los procedimientos descritos en líneas generales en la presente memoria permiten mediciones cinéticas, se optimizan periodos de incubación para dar las señales de detección adecuadas sobre el fondo. El ensayo se hace en tiempo real dando las cinéticas de la hidrólisis de ATP, que aumenta la relación señal a ruido del ensayo.

65

Se puede medir la modulación de la fuerza contráctil de la fibra del músculo cardíaco usando fibras cardíacas permeabilizadas a detergente (también referidas como fibras cardíacas desnudas), por ejemplo, como se describe por Haikala H, et al (1.995) J Cardiovasc Pharmacol 25 (5): 794-801. Las fibras cardíacas desnudas retienen su organización sarcomérica intrínseca, pero no retienen todos los aspectos del ciclo del calcio celular, este modelo ofrece dos ventajas: primera, la membrana celular no es una barrera para la penetración del compuesto y segunda, se controla la concentración de calcio. Por lo tanto, cualquier aumento en la fuerza contráctil es una medida directa del efecto del compuesto de ensayo sobre las proteínas sarcoméricas. Las medidas de tensión se realizan montando un extremo de la fibra muscular en un destino estacionario y el otro extremo en un transductor que pueda medir la fuerza. Después de estirar la fibra para retirar la parte floja, el transductor de fuerza registra la tensión aumentada a medida que la fibra empieza a contraerse. Esta medida se denomina la tensión isométrica, puesto que no se permite que la fibra se acorte. La activación de la fibra muscular permeabilizada se realiza poniéndola en una disolución de calcio tamponada, seguido por adición de compuesto de ensayo o control. Cuando se ensaya de esta manera, los compuestos de la invención produjeron un aumento en la fuerza a concentraciones de calcio asociadas a la actividad contráctil fisiológica pero muy poco aumento de la fuerza en tampón de relajación a concentraciones de calcio bajas o en ausencia de calcio (el punto de los datos de EGTA).

La selectividad por el sarcómero cardíaco y miosina cardíaca se puede determinar por sustitución de componentes de sarcómero no cardíaco y miosina en uno o más ensayos ya descritos y comparando los resultados obtenidos frente a los obtenidos usando los equivalentes cardíacos.

La capacidad de un compuesto para aumentar la velocidad de ATPasa observada en un ensayo de sarcómero reconstituido *in vitro* podía dar como resultado la velocidad de recambio aumentada de miosina-S1 o, alternativamente, la sensibilidad aumentada de un filamento de actina decorado a activación Ca^{++} . Para distinguir entre estos dos posibles modos de acción, se mide inicialmente el efecto del compuesto sobre la actividad de ATPasa de S1 con filamentos de actina no decorados. Si se observa un aumento de la actividad, puede refutarse el efecto del compuesto sobre el aparato regulador responsable de Ca. Se puede emplear un segundo ensayo más sensible para identificar compuestos cuyo efecto activador sobre la miosina-S1 mejora en presencia de una actina decorada (comparado con filamentos de actina pura). En este segundo ensayo se comparan las actividades de S1 cardíaca y S1 esquelético sobre filamentos de actina regulados cardíacos y esqueléticos (en las 4 permutaciones). Un compuesto que muestra su efecto sobre S1 cardíaco/actina cardíaca y S1 cardíaco/actina esquelética, pero no sobre los sistemas S1 esquelético/actina esquelética y S1 esquelético/actina cardíaca, se puede clasificar confidencialmente como activador de S1 cardíaco.

La evaluación inicial de actividad *in vitro* se puede determinar en modelos celulares de contractilidad de miocitos, por ejemplo, como se describe por Popping S, et al ((1.996) Am. J. Physiol. 271: H357-H364) y Wolska BM, et al ((1.996) Am. J. Physiol. 39: H24-H32). Una ventaja del modelo de los miocitos es que los sistemas componentes que dan como resultado cambios en la contractilidad se pueden aislar y determinar el principal sitio o los principales sitios de acción. Se pueden evaluar entonces compuestos con actividad celular (por ejemplo, seleccionando compuestos con el siguiente perfil: aumento > 120% en acortamiento fraccional sobre el basal a 2 μM , cambios limitados en longitud diastólica (cambio < 5%) y sin disminución significativa en las velocidades de contracción o relajación) en modelos de órganos completos, tales como el modelo de Corazón Aislado (Langendorff) de función cardíaca, *in vivo* usando ecocardiografía o medidas hemodinámicas invasivas y en modelos de insuficiencia cardíaca basados en animales, tales como el modelo de Oclusión de la Arteria Coronaria Izquierda de Rata. Por último, se demuestra la actividad para tratar la enfermedad cardíaca en ensayos clínicos humanos, de control de placebo, ciegos.

Administración

Los compuestos de Fórmula I se administran a una dosis terapéuticamente eficaz, por ejemplo, una dosis suficiente para proporcionar tratamiento para las enfermedades descritas previamente. Aunque los niveles de dosis humanos aún se tienen que optimizar para los compuestos de la invención, en general, una dosis diaria de 0,05 a 100 mg/kg de peso corporal, preferiblemente 0,10 a 10,0 mg/kg de peso corporal, y lo más preferiblemente 0,15 a 1,0 mg/kg de peso corporal. Así, para administración a una persona de 70 kg, el intervalo de administración sería 3,5 a 7.000 mg al día, preferiblemente 7,0 a 700,0 mg al día, y lo más preferiblemente 10,0 a 100,0 mg al día. La cantidad de compuesto activo administrada dependerá, por supuesto, del individuo y la enfermedad que se esté tratando, la importancia de la afección, la manera y la pauta de administración y el criterio del médico; por ejemplo, un probable intervalo de administración para administración oral sería 70 a 700 mg al día, mientras que para administración intravenosa un probable intervalo de administración sería 700 a 7.000 mg al día, seleccionándose los agentes activos para periodos de semidescomposición más largos o más cortos, respectivamente.

La administración de los compuestos de la invención o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos puede ser por cualquiera de los modos de administración aceptados para agentes que sirven para utilidades similares incluyendo, pero no limitándose a, vía oral, vía subcutánea, vía intravenosa, vía intranasal, vía tópica, vía transdérmica, vía intraperitoneal, vía intramuscular, vía intrapulmonar, vía vaginal, vía rectal o vía intraocular. La administración oral y parenteral son las acostumbradas en el tratamiento de enfermedades que son el objeto de la presente invención.

Las composiciones farmacéuticamente aceptables incluyen formas farmacéuticas sólidas, semisólidas, líquidas y en aerosol, tales como, por ejemplo, comprimidos, cápsulas, polvos, líquidos, suspensiones, supositorios, aerosoles o similares. Los compuestos también se pueden administrar en formas farmacéuticas de liberación sostenida o controlada, incluyendo inyecciones de medicamento de liberación lenta, bombas osmóticas, píldoras, parches transdérmicos (incluyendo electrotransporte), y similares, para administración pulsada, prolongada y/o sincronizada a una velocidad predeterminada. Preferiblemente, las composiciones se proporcionan en formas farmacéuticas unitarias adecuadas para una sola administración de una dosis precisa.

Los compuestos se pueden administrar o solos o más típicamente junto con un portador o excipiente farmacéutico convencional (por ejemplo, manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, croscarmelosa sódica, glucosa, gelatina, sacarosa y carbonato de magnesio). Si se desea, la composición farmacéutica también puede contener cantidades minoritarias de sustancias auxiliares no tóxicas tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes solubilizantes y agentes de tamponamiento del pH (por ejemplo, acetato de sodio, citrato de sodio, derivados de ciclodextrina, monolaurato de sorbitán, acetato de trietanolamina y oleato de trietanolamina). En general, dependiendo del modo de administración deseado la formulación farmacéutica contendrá 0,005% a 95%, preferiblemente 0,5% a 50% en peso de un compuesto de la invención. Los procedimientos en la actualidad para preparar tales formas farmacéuticas son conocidos o serán evidentes para los expertos en esta materia; por ejemplo, véase Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pensilvania.

