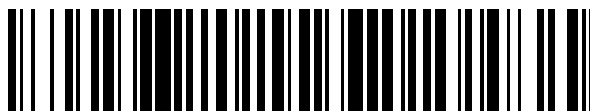


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 522 579**

51 Int. Cl.:

A61K 31/40 (2006.01)

A61K 31/42 (2006.01)

A61K 31/44 (2006.01)

C07D 401/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.06.2005 E 05761304 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.08.2014 EP 1765327**

54 Título: **Compuestos, composiciones y métodos**

30 Prioridad:

17.06.2004 US 581197 P

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

17.11.2014

73 Titular/es:

**CYTOKINETICS, INC. (100.0%)
280 EAST GRAND AVENUE
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080, US**

72 Inventor/es:

**MORGAN, BRADLEY P.;
MUCI, ALEX;
LU, PU-PING;
KRAYNACK, ERICA;
TOCHIMOTO, TODD y
MORGANS, DAVID**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 522 579 T3

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

DESCRIPCIÓN

Compuestos, composiciones y métodos

5 La invención se refiere a derivados de urea sustituidos, particularmente a entidades químicas que modulan selectivamente el sarcómero cardíaco y específicamente a entidades químicas, composiciones farmacéuticas y compuestos y composiciones para su uso en métodos de tratamiento de una cardiopatía.

10 El "sarcómero" es una estructura celular elegantemente organizada que se encuentra en el músculo cardíaco y esquelético compuesta de filamentos finos y gruesos dispuestos en paralelo e intercalados (interdigitados); comprende casi el 60% del volumen de las células cardíacas. Los filamentos gruesos están compuestos por "miosina", la proteína responsable de la transducción de energía química (hidrólisis de ATP) a fuerza y movimiento dirigido. La miosina y sus primas funcionalmente relacionadas se llaman proteínas motoras. Los filamentos finos están compuestos por un complejo de proteínas. Una de estas proteínas, la "actina" (un polímero filamentoso) es el sustrato del que tira la miosina durante la generación de fuerza. Existe un conjunto de proteínas reguladoras unido a la actina, el "complejo de troponina" y "tropomiosina", que hace que la interacción actina-miosina dependa de los cambios en los niveles de Ca^{2+} intracelular. Con cada latido cardíaco, los niveles de Ca^{2+} suben y bajan, iniciando la contracción del músculo cardíaco y, a continuación, la relajación del músculo cardíaco. Cada uno de los componentes del sarcómero contribuye a su respuesta contráctil.

20 La miosina es la más estudiada de las proteínas motoras. De las trece clases distintas 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 de la miosina en las otras doce clases distintas en cuanto a composición de aminoácidos y estructura global. La miosina-II consiste en dos dominios de cabeza globulares unidos entre sí mediante una cola en hélice alfa superenrollada larga que se ensambla con otras miosina-II para formar el núcleo del filamento grueso del sarcómero. Las cabezas globulares tienen un dominio catalítico en el que tienen lugar las funciones ATP y de unión a actina de la miosina. Una vez unida a un filamento de actina, la liberación de fosfato (véase ATP a ADP) conduce a un cambio en la conformación estructural del dominio catalítico que a su vez modifica la orientación del dominio brazo de palanca de unión a la cadena ligera que se prolonga desde la cabeza globular; este movimiento se denomina golpe de potencia. Este cambio en la orientación de la cabeza de miosina con respecto a la actina hace que el filamento grueso del que es parte se desplace con respecto al filamento fino de actina al que está unido. La desunión de la cabeza globular de los filamentos de actina (también modulada por Ca^{2+}) junto con el regreso del dominio catalítico y la cadena ligera a su conformación/orientación de partida completa el ciclo de contracción y relajación.

35 El músculo cardíaco de mamíferos consiste en dos formas de miosina cardíaca, alfa y beta, y están bien caracterizadas. La forma beta es la forma predominante (> 90 por ciento) en el músculo cardíaco humano adulto. Se ha observado que ambas están reguladas en condiciones de insuficiencia cardíaca humana a nivel de la transcripción y de la traducción, presentando la forma alfa una regulación por disminución en la insuficiencia cardíaca.