Además, los compuestos de la invención se pueden administrar de manera conjunta y las composiciones farmacéuticas pueden incluir, otros agentes medicinales, agentes farmacéuticos, adyuvantes y similares. Agentes activos adicionales adecuados incluyen, por ejemplo: tratamientos que retardan el progreso de la insuficiencia cardíaca por estimulación neurohormonal de regulación desmejorada del corazón e intentos para evitar la remodelación cardíaca (por ejemplo, inhibidores ACE o bloqueantes β); tratamientos que mejoran la función cardíaca estimulando la contractilidad cardíaca (por ejemplo, agentes inotrópicos positivos, tales como la dobutamina agonista β -adrenérgica o la milrinona inhibidora de fosfodiesterasa) y tratamientos que reducen la precarga cardíaca (por ejemplo, diuréticos, tales como furosemida).

En una realización preferida, las composiciones tomarán la forma de una píldora o comprimido y así la composición contendrá junto con el ingrediente activo, un diluyente tal como lactosa, sacarosa o fosfato de dicalcio; un lubricante tal como estearato de magnesio y un aglutinante tal como almidón, goma de acacia, polivinilpirrolidina, gelatina, celulosa o derivados de celulosa. En otra forma farmacéutica sólida, un polvo, maruma, disolución o (por ejemplo, en carbonato de propileno, aceites vegetales o triglicéridos) está encapsulado en una cápsula de gelatina.

Se pueden preparar, por ejemplo, composiciones farmacéuticamente administrables líquidas por disolución, dispersión, etc., de un compuesto activo como se definió anteriormente y adyuvantes farmacéuticos opcionales en un portador (por ejemplo, agua, disolución salina, dextrosa acuosa, glicerol, glicoles o etanol) para formar una disolución o suspensión. Se pueden preparar inyectables en formas convencionales, o como disoluciones líquidas o suspensiones, como emulsiones, o en formas sólidas adecuadas para disolución o suspensión en líquido previamente a inyección. El porcentaje de compuesto activo contenido en tales composiciones parenterales depende mucho de la naturaleza específica de los mismos, así como de la actividad del compuesto y las necesidades del individuo. Sin embargo, se pueden emplear porcentajes de ingrediente activo de 0,01% a 10% en disolución y serán mayores si la composición es un sólido que se diluirá con posterioridad a los porcentajes anteriores. Preferiblemente la composición comprenderá 0,2-2% del agente activo en disolución.

También se pueden administrar formulaciones del compuesto activo o una sal a las vías respiratorias como aerosol o disolución para un nebulizador o como un polvo microfino para insuflación, solo o junto con un portador inerte tal como lactosa. En tal caso, las partículas de la formulación tienen diámetros menores que 50 micrómetros, preferiblemente menores que 10 micrómetros.

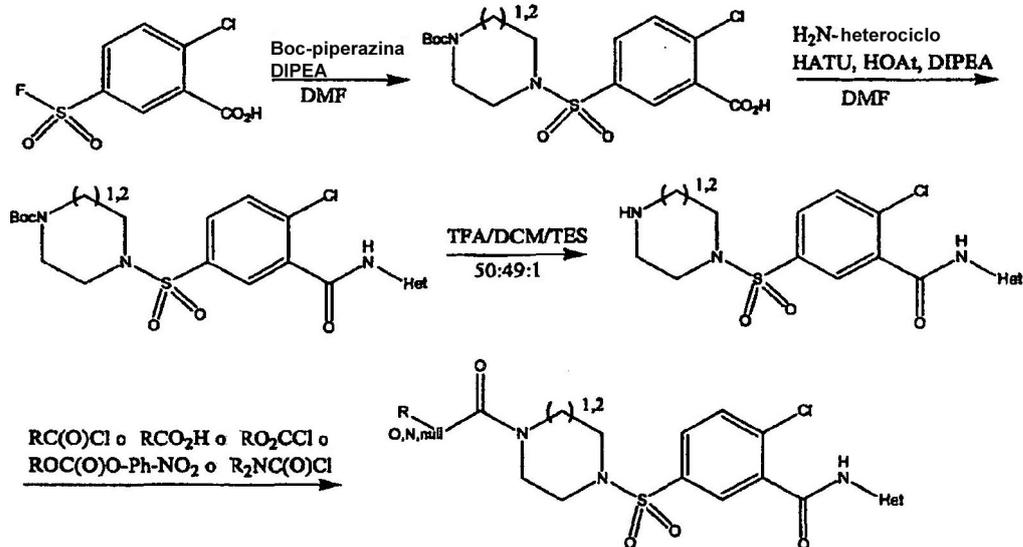
USO EN SELECCIÓN

En general, emplear los compuestos de la invención en un procedimiento de investigación para unión de miosina, la miosina se une a un soporte y se añade un compuesto de la invención al ensayo. Alternativamente, el compuesto de la invención se puede unir al soporte y la miosina añadida. Clases de compuestos entre los cuales se pueden buscar agentes de unión nuevos incluyen anticuerpos específicos, agentes de unión no naturales identificados en investigaciones de bibliotecas químicas, análogos de péptidos, etc. Son de particular interés ensayos de investigación para agentes candidatos que presentan una baja toxicidad para células humanas. Se puede usar una amplia variedad de ensayos para este fin, incluyendo ensayos de unión proteína-proteína in vitro marcada, ensayos de desplazamiento de movilidad electroforética, inmunoensayos para unión de proteínas y ensayos funcionales (ensayos de fosforilación, etc.). Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 6.495.337.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos sirven para describir más completamente la manera de usar la invención ya descrita, así como explicar los mejores modos considerados para llevar a cabo diversos aspectos de la invención. Se entiende que estos ejemplos de ninguna manera sirven para limitar el verdadero alcance de esta invención, sino más bien se presentan con fines ilustrativos.

Ejemplos 1



10

Preparación de éster etílico del ácido 4-(3-carboxi-4-cloro-bencenosulfonyl)-piperazin-1-carboxílico

Se puso en un vial ácido 2-cloro-5-fluorosulfonylbenzoico (Acros Organics, 105 mg, 440 μ mol, 1,0 eq) y se descargó el vial con nitrógeno y se mantuvo una presión positiva. Se añadió diclorometano anhidro (1,4 ml), seguido por carboxilato de etil-1-piperazina (80 μ l, 528 μ mol, 1,2 eq) y etildiisopropilamina (redistilada, 80 μ l, 440 μ mol, 1,0 eq). Se agitó la mezcla durante 1,5 h tiempo después del cual se añadió piperazina adicional (60 μ l, 352 μ mol, 0,8 eq). Después de 14 h se analizó la mezcla por HPLC-MS de fase inversa en modo de ionización negativo. El material de partida fluoruro de sulfonyl estaba presente, así como un compuesto menos polar que muestra ión (M-1) en relación aproximadamente 35:65. Se añadieron 0,35 eq adicionales de piperazina y etildiisopropilamina a cada uno (154 μ mol, 30 μ l) y se agitó la mezcla durante 4 h. HPLC-MS en este momento indicó poco progreso y se añadieron unos 0,25 eq de piperazina adicionales (100 μ mol, 20 μ l). Después de agitar durante 14 h HPLC-MS indicó que la reacción era completa. Se diluyó la mezcla de reacción con 2 ml de acetato de etilo, se lavó con disolución de HCl 1 M (2 x 1 ml) y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. Se filtró la disolución, se retiraron los disolventes en un evaporador rotatorio y bomba de vacío para proporcionar 134 mg de un sólido blanco, 81%. NOTA: La adición de exceso de amina nucleofílica al comienzo de la reacción da como resultado una adición bis significativa, dando sulfonamida y carboxamida producto. La adición etapa por etapa de amina nucleofílica cuando es necesario suprime la formación de este producto secundario.

Preparación de éster etílico del ácido 4-[4-cloro-3-(5-fenil-[1,3,4]tiadiazol-2-ilcarbamoil)-bencenosulfonyl]-piperazin-1-carboxílico

Se puso en un vial el éster piperazinético del ácido benzoico de antes (131 mg, 348 μ mol, 1,0 eq) junto con sulfato de 2-amino-5-fenil-1,3,4-tiadiazol (115 mg, 417 μ mol, 1,2 eq), HBTU (Advanced Chem Tech, 198 mg, 521 μ mol, 1,5 eq) y HOBt hidratado (80 mg, 521 μ mol, 1,5 eq). Se descargó el vial con nitrógeno y se mantuvo una presión positiva. Se añadió dimetilformamida anhidra (1,7 ml), seguido por etildiisopropilamina (redistilada, 120 μ l, 695 μ mol, 2,0 eq) y se agitó la mezcla durante 14 h. El análisis por HPLC-MS de fase inversa en modo positivo indicó que se había consumido el material de partida ácido y se reemplazó con un compuesto mucho menos polar que mostraba el (M+1) deseado. Se diluyó la mezcla de reacción con 4 ml de agua, se recogió el precipitado resultante por filtración y se lavó con lo siguiente: agua x 2, disolución de HCl 1 M x 2, disolución saturada de bicarbonato de sodio x 2, agua x 2 y hexanos x 1 y se secó bajo succión. Se obtuvieron 119 mg de un sólido blanco ligeramente oscurecido, 64% de rendimiento.

40

Ejemplo 2**Preparación de éster terc-butílico del ácido 4-(3-carboxi-4-cloro-bencenosulfonil)-piperazin-1-carboxílico**

5 Preparado como para el compuesto anterior con las siguientes modificaciones: después de la adición de 2,0 eq
 10 totales de 1-piperazincarboxilato de terc-butilo el día 1, el análisis HPLC-MS mostró que la reacción sólo estaba 1/3
 completada. Se añadieron unos 1,4 eq adicionales de piperazina y se agitó la reacción durante 24 h. Después de
 este tiempo se encontró que la reacción estaba completada y se realizó el tratamiento final como para el caso del
 etilo. En vez de lavar con disolución de HCl 1 M se usó disolución de hidrogenosulfato de potasio 0,3 M y se añadió
 también un lavado con disolución de cloruro de sodio saturado previamente a secado y concentración. Se obtuvo un
 rendimiento cuantitativo del producto deseado.

Preparación de éster terc-butílico del ácido 4-[4-cloro-3-(1H-imidazol-2-ilcarbamoil)-bencenosulfonil]-piperazin-1-carboxílico

15 Se puso el éster piperazinterc-butílico del ácido benzoico de antes (1,57 g, 3,88 mmol, 1,0 eq) en un matraz de fondo
 redondo de 100 ml junto con sulfato de 2-aminoimidazol (Aldrich, 615 mg, 4,65 mmol, 1,2 eq), HATU (PE
 Biosystems, 2,21 g, 5,82 mmol, 1,5 eq) y HOAt (Avocado, 792 mg, 5,82 mmol, 1,5 eq). Se tapó el matraz con un
 septo, se descargó con nitrógeno y se mantuvo una presión positiva. Se añadió dimetilformamida anhidra (17 ml),
 20 seguido por etildiisopropilamina (redestilada, 1,4 ml, 7,76 mmol, 2,0 eq) y se agitó la mezcla durante 14 h. El análisis
 por HPLC-MS de fase inversa en modo positivo indicó que se había consumido el material de partida ácido y se
 reemplazó con un compuesto mucho menos polar que mostró los (M+1) deseados. Se diluyó la mezcla de reacción
 con 80 ml de agua, se recogió el precipitado resultante por filtración y se lavó con lo siguiente: agua x 3, hexanos x 2
 y se secó bajo succión para proporcionar 1,46 g de un sólido blanco ligeramente oscurecido. Se purificó el material
 25 bruto (columna súbita de gel de sílice, 5,1 cm x 15 cm) eluyendo con EtOAc-hexanos-trietilamina (89:10:1 v/v)
 después EtOAc para proporcionar 896 mg de sólido blanco ligeramente oscurecido, 49% de rendimiento. TLC
 EtOAc-trietilamina (99:1 v/v) R_r=0,27.

Preparación de 2-cloro-5-[4-(2-ciclohexil-acetil)-piperazin-1-sulfonil]-N-(1 H-imidazol-2-il)-benzamida

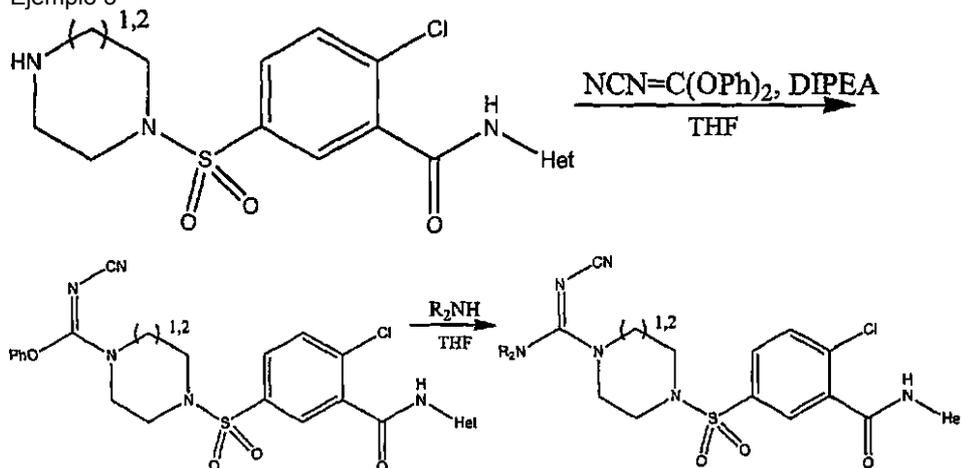
30 El compuesto Boc-piperazinimidazol de antes (109 mg, 232 µmol, 1,0 eq) se puso en un vial y se trató con 2,6 ml de
 ácido trifluoroacético/diclorometano/trietilsilano 50:49:1. Después de 15 min se completó la retirada de Boc como se
 evidencia por HPLC-MS de fase inversa y se retiraron los disolventes a vacío. El residuo formó azeótropo 3 x
 cloroformo y se puso a vacío durante 1 h. Se añadió 1-etil-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida HCl (EDC) (Advanced
 35 Chem Tech, 67 mg, 348 µmol, 1,5 eq), HOBt hidratado (57 mg, 371 µmol, 1,6 eq) al vial, se tapó el vial, se descargó
 con nitrógeno y se mantuvo una presión positiva. Se añadió diclorometano anhidro (1,7 ml), seguido por
 etildiisopropilamina (redestilada, 250 µl, 1,39 mmol, 6,0 eq) y ácido ciclohexiloacético (TCI, 40 µl, 278 µmol, 1,2 eq) y
 se agitó la mezcla durante 14 h. El análisis por HPLC-MS de fase inversa en modo positivo indicó que el material de
 40 partida de piperazina se había consumido y se reemplazó con un compuesto mucho menos polar que mostró los
 (M+1) deseados. Se diluyó la mezcla de reacción con 4 ml de EtOAc y se lavó la capa orgánica con 2 ml cada una
 de los siguientes: agua x 3, disolución saturada de bicarbonato de sodio x 1, cloruro de sodio saturado x 1. Se
 secaron los extractos orgánicos sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró para proporcionar 61 mg de
 un sólido blanco ligeramente oscurecido, 78% de rendimiento.

Preparación de éster (R)-sec-butílico del ácido 4-[4-cloro-3-(1H-imidazol-2-ilcarbamoil)-bencenosulfonil]-piperazin-1-carboxílico

45 Uso compuesto Boc-piperazinimidazol de antes (148 mg, 315 µmol, 1,0 eq) en un vial y se trató con 3,6 ml de ácido
 trifluoroacético/diclorometano/trietilsilano 50:49:1 como se describió anteriormente para el compuesto
 50 ciclohexilacetamida. Se añadió al vial éster 4-nitrofenílico y éster sec-butílico de ácido (R)-carbónico, 93% en peso
 (89 mg, 346 µmol, 1,1 eq) y se añadieron 3 mg de DMAP al vial, se tapó el vial, se descargó con nitrógeno y se
 mantuvo una presión positiva. Se añadió DMF anhidro (2,1 ml), seguido por etildiisopropilamina (redestilada, 170 µl,
 945 µmol, 3,0 eq) y se agitó la mezcla durante 14 h a 40°C. El análisis por HPLC-MS de fase inversa en modo
 55 positivo indicó que el material de partida de piperazina no protegida muy polar se había consumido y se reemplazó
 con un compuesto mucho menos polar que mostró los (M+1) deseados, así como una pequeña cantidad de material
 bis-acilado incluso menos polar. Se retiró el calor y se diluyó la mezcla de reacción con 4 ml de disolución de NaOH
 2 N y se agitó durante 10 min. Se extrajo la mezcla con EtOAc (3 x 2 ml) y se lavó la capa orgánica con 2 ml cada
 una de lo siguiente: NaOH 2 N x 5 (hasta que desaparece el color amarillo), agua x 1, disolución al 10% de HOAc x
 1, agua x 1, disolución saturada de bicarbonato de sodio x 1, cloruro de sodio saturado x 1. Se secaron los extractos
 60 orgánicos sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró para proporcionar 121 mg de un sólido blanco
 ligeramente oscurecido, 82% de rendimiento.