40 Se han determinado las secuencias de todas las miosinas del músculo esquelético, cardíaco y liso humano. Aunque las miosinas cardíacas alfa y beta son muy similares (93% de identidad), ambas son considerablemente diferentes de las del músculo liso humano (42% de identidad) y están más estrechamente relacionadas con las miosinas esqueléticas (80% de identidad). De manera práctica, las miosinas del músculo cardíaco están increíblemente conservadas en especies de mamíferos. Por ejemplo, las miosinas cardíacas alfa y beta están conservadas en > 96% entre los seres humanos y las ratas, y la secuencia de 250 residuos disponible de miosina beta cardíaca porcina está conservada en el 100% con respecto a la secuencia de la miosina beta cardíaca humana correspondiente. Tal conservación de secuencias contribuye a la previsibilidad de estudiar agentes terapéuticos basados en miosina en modelos animales de insuficiencia cardíaca.

55 Los componentes de los sarcómeros cardíacos presentan dianas para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca, por ejemplo, aumentando la contractilidad o facilitando la relajación completa para modular la función sistólica y diastólica, respectivamente.

60 La insuficiencia cardíaca congestiva ("ICC") no es una enfermedad específica, sino más bien una constelación de signos y síntomas, todos los cuales son provocados por la incapacidad del corazón para responder adecuadamente al esfuerzo aumentando el gasto cardíaco. La fisiopatología dominante asociada con la ICC es la disfunción sistólica, un deterioro de la contractilidad cardíaca (con la consiguiente reducción de la cantidad de sangre expulsada con cada latido cardíaco). La disfunción sistólica con dilatación compensatoria de las cavidades ventriculares da como resultado la forma más común de insuficiencia cardíaca, la "miocardiopatía dilatada", que a menudo se considera lo mismo que la ICC. El contrapunto a la disfunción sistólica es la disfunción diastólica, un deterioro de la capacidad de llenar los ventrículos con sangre, que también puede dar como resultado la insuficiencia cardíaca, incluso conservando la función ventricular izquierda. La insuficiencia cardíaca congestiva se asocia en última instancia con la función inadecuada del propio miocito cardíaco, lo que implica una disminución de su capacidad para contraerse y relajarse.

Muchas de las mismas afecciones subyacentes pueden dar lugar a una disfunción sistólica y/o diastólica, tal como la aterosclerosis, la hipertensión, la infección viral, la disfunción valvular y los trastornos genéticos. Los pacientes con estas afecciones se presentan por lo general con los mismos síntomas clásicos: dificultad para respirar, edema y fatiga abrumadora. En aproximadamente la mitad de los pacientes con miocardiopatía dilatada, la causa de su disfunción cardíaca es la cardiopatía isquémica debida a aterosclerosis coronaria. Estos pacientes han tenido un único infarto de miocardio o múltiples infartos de miocardio; en este caso, la consiguiente cicatrización y remodelación da como resultado el desarrollo de un corazón dilatado e hipocontráctil. A veces no puede identificarse el agente causal, por lo que la enfermedad se denomina "miocardiopatía dilatada idiopática". Independientemente de su origen isquémico u otro origen, los pacientes con miocardiopatía dilatada comparten un pronóstico pésimo, una morbilidad excesiva y una elevada mortalidad.

La prevalencia de la ICC ha crecido hasta proporciones epidémicas a medida que la población envejece y a medida que los cardiólogos tienen más éxito en la reducción de la mortalidad por cardiopatía isquémica, el preludeo más común de la ICC. Aproximadamente 4,6 millones de personas en los Estados Unidos han sido diagnosticadas de ICC; la incidencia de tal diagnóstico se acerca al 10 por 1.000 después de los 65 años de edad. La hospitalización por ICC es generalmente el resultado de un tratamiento ambulatorio inadecuado. Las altas hospitalarias por ICC aumentaron de 377.000 (en 1979) a 970.000 (en 2002) lo que hace de la ICC el diagnóstico de alta más frecuente en personas mayores de 65 años. La mortalidad a cinco años por ICC se acerca al 50%. Por lo tanto, aunque los tratamientos para las cardiopatías han mejorado mucho y la esperanza de vida se ha prolongado en los últimos años, se siguen buscando nuevos y mejores tratamientos, especialmente para la ICC.

La insuficiencia cardíaca congestiva "aguda" (también conocida como insuficiencia cardíaca "descompensada" aguda) implica un fuerte descenso de la función cardíaca como resultado de diversas causas. Por ejemplo, en un paciente que ya tiene insuficiencia cardíaca congestiva, un nuevo infarto de miocardio, la interrupción de la medicación y las transgresiones alimentarias pueden conducir a la acumulación de fluido edematoso e insuficiencia metabólica incluso en estado de reposo. Un agente terapéutico que aumente la función cardíaca durante un episodio agudo de este tipo podría ayudar a aliviar esta insuficiencia metabólica y acelerar la eliminación del edema, facilitar la vuelta al estado de insuficiencia cardíaca congestiva "compensada" más estable. Los pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva muy avanzada, especialmente los que están en la fase terminal de la enfermedad también podrían beneficiarse de un agente terapéutico que aumente la función cardíaca, por ejemplo, para la estabilización a la espera de un trasplante de corazón. Podrían proporcionarse otros beneficios potenciales a los pacientes que salen de una bomba de CEC, por ejemplo, mediante la administración de un agente que ayude al corazón parado o ralentizado a reanudar su función normal. Los pacientes con disfunción diastólica (relajación insuficiente del músculo cardíaco) podrían beneficiarse de un agente terapéutico que modulate la relajación.