Preparación de éster isopropílico del ácido 4-[4-cloro-3-(1H-imidazol-2-ilcarbamoil)-bencenosulfonil]-piperazin-1-carboxílico

Se puso en un vial el compuesto Boc-piperazinimidazol de antes (86 mg, 183 μmol , 1,0 eq) y se trató con 1,8 ml de ácido trifluoroacético/diclorometano/trietilsilano 50:49:1 como se describió anteriormente para el compuesto ciclohexilacetamida. Se añadió al vial DMAP (2 mg), se tapó el vial, se descargó con nitrógeno y se mantuvo una presión positiva. Se añadió DCM anhidro (2,1 ml), seguido por etilidopropilamina (redistilada, 120 μl , 640 μmol , 3,5 eq) y una disolución 1,0 M de clorofornato de isopropilo en tolueno (220 μl , 220 μmol , 1,2 eq) y se agitó la mezcla durante 14 h. El análisis por HPLC-MS de fase inversa en modo positivo indicó que el material de partida de piperazina no protegida muy polar se había consumido y se reemplazó con un compuesto mucho menos polar que mostró los (M+1) deseados. Había precipitado un sólido. Se retiró a vacío el disolvente y se absorbió el sólido en 1 ml de DMF y se volvió a precipitar con 4 ml de agua, se aisló por filtración y se lavó con: agua x 3, hexanos x 2 y se secó bajo succión. Se obtuvo un sólido blanco, 50 mg (60% de rendimiento).

Ejemplo 3**Preparación de éster fenílico del ácido 4-[4-cloro-3-(1H-imidazol-2-ilcarbamoil)-bencenosulfonil]-N-ciano-piperazin-1-carboxílico**

Se trató el compuesto Boc-piperazinimidazol de antes (2,04 g, 4,33 mmol, 1,0 eq) con ácido trifluoroacético/diclorometano/trietilsilano 50:49:1 como se describió anteriormente para el compuesto ciclohexilacetamida. Se trató el residuo con disolución saturada de bicarbonato de sodio hasta pH >8, después se extrajo la disolución con EtOAc y se concentró a vacío para proporcionar 1,6 g de amina libre. Se añadió difenilcianocarbonimidato (1,08 g, 4,54 mmol, 10,5 eq) al matraz y se tapó, se descargó con nitrógeno y se mantuvo una presión positiva. Se añadió THF anhidro (30 ml), seguido por etilidopropilamina (redistilada, 830 μl , 4,76 mmol, 1,1 eq) y se agitó la mezcla durante 1 h. El análisis por HPLC-MS de fase inversa en modo positivo indicó que el material de partida de piperazina no protegida muy polar se había consumido y se reemplazó con un compuesto que mostró los (M+1) deseados. Se retiraron los disolventes a vacío.

Preparación de 2-cloro-5-[4-(N-ciclopentil-N'-ciano-carbamimidoil)-piperazin-1-sulfonil]-N-(1H-imidazol-2-il)-benzamida

El fenilimidato de antes (100 mg, 195 μmol , 1,0 eq) se puso en un vial que se tapó, se descargó con nitrógeno y se mantuvo una presión positiva. Se añadió THF anhidro (5 ml), seguido por ciclopentilamina (100 μl , 973 μmol , 5,0 eq) y se agitó la mezcla durante 48 h después de lo cual se retiró el disolvente a vacío. Se purificó el residuo por HPLC de fase inversa para proporcionar 27 mg de producto, 27% de rendimiento.

Ejemplo 4**Preparación de ácido 2-cloro-5-(4-metil-piperazin-1-sulfonil)-benzoico**

Se puso ácido 2-cloro-5-fluorosulfonilbenzoico (Acros Organics, 195 mg, 813 μmol , 1,0 eq) en un vial y se descargó el vial con nitrógeno y se mantuvo una presión positiva. Se añadió diclorometano anhidro (2,7 ml), seguido por 1-metilpiperazina (110 μl , 976 μmol , 1,2 eq). Se agitó la mezcla durante 2 h tiempo después del cual se añadieron 1,2 eq adicionales. Después de 14 h se analizó la mezcla por HPLC-MS de fase inversa en modo de ionización positiva. Se eliminó el material de partida de fluoruro de sulfonilo menos polar y se reemplazó con un compuesto muy polar con los (M+1) deseados. Se retiraron los disolventes a vacío para proporcionar 407 mg de un sólido amarillo pálido. Por RMN de ¹H el compuesto estaba presente, contaminado con metilpiperazina.

Preparación de éster metílico del ácido 2-cloro-5-(4-metil-piperazin-1-sulfonil)-benzoico

El ácido metilpiperazinbenzoico bruto de antes (259 mg, 813 μmol , 1,0 eq) se disolvió en 4 ml de MeOH al 30% en benceno. Se añadió trimetilsilildiazometano 2,0 M en disolución de hexanos (410 μl , 813 μmol , 1,0 eq) gota a gota. Después de 15 min se analizó la mezcla por HPLC-MS de fase inversa en modo positivo. Había material de partida, así como producto menos polar. Se añadió otro 1,0 eq de compuesto diazometano y se controló la reacción de nuevo después de 15 min. Se añadieron unos 0,2 eq adicionales de diazometano (90 μl , 178 μmol) y después de 15 min se juzgó que la reacción se había completado por HPLC-MS. Se añadieron unas gotas de HOAc glacial hasta que desapareció el color amarillo y se retiraron los disolventes a vacío para proporcionar 491 mg de un vidrio amarillo. Esto se absorbió en 2 ml de disolución saturada de bicarbonato de sodio al 50% (pH > 8) y se extrajo con diclorometano (3 x 1 ml). Se secaron los extractos sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró para proporcionar 224 mg de aceite amarillo, 83%.

Preparación de 2-cloro-5-(4-metil-piperazin-1-sulfonil)-benzoato de litio

Se puso en un vial éster metilpiperazinmetílico de antes (197 mg, 592 μmol , 1,0 eq), se disolvió en 1,5 ml de MeOH y 30 μl de agua. Se añadió LiOH hidratado (26 mg, 622 μmol , 1,05 eq) y se tapó el vial, se descargó con nitrógeno y se mantuvo una presión positiva. Se calentó la mezcla a 60°C durante 4 h tiempo al que se juzgó que estaba completada por HPLC-MS de fase inversa. Se retiraron los disolventes a vacío para proporcionar 197 mg de un sólido blanco.

Preparación de 2-cloro-5-(4-metil-piperazin-1-sulfonil)-N-(5-fenil-[1,3,4]tiadiazol-2-il)-benzamida

Se acopló la sal de ácido de metilpiperazina de antes (93 mg, 286 μmol , 1,0 eq) con sulfato de 2-amino-5-fenil-1,3,4-tiadiazol usando el protocolo HBTU como se describió antes, excepto que se añadió la etildiisopropilamina 1 h después de que se hubiera iniciado la reacción para neutralizar la sal de ácido y se efectuara la disolución. Después de 3 h totales se completó la reacción por análisis HPLC-MS de fase inversa en modo positivo. Se diluyó la mezcla de reacción con 3 ml de agua y se llevó a pH=8 por adición de disolución saturada de bicarbonato. Se recogió el precipitado resultante por filtración y se lavó con lo siguiente: agua x 2 y hexanos x 1. Se aisló el producto como 109 mg de un sólido blanco ligeramente oscurecido, 80% de rendimiento.

Ejemplo 5**Síntesis de Materiales de Partida**

Se sintetizó 2-amino-4-fenilimidazol, un reactivo en la síntesis de compuestos de Fórmula I, a partir del procedimiento de: Little, T. L.; Webber, S. E. "A Simple and Practical Synthesis of 2-Aminoimidazoles" J. Org. Chem. 1.994, 59, 7.299-7.305.

Se sintetizó 2-amino-5-fenilpirimidina de una manera análoga al procedimiento descrito en: Gong, Y.; Pauls, H. W. "A Convenient Synthesis of Heteroarilbenzoic Acids via Suzuki Reaction" Synlett, 2.000, 6, 829-831.

Se preparó 2-aminoxazol a partir del procedimiento de: Cockerill, A. F.; Deacon, A.; Harrison, R. G.; Osborne, D. J.; Prime, D. M.; Ross, W. J.; Todd, A.; Verge, J. P. "An Improved Synthesis of 2-Amino-1,3-Oxazoles Under Basic Conditions" Synthesis, 1.976, 591-593.

Se preparó 2-amino-4-metilimidazol según el procedimiento descrito en: Little, T. L.; Webber, S. E. "A Simple and Practical Synthesis of 2-Aminoimidazoles" J. Org. Chem. 1.994, 59, 7.299-7.305.

Ejemplo 6**Preparación de éster sec-butílico y éster 4-nitro-fenílico del ácido (R)-carbónico**

Se puso en un vial cloroformiato de 4-nitrofenilo (1,91 g, 9,50 mmol, 1,1 eq) y se descargó el vial con nitrógeno y se mantuvo una presión positiva. Se añadió diclorometano anhidro (10 ml), seguido por alcohol (R)-sec-butílico (Acros Organics, 800 μl , 8,63 mmol, 1,0 eq) y piridina anhidra (770 μl , 9,50 mmol, 1,1 eq). Después de 15 h se observó un compuesto no polar por HPLC-MS pero que no se ionizaba ni en modo positivo ni en negativo. Se diluyó la mezcla de reacción con 10 ml de acetato de etilo, se lavó con 7 ml cada una de lo siguiente: disolución de NaOH 0,5 M x 2, agua x 1, disolución 1 M de HCl x 1, agua x 1, cloruro de sodio saturado x 1 y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. Se filtró la disolución, se retiraron los disolventes en un evaporador rotatorio y bomba de vacío para proporcionar 2,11 g de un sólido amarillo pálido. Esto se mostró que contenía 11% en moles de 4-nitrofenol por RMN de ^1H y se juzgó que era 93% puro en peso. El rendimiento total fue por lo tanto 95%.

Ejemplo 7**Ensayos de Identificación Diana**

5 **Ensayos de especificidad:** Se evaluó la especificidad del compuesto hacia miosina cardíaca por comparación del efecto del compuesto en ATPasa estimulada con actina de un panel de isoformas de miosina: músculo cardíaco, esquelético y liso, a una única concentración del compuesto 50 μM .

10 **Ensayos de miofibrillas:** Para evaluar el efecto de compuestos sobre la actividad de la ATPasa de miosina cardíaca de longitud total en el contexto de sarcómero nativo, se realizaron ensayos de miofibrillas desnudas. Se obtuvieron miofibrillas cardíacas de rata por homogeneización de tejido cardíaco de rata en presencia de detergente. Tal tratamiento retira las membranas y la mayoría de las proteínas citoplasmáticas solubles pero deja intacto el aparato acto-miosina sarcomérico cardíaco. Las preparaciones de miofibrillas retienen la capacidad para hidrolizar ATP en un modo controlado por Ca^{++} . Las actividades de la ATPasa de tales preparaciones de miofibrillas en presencia y ausencia de compuestos se ensayan a concentraciones de Ca^{++} que proporcionan 50% y 100% de una velocidad máxima.

Ejemplo 8**Modelo In vitro de Modulación de la ATPasa de Miosina Cardíaca Dependiente de la Dosis**

20 Se midieron las respuestas a la dosis usando un ensayo de ATPasa acoplada de piruvato cinasa y lactato deshidrogenasa, tamponada con calcio, que contenía los siguientes reactivos (las concentraciones expresadas son concentraciones finales de ensayo): PIPES de potasio (12 mM), MgCl_2 (2 mM), ATP (1 mM), DTT (1 mM), BSA (0,1 mg/ml), NADH (0,5 mM), PEP (1,5 mM), piruvato cinasa (4 U/ml), lactato deshidrogenasa (8 U/ml) y antiespumante (90 ppm). Se ajustó el pH a 6,80 a 22°C por adición de hidróxido de potasio. Se controlan los niveles de calcio por un sistema tampón que contiene EGTA 0,6 mM y concentraciones variables de calcio, para conseguir una concentración de calcio libre de 1×10^{-4} M a 1×10^{-8} M.

30 Los componentes proteínicos específicos para este ensayo son subfragmento-1 de miosina cardíaca bovina (típicamente 0,5 μM), actina cardíaca bovina (14 μM), tropomiosina cardíaca bovina (típicamente 3 μM) y troponina cardíaca bovina (típicamente 3-8 μM). Las concentraciones exactas de tropomiosina y troponina se determinaron empíricamente, por valoración para conseguir la diferencia máxima en la actividad de ATPasa en presencia de EGTA 1 mM frente a la medida en presencia de CaCl_2 0,2 mM. La concentración exacta de miosina en el ensayo se determinó también empíricamente, por valoración para conseguir una velocidad de hidrólisis de ATP deseada. Esto varía entre preparaciones proteínicas, debido a variaciones en la fracción de moléculas activas en cada preparación.

40 Las respuestas a la dosis del compuesto se miden típicamente a la concentración de calcio que corresponde a 50% de actividad de ATPasa máxima (pCa_{50}), así que se realiza un experimento preliminar para ensayar la respuesta de la actividad de la ATPasa a concentraciones de calcio libre en el intervalo de 1×10^{-4} M a 1×10^{-8} M. Con posterioridad, se ajustó la mezcla de ensayo al pCa_{50} (típicamente 3×10^{-7} M). Se realizaron ensayos preparando primero una serie de diluciones de compuesto de ensayo, cada una con una mezcla de ensayo que contiene Pipes de potasio, MgCl_2 , BSA, DTT, piruvato cinasa, lactato deshidrogenasa, subfragmento-1 de miosina, antiespumante, EGTA, CaCl_2 y agua. El ensayo se inició por adición de un volumen igual de disolución que contenía Pipes de potasio, MgCl_2 , BSA, DTT, ATP, NADH, PEP, actina, tropomiosina, troponina, antiespumante y agua. Se controló la hidrólisis de ATP por absorbancia a 340 nm. La curva de respuesta a la dosis resultante se ajusta por la ecuación de 4 parámetros y = Fondo + ((Arriba-Fondo)/(1+((EC_{50}/X)^{Hill}))). El $\text{AC}_{1,4}$ se define como la concentración a la que la actividad de la ATPasa es 1,4 veces mayor que el fondo de la curva de dosis.

Ejemplo 9**Ensayos de Miocitos**

55 PREPARACIÓN DE MIOCITOS DE RATA VENTRICULARES CARDÍACOS ADULTOS. Se anestesiaron ratas Sprague-Dawley macho adultas con una mezcla de gas isoflurano y oxígeno. Se extirpó rápidamente el corazón, se enjuagó y se canuló la aorta ascendente. Se inició perfusión regresiva continua en los corazones a una presión de perfusión de 60 cm H_2O . Se perfusionaron primero los corazones con una disolución de Krebs modificada sin Ca^{2+} nominalmente de la siguiente composición: NaCl 110 mM, KCl 2,6 mM, KH_2PO_4 7 H_2O 1,2 mM, MgSO_4 1,2 mM, NaHCO_3 2,1 mM, glucosa 11 mM y Hepes 4 mM (todos Sigma). Este medio no se recirculó y se gasificó continuamente con O_2 . Después de aproximadamente 3 minutos, se perfusionó el corazón con tampón de Krebs modificado enriquecido con colagenasa al 3,3% (169 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de actividad, Clase II, Worthington Biochemical Corp., Freehold, NJ) y concentración final de calcio 25 μM hasta que el corazón llega a estar suficientemente blanqueado y blando. Se retira la cánula del corazón, se desechan las aurículas y los vasos y se cortan en pedazos pequeños los ventrículos. Se dispersan los miocitos por agitación suave del tejido ventricular en colagenasa fresca que contiene Krebs previamente a forzarlos suavemente por una malla de nailon de 200 μm en un tubo de 50 cc. Se volvieron a suspender los miocitos resultantes en disolución de Krebs modificada que contenía calcio 25 μm . se hicieron los

miocitos tolerantes al calcio por adición de una disolución de calcio (patrón 100 mM) a intervalos de 10 minutos hasta que se consiguió 100 μ M. después de 30 minutos se desechó el sobrenadante y se añadieron a las células 30 - 50 ml de tampón Tyrode (NaCl 137 mM, KCl 3,7 mM, MgCl 0,5 mM, glucosa 11 mM, Hepes 4 mM y CaCl₂ 1,2 mM, pH 7,4). Se mantuvieron las células durante 60 min a 37°C previamente a la iniciación de experimentos y se usaron a las 5 h de aislamiento. Sólo se usaron las preparación de células si las células pasaban primero el criterio QC por respuesta a un estándar (>150% de basal) e isoproterenol (ISO; > 250% de basal). Adicionalmente, sólo se usaron células cuya contractilidad basal estaba entre 3 y 8% en los siguientes experimentos.