Los inotrópicos son fármacos que aumentan la capacidad contráctil del corazón. Como grupo, los inotrópicos actuales no han logrado cumplir con el método de referencia para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca, es decir, para prolongar la supervivencia del paciente. Además, los agentes actuales son poco selectivos para el tejido cardíaco, lo que en parte conduce a efectos adversos reconocidos que limitan su uso. A pesar de este hecho, los inotrópicos intravenosos siguen siendo ampliamente utilizados en la insuficiencia cardíaca aguda (por ejemplo, para permitir el restablecimiento de medicamentos por vía oral o para la transición de los pacientes hasta un trasplante de corazón), mientras que en la insuficiencia cardíaca crónica, la digoxina administrada por vía oral se utiliza como inotrópico para aliviar los síntomas de los paciente, mejorar la calidad de vida y reducir los ingresos hospitalarios.

Los tratamientos inotrópicos actuales mejoran la contractilidad aumentando el transitorio de calcio a través de la vía de la adenilato ciclase o retrasando la degradación del AMPc a través de la inhibición de la fosfodiesterasa (PDE), que puede ser perjudicial para los pacientes con insuficiencia cardíaca.

Dadas las limitaciones de los agentes actuales, se necesitan nuevos enfoques para mejorar la función cardíaca en la insuficiencia cardíaca congestiva. El agente intravenoso de corto plazo de más reciente autorización, la milrinona, tiene más de quince años. El único fármaco oral disponible, la digoxina, tiene más de 200 años. Sigue existiendo una gran necesidad de agentes que aprovechen nuevos mecanismos de acción y puedan tener mejores resultados en términos de alivio de los síntomas, seguridad y mortalidad de los pacientes, tanto a corto como a largo plazo. Los nuevos agentes con un índice terapéutico mejorado sobre los agentes actuales proporcionarán un medio para conseguir estos resultados clínicos.

Se ha identificado la selectividad de agentes dirigidos al sarcómero cardíaco (por ejemplo, teniendo como diana la miosina beta cardíaca) como un importante medio para conseguir este índice terapéutico mejorado. La presente invención proporciona tales agentes (particularmente agentes activadores del sarcómero) y métodos para su identificación y uso.

Otro enfoque puede ser la activación directa de la miosina cardíaca sin cambiar el transitorio de calcio para mejorar la contractilidad cardíaca. La presente invención proporciona tales agentes (particularmente agentes activadores de la miosina) y métodos para su identificación y uso.

También se proporciona una composición farmacéutica que comprende un excipiente, vehículo o adyuvante farmacéuticamente aceptable y al menos una entidad química descrita en el presente documento.

5 También se proporciona una composición farmacéutica envasada, que comprende una composición farmacéutica que comprende un excipiente, vehículo o adyuvante farmacéuticamente aceptable y al menos una entidad química descrita en el presente documento, e instrucciones para utilizar la composición para tratar a un paciente que padece una cardiopatía.

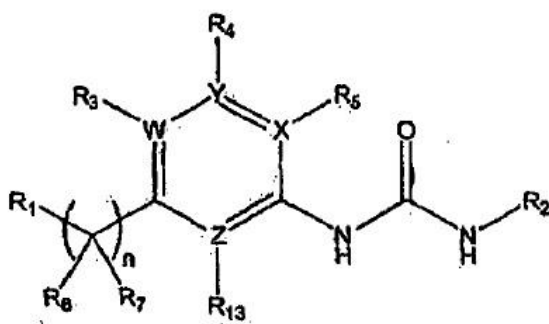
10 También se proporciona al menos una entidad química descrita en el presente documento o una composición farmacéutica que comprende un excipiente, vehículo o adyuvante farmacéuticamente aceptable y al menos una entidad química descrita en el presente documento para su uso en un método de tratamiento de una cardiopatía en un mamífero, método que comprende administrar a un mamífero que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz.