EXPERIMENTOS DE CONTRACTILIDAD DE MIOCITOS VENTRICULARES ADULTOS. Se pusieron alícuotas de tampón Tyrode que contenían miocitos en cámaras de perfusión (serie 20 RC-27NE; Warner Instruments) completas con plataformas de calentamiento. Se permitió que los miocitos se unieran, se calentaron las cámaras a 37°C y se perfusionaron después las células con tampón Tyrode a 37°C. Se estimularon los miocitos en campo a 1 Hz con electrodos de platino (20% por encima del umbral). Sólo las células presentaban estriaciones claras y eran quiescentes previamente a su paso se usaron para experimentos de contractilidad. Para determinar la contractilidad basal, se formaron imágenes de los miocitos por un objetivo 40x y usando una cámara dispositivo acoplado de carga de frecuencia de imagen variable (60-240 Hz), las imágenes se digitalizaron y se presentaron en una pantalla de ordenador a una velocidad de muestreo de 240 Hz. [Tarjeta capturadora, myopacer, software de adquisición análisis para contractilidad celular están disponibles en IonOptix (Milton, MA).] después de un periodo de contractilidad basal de 5 minutos mínimo, se perfusionaron los compuestos de ensayo (0,01 - 15 μ M) en los miocitos durante 5 minutos. Después de este tiempo, se perfusionó tampón Tyrode fresco para determinar características de eliminación de compuesto. Usando estrategia de detección de bordes, se registraron de manera continua la contractilidad de los miocitos y las velocidades de contracción y relajación.

ANÁLISIS DE CONTRACTILIDAD: Se ensayan tres o más miocitos individuales por compuesto, usando dos o más preparaciones de miocitos diferentes. Para cada célula, se promedian y se comparan veinte o más transitorios de contractilidad en basal (definido como 1 min previo a infusión del compuesto) y después de adición de compuesto. Se analizaron estos transitorios promedio para determinar los cambios en longitud diastólica y se determinaron usando programa de análisis (IonOptix), acortamiento fraccional (% disminución en la longitud diastólica) y velocidades de contracción y relajación máximas (μ m/s). Se combinan los análisis de células individuales. El aumento en el acortamiento fraccional sobre basal indica potenciación de contractilidad de miocitos.

ANÁLISIS DE TRANSITORIOS DE CALCIO. *Carga Fura*: se disolvió Fura-2 permeable a células (Sondas Moleculares) en cantidades iguales de pluronic (Sondas Mol) y FBS durante 10 min a TA. Se hace una disolución patrón de Fura 1 μ M en tampón Tyrode que contenía probenecid 500 mM (Sigma). Para cargar las células, Se añade esta disolución a miocitos a TA. Después de 10 min, se retira el tampón, se lavan las células con probenecid que contenía Tyrode y se incubaron a TA durante 10 min. Este lavado e incubación se repitieron. Se determinaron contractilidad simultánea y medidas de calcio a los 40 min., de carga.

Formación de imágenes: Se perfusionó un compuesto de ensayo en células. Se determinaron contractilidad simultánea y transitorios de calcio en los valores de referencia y después de adición de compuesto. Se formaron imágenes de las células de manera digital y se determinó la contractilidad como se describió antes, usando un filtro rojo en el camino óptico para evitar interferencias con medidas de calcio fluorescentes. Se obtuvieron software y hardware de análisis, de adquisición para análisis de transitorios de calcio de IonOptix. La instrumentación para medición de fluorescencia incluye una lámpara de arco de xenón y una fuente de luz de excitación doble Hiperswitch que alterna entre longitudes de onda de 340 y 380 a 100 Hz por un espejo galvo-conducido. Una guía de luz rellena de líquido suministra la luz de doble excitación al microscopio y se determina la fluorescencia de emisión usando un tubo fotomultiplicador (PMT). Las rutas de interfase del sistema de fluorescencia envían la señal PMT y se registran las relaciones usando el programa de adquisición IonWizard.

Análisis: Para cada célula, se promediaron y se compararon diez o más transitorios de relación contractilidad y calcio en basal y después de la adición de compuesto. Se analizaron transitorios promedio de contractilidad usando el programa de análisis Ionwizard para determinar cambios en la longitud diastólica y acortamiento fraccional (% disminución en la longitud diastólica). Se analizaron los transitorios de relación de calcio promedio usando el programa de análisis Ionwizard para determinar cambios en las relaciones diastólica y sistólica y el tiempo del 75% a los valores de referencia (T_{75}).

DURABILIDAD: Para determinar la durabilidad de respuesta, se estimularon miocitos con un compuesto de ensayo durante 25 minutos seguido por un periodo de eliminación de 2 min. Se compara la respuesta de contractilidad a los 5 y 25 minutos después de infusión de compuesto.

UMBRAL POTENCIAL: Se estimulan miocitos en campo a un voltaje de aproximadamente 20% por encima del umbral. En estos experimentos el voltaje umbral (voltaje mínimo para células pace) se determina empíricamente, las células se someten a pace a ese umbral y después se infundona el compuesto de ensayo. Después de que la actividad del compuesto está estacionaria, se disminuye el voltaje durante 20 segundos y después se restablece. La alteración de os canales de iones corresponde a aumento o disminución de la acción umbral potencial.

FRECUENCIA Hz: Se determina la contractilidad de miocitos a 3 Hz como sigue: un 1 min. momento basal seguido por perfusión del compuesto de ensayo durante 5 min., seguido por una eliminación de 2 min. Después de que se haya recuperado la contractilidad celular completamente a los valores de referencia la frecuencia en Hz se disminuye a 1. Después de un periodo de aclimatación inicial se estimula la célula mediante el mismo compuesto como esta especie, rata, inhibe la frecuencia de la fuerza negativa a 1 Hz, a 3 Hz la FS de la célula debería ser menor, pero la célula aún debería responder mediante aumento de su acortamiento fraccional en presencia del compuesto.

ADITIVO CON ISOPROTERENOL: Para demostrar que un compuesto actúa por un mecanismo diferente que el isoproterenol estimulante adrenérgico, se cargan las células con fura-2 y se determina medición simultánea de contractilidad y relaciones de calcio y una combinación de un compuesto de ensayo e isoproterenol.

Ejemplo 10

Modelo In vitro de Modulación de ATPasa de Miosina Cardíaca Dependiente de la Dosis

Se purifican miosinas cardíacas bovina y de rata de los respectivos tejidos cardíacos. Se purifican las miosinas del músculo esquelético y liso usadas en los estudios de especificidad de músculo esquelético de conejo y molleja de pollo, respectivamente. Se convierten todas las miosinas usadas en los ensayos en una forma soluble de una sola cabeza (S1) por una proteólisis limitada con quimotripsina. Otros componentes sarcoméricos: se purifican complejo de troponina, tropomiosina y actina de corazones bovinos (sarcómero cardíaco) o músculo pectoral de pollo (sarcómero esquelético).

Se controla la actividad de las miosinas por medida de las velocidades de hidrólisis de ATP. La ATPasa de la miosina es activa muy significativamente por filamentos de actina. Se detecta recambio de ATP en un ensayo enzimático acoplado usando piruvato cinasa (PK) y lactato deshidrogenasa (LDH). En este ensayo cada ADP producido como resultado de la hidrólisis de ATP se recicla a ATP por PK con una oxidación simultánea de molécula NADH por LDH. La oxidación de NADH se puede controlar convenientemente por disminución de la absorbancia a longitud de onda de 340 nm.

Se miden respuestas a la dosis usando un ensayo de ATPasa acoplado a piruvato cinasa y lactato deshidrogenasa que contiene los siguientes reactivos (las concentraciones expresadas son concentraciones finales de ensayo): PIPES de potasio (12 mM), $MgCl_2$ (2 mM), ATP (1 mM), DTT (1 mM), BSA (0,1 mg/ml), NADH (0,5 mM), PEP (1,5 mM), piruvato cinasa (4 U/ml), lactato deshidrogenasa (8 U/ml) y antiespumante (90 ppm). Se ajusta el pH a 6,80 a 22°C por adición de hidróxido de potasio. Se controlan los niveles de calcio mediante un sistema tampón que contiene EGTA 0,6 mM y concentraciones variables de calcio, para conseguir una concentración final de calcio de 1×10^{-4} M a 1×10^{-8} M.

Los componentes proteínicos específicos para este ensayo son subfragmento-1 de miosina cardíaca bovina (típicamente 0,5 μ M), actina cardíaca bovina (14 μ M), tropomiosina cardíaca bovina (típicamente 3 μ M) y troponina cardíaca bovina (típicamente 3-8 μ M). Las concentraciones exactas de tropomiosina y troponina se determinan empíricamente, por valoración para conseguir una diferencia máxima en actividad de ATPasa cuando se mide en presencia de EGTA 1 mM frente a la medida en presencia de $CaCl_2$ 0,2 mM. La concentración exacta de miosina se determina también de manera empírica, por valoración para conseguir una velocidad de hidrólisis de ATP deseada. Esto varía entre preparaciones de proteínas, debido a variaciones en la fracción de molécula activas en cada preparación.

Las respuestas a la dosis de compuesto se mide típicamente a la concentración de calcio que corresponde al 50% de actividad máxima de ATPasa (pCa_{50}), de manera que se realiza un experimento preliminar para ensayar la respuesta a la actividad de la ATPasa a concentraciones de calcio libre en el intervalo de 1×10^{-4} M a 1×10^{-8} M. Con posterioridad, se ajusta la mezcla de ensayo al pCa_{50} (típicamente 3×10^{-7} M). Se realizan ensayos por preparación primero de una serie de diluciones de compuesto de ensayo, cada una con una mezcla de ensayo que contiene Pipes de potasio, $MgCl_2$, BSA, DTT, piruvato cinasa, lactato deshidrogenasa, subfragmento-1 de miosina, antiespumante, EGTA, $CaCl_2$ y agua. El ensayo se inicia añadiendo un volumen igual de disolución que contiene Pipes de potasio, $MgCl_2$, BSA, DTT, ATP, NADH, PEP, actina, tropomiosina, troponina, antiespumante y agua. Se controla la hidrólisis de ATP por absorbancia a 340 nm. La curva de respuesta a la dosis resultante se fija por la ecuación de 4 parámetros $y = \text{Fondo} + \frac{(\text{Arriba-Fondo})}{(1 + ((EC50/X)^{Hill}))}$. El $AC_{1,4}$ se define como la concentración a la que la actividad de la ATPasa es 1,4 veces mayor que el fondo de la curva de dosis.

La capacidad de un compuesto para activar la miosina cardíaca se evalúa por el efecto del compuesto sobre la ATPasa estimulada con actina de subfragmento S1. Se decoran los filamentos de actina en el ensayo con troponina y tropomiosina y se ajusta la concentración de Ca^{++} a un valor que daría como resultado un 50% de activación máxima. Se mide la ATPasa S1 en presencia de una serie de diluciones del compuesto. La concentración de compuesto requerida para activación del 40% por encima de la velocidad de ATPasa medida en presencia de control (volumen equivalente de DMSO) se indica como AC_{40} .

Ejemplo 11**Ensayo de Acortamiento Fraccional in Vivo**

- 5 ANIMALES Se usan ratas Sprague Dawley macho de Charles River Laboratories (275 - 350 g) para estudios de eficacia de bolo e infusión. Los animales con insuficiencia cardíaca se describen a continuación. Se enjaulan dos por jaula y tienen acceso a la comida y agua *ad libitum*. Hay un periodo de aclimatación de tres días mínimo previo a los experimentos.
- 10 ECOCARDIOGRAFÍA Se anestesiaron los animales con isoflurano y se mantuvieron dentro de un plan quirúrgico durante todo el procedimiento. Se mantuvo la temperatura del cuerpo del núcleo a 37°C usando una almohadilla de calor. Una vez anestesiados, se rasuran los animales y se aplica eliminador de pelo para retirar todas las trazas de pelaje del área del pecho. El área del pecho se prepara además con ETOH al 70% y se aplica gel de ultrasonidos. Usando un sistema de ultrasonidos GE System Vingmed (General Electric Medical Systems), se pone una sonda de 15 10 MHz en la pared del pecho y se adquieren imágenes en la vista de eje corto al nivel de los músculos papilares, se toman imágenes de modo-M 2-D del ventrículo izquierdo previamente, y después de, inyección o infusión de bolo de compuesto. El acortamiento fraccional *in vivo* ((diámetro diastólico final-diámetro sistólico final)/ diámetro diastólico final x 100) se determina por análisis de las imágenes en modo-M usando el programa informático GE EchoPak.
- 20 EFICACIA DE BOLO E INFUSIÓN Para protocolos de bolo e infusión, se determina acortamiento fraccional usando ecocardiografía como se describió antes. Para protocolos de bolo e infusión, se toman cinco imágenes en Modo-M pre-dosis a intervalos de 30 segundos previamente a la inyección de bolo o infusión de compuestos. Después de inyección, se toman las imágenes de modo-M a 1 min y a intervalos de cinco minutos después hasta 30 min. La inyección de bolo (0,5-5 mg/kg) o infusión es vía un catéter de vena de la cola. Se determinan los parámetros de infusión a partir de perfiles farmacocinéticos de los compuestos. Para infusión, los animales recibieron una dosis de 25 25 carga de 1 minuto seguido inmediatamente por una dosis de infusión de 29 minutos vía un catéter de vena de la cola. La carga de la dosis se calcula determinando la concentración diana x el volumen estacionario de distribución. La concentración de la dosis de mantenimiento se determina tomando la concentración diana x la holgura. Los compuestos se formulan en vehículo cavitron al 25% para protocolos de bolo e infusión. Se toman muestras de 30 30 sangre para determinar la concentración de plasma de los compuestos.

Ejemplo 12**35 Hemodinámica en animales normales y con insuficiencia cardíaca**

- Se anestesiaron los animales con isoflurano, se mantuvieron en un plan quirúrgico y después se rasuraron en preparación para cateterización. Se hizo una incisión en la región del cuello y se despejó y se aisló la arteria carótida derecha. Se canuló un Catéter de Presión de Micropunta French Millar 2 (Millar Instruments, Houston, TX) en la 40 40 arteria carótida derecha y se ensartó pasada la aorta y en el ventrículo izquierdo. Las lecturas de presión diastólica finales, máx. + / - dp/dt, presiones sistólicas y velocidad del corazón se determinan de manera continua mientras el compuesto o vehículo se infunde. Se registran medidas y se analizan usando un PowerLab y el programa informático Chart 4 (ADInstruments, Mountain View, CA). Se realizan medidas hemodinámicas a una concentración de infusión seleccionada. Se toman muestras de sangre para determinar la concentración en plasma de los 45 45 compuestos.

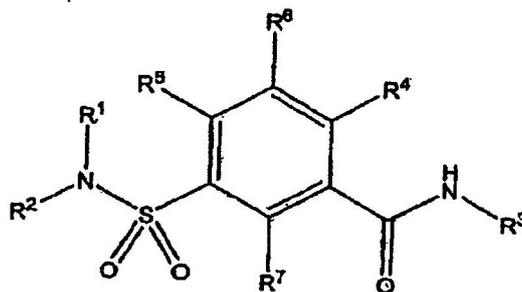
Ejemplo 13**Modelo de Oclusión de Arteria Coronaria Izquierda de Insuficiencia Cardíaca Congestiva**

- 50 ANIMALES Se usaron ratas Sprague-Dawley CD (220-225 g; Charles River) macho en este experimento. Los animales tuvieron acceso libre a agua y dieta para roedores comercial bajo condiciones de laboratorio estándar. Se mantiene la temperatura ambiente a 20-23°C y la iluminación ambiental es en un ciclo luz/oscuridad de 12/12-horas. Se aclimataron los animales al entorno del laboratorio 5 a 7 días previos al estudio. Se mantuvo a los animales en ayunas durante la noche previamente a la cirugía. -
- 60 PROCEDIMIENTO DE OCLUSIÓN Se anestesiaron los animales con ketamina/xilozina (95 mg/kg y 5 mg/kg) y se incubaron con un catéter intravenoso modificado de calibre 14-16. Se comprobó el nivel de anestesia pellizcando el dedo. Se mantuvo la temperatura del cuerpo del núcleo a 37°C usando una atmósfera de calor. Se corta y se 60 60 restriega el área quirúrgica. Se pone al animal en decúbito lateral derecho y se pone uncialmente sobre un ventilador con una presión inspiratoria máxima de 10-15 cm H₂O y velocidad respiratoria de 60-110 respiraciones/min. Se suministró O₂ al 100% a los animales por el ventilador. El sitio quirúrgico se restriega con restregador quirúrgico y alcohol. Se hace una incisión sobre la caja torácica en el espacio intercostal 4°-5°. Se diseccionan los músculos subyacentes con cuidado para evitar la vena torácica lateral, para exponer los músculos intercostales. Se entra en la 65 65 cavidad torácica por el 4°-5° espacio intercostal y se expande la incisión para permitir la visualización del corazón. Se abre el pericardio para exponer el corazón. Se pasa una sutura de seda 6-0 con una aguja cónica alrededor de

- 5 la arteria coronaria izquierda cerca de su origen, que se encuentra en contacto con el margen izquierdo del cono pulmonar a aproximadamente 1 mm de la inserción del apéndice auricular izquierdo. Se ocluye a arteria coronaria izquierda atando la sutura alrededor de la arteria ("LCO"). Los animales Sham son tratados igual, excepto que no se ata la sutura. Se cierra la incisión en tres capas. Se ventila la rata hasta que puede ventilar por sí misma. Se extuban las ratas y se permite que se recuperen en una almohadilla caliente. Los animales reciben buprenorfina (0,01-0,05 mg/kg SQ) para analgesia posoperatoria. Una vez despiertas, se les devuelve a su jaula. Se controlan los animales a diario por señales de infección o tensión. Se someten a eutanasia los animales infectados o moribundos,. Se pesan los animales una vez a la semana.
- 10 ANÁLISIS DE EFICACIA Aproximadamente ocho semanas después de la cirugía de infartación, se escanearon las ratas por signos de infarto de miocardio usando ecocardiografía. Sólo se utilizaron además los animales con acortamiento fraccional disminuido comparado con ratas sham en experimentos de eficacia. En todos los experimentos, hay cuatro grupos, sham + vehículo, sham + compuesto, LCL + vehículo y LCL + compuesto. A las 10
- 15 -12 semanas post LCL, se infusieron las ratas a una concentración de infusión seleccionada. Como antes, se tomaron cinco imágenes de Modo-M pre-dosis a intervalos de 30 segundos previos a la infusión de compuestos y se tomaron imágenes de Modo-M a intervalos de 30 segundos hasta 10 minutos y cada minuto o a intervalos de cinco minutos después. Se determina el acortamiento fraccional de las Imágenes de modo-M. Se realizaron comparaciones entre el acortamiento fraccional pre-dosis y tratamiento de compuesto por ANOVA y un post-hoc Student - Newman - Keuls. Se dejó que se recuperaran los animales y a los 7-10 días, se infusieron de nuevo los
- 20 animales con compuestos usando el protocolo hemodinámico para determinar los cambios hemodinámicos de los compuestos en los animales con insuficiencia cardíaca. Al final de la infusión, se mataron las ratas y se determinaron los pesos del corazón.
- 25 Cuando se ensayó como se describió antes, los compuestos de Fórmula I muestran tener la actividad deseada.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto representado por la Fórmula I:



Fórmula I

5 en la que:

R^3 es un grupo fenilo, isoxazolilo, oxazolilo, piridinilo, pirazinilo, pirimidinilo, tetrazol-5-ilo, tiazolilo, tiadiazolilo o imidazolilo, que está opcionalmente sustituido con un halógeno, alcoxi inferior, un grupo arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido;

10

R^4 es halógeno;

R^6 es hidrógeno, halógeno, hidroxilo o alquilo inferior opcionalmente sustituido y

15 R^6 y R^7 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, hidroxilo y alquilo inferior opcionalmente sustituido;

incluyendo simples estereoisómeros, mezclas de estereoisómeros y las sales, solvatos farmacéuticamente aceptables, solvatos de sales farmacéuticamente aceptables del mismo, en la que alquilo inferior se refiere a grupos alquilo de 1 a 5 átomos de carbono y alcoxi inferior se refiere a grupos alcoxi que contienen uno a cuatro carbonos.

20

2. El compuesto según la reivindicación 1 con uno o más de los siguientes:

25

R^4 es cloro y

R^5 , R^6 y R^7 son hidrógeno.

3. El compuesto según la reivindicación 2 con uno o más de los siguientes:

30

R^1 , R^2 y el nitrógeno al que están unidos forman un piperidin-1-ilo; piperazin-1-ilo; morfolin-4-ilo; pirrolidin-1-ilo; tiomorfolin-4-ilo o diazepam-1-ilo, que opcionalmente está sustituido con uno, dos o tres de los grupos siguientes: alquilo opcionalmente sustituido, halógeno, hidroxilo, alcoxi, alquilenodioxo (por ejemplo, metileno-dioxo), carboxi (-COOH), aciloxi opcionalmente sustituido (RCOO-), alcoxycarbonil- opcionalmente sustituido (-COOR), aminocarbonilo opcionalmente sustituido, ciano, acilo opcionalmente sustituido, oxo, nitro, amino opcionalmente sustituido, sulfanilo, sulfinilo, sulfonilo, aminosulfonil- opcionalmente sustituido, amidino, fenilo, bencilo, heteroarilo, heterociclilo, heterociclilo sustituido, ariloxi, aralcoxi, heteroariloxi y heteroaralcoxi y

35

R^3 es un grupo [1,3,4]tiadiazol-2-ilo que está opcionalmente sustituido con un grupo fenilo opcionalmente sustituido o R^3 es un grupo 1H-imidazol-2-ilo.

40

4. El compuesto según la reivindicación 3 en el que R^1 , R^2 y el nitrógeno al que están unidos forman un anillo de diazepam-1-ilo opcionalmente sustituido.

45

5. El compuesto según la reivindicación 3 en el que R^1 , R^2 y el nitrógeno al que están unidos forman un anillo de piperazin-1-ilo opcionalmente sustituido.

6. El compuesto según la reivindicación 3 en el que R^1 , R^5 y el nitrógeno al que están unidos forman un anillo de piperidin-1-ilo opcionalmente sustituido.

50

7. El compuesto según la reivindicación 3 en el que R^1 , R^2 y el nitrógeno al que están unidos forman un anillo de pirrolidin-1-ilo opcionalmente sustituido.

8. El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-7 en el que R³ es oxazol-2-ilo, 5-fenil-[1,3,4]tiadiazol-2-ilo o 1H-imidazol-2-ilo.
- 5 9. El compuesto según la reivindicación 1 en el que R⁵, R⁶ y R⁷ son hidrógeno.
- 10 10. El compuesto según la reivindicación 9 en el que R⁴ es un cloro.
11. El compuesto según la reivindicación 1 en el que R³ es un grupo [1,3,4]tiadiazol-2-ilo que está opcionalmente sustituido con un grupo fenilo opcionalmente sustituido o R³ es un grupo 1H-imidazol-2-ilo y R⁵, R⁶ y R⁷ son hidrógeno.
12. El compuesto según la reivindicación 1 en el que R³ es 5-fenil-[1,3,4]tiadiazol-2-ilo o 1 H-imidazol-2-ilo y R⁵, R⁶ y R⁷ hidrógeno.
- 15 13. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto, simple estereoisómero, mezcla de estereoisómeros, sal, solvato farmacéuticamente aceptable, o un solvato de una sal farmacéuticamente aceptable según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para su uso como medicamento.
- 20 14. Uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto, simple estereoisómero, mezcla de estereoisómeros, sal, solvato farmacéuticamente aceptable, o un solvato de una sal farmacéuticamente aceptable según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de insuficiencia cardíaca.
- 25 15. Una formulación farmacéutica que comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable y una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto, simple estereoisómero, mezcla de estereoisómeros, sal, solvato farmacéuticamente aceptable, o un solvato de una sal farmacéuticamente aceptable según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.