15 También se proporciona al menos una entidad química descrita en el presente documento o una composición farmacéutica que comprende un excipiente, vehículo o adyuvante farmacéuticamente aceptable y al menos una entidad química descrita en el presente documento para su uso en un método para modular el sarcómero cardiaco en un mamífero, método que comprende administrar a un mamífero que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos una entidad química descrita en el presente documento o una
20 composición farmacéutica que comprende un excipiente, vehículo o adyuvante farmacéuticamente aceptable y al menos una entidad química descrita en el presente documento.

25 También se proporciona al menos una entidad química descrita en el presente documento o una composición farmacéutica que comprende un excipiente, vehículo o adyuvante farmacéuticamente aceptable y al menos una entidad química descrita en el presente documento para su uso en un método para potenciar la miosina cardiaca en un mamífero, método que comprende administrar a un mamífero que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos una entidad química descrita en el presente documento o una composición farmacéutica que comprende un excipiente, vehículo o adyuvante farmacéuticamente aceptable y al menos una
30 entidad química descrita en el presente documento.

También se proporciona el uso, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cardiopatías, de por lo menos una entidad química descrita en el presente documento.

35 También se describe un método para preparar un compuesto de Fórmula I.



50 **Fórmula I**

55 en la que R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ y R₁₃ son como se definen a continuación

W, X, Y y Z son independientemente -C= o -N=, siempre que no más de dos de W, X, Y y Z sean -N=; n es uno, dos o tres;

R₁ es amino opcionalmente sustituido o heterocicloalquilo opcionalmente sustituido;

60 R₂ es arilo opcionalmente sustituido, aralquilo opcionalmente sustituido, cicloalquilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, heteroaralquilo opcionalmente sustituido o heterocicloalquilo opcionalmente sustituido,

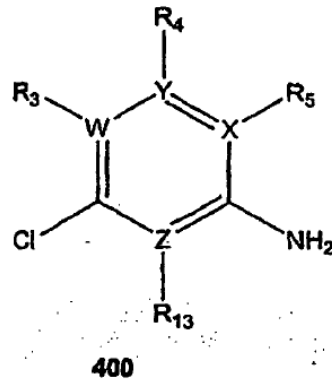
R₃ es hidrógeno, halo, ciano, alquilo opcionalmente sustituido, heterocicloalquilo opcionalmente sustituido o heteroarilo opcionalmente sustituido cuando W es -C=, y R₃ está ausente cuando W es -N=;

R₄ es hidrógeno, halo, ciano, alquilo opcionalmente sustituido, heterocicloalquilo opcionalmente sustituido o heteroarilo opcionalmente sustituido cuando Y es -C=, y R₄ está ausente cuando Y es -N=; y

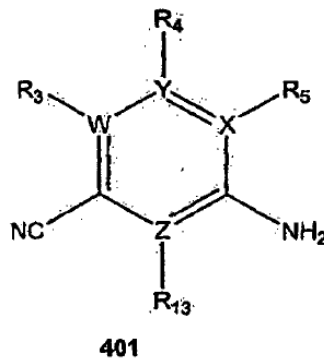
65 R₅ es hidrógeno, halo, ciano, alquilo opcionalmente sustituido, heterocicloalquilo opcionalmente sustituido o heteroarilo opcionalmente sustituido cuando X es -C=, y R₅ está ausente cuando X es -N=;

R₁₃ es hidrógeno, halo, ciano, hidroxilo, alquilo opcionalmente sustituido, heterocicloalquilo opcionalmente sustituido o heteroarilo opcionalmente sustituido cuando Z es -C=, y R₁₃ está ausente cuando Z es -N=; y R₆ y R₇ son independientemente hidrógeno, aminocarbonilo, alcoxicarbonilo, alquilo opcionalmente sustituido o alcoxi opcionalmente sustituido, o R₆ y R₇, junto con el carbono al que están unidos, forman un anillo de 3 a 7 miembros opcionalmente sustituido que incorpora opcionalmente uno o dos heteroátomos adicionales, seleccionados de entre N, O y S en el anillo,

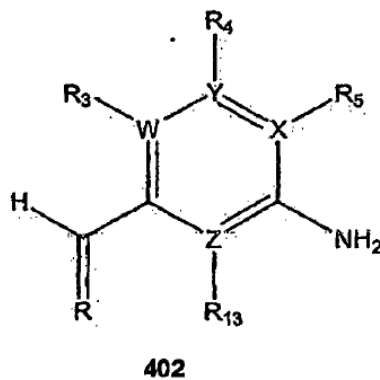
que comprende las etapas de convertir un compuesto de fórmula 400



en un compuesto de Fórmula 401;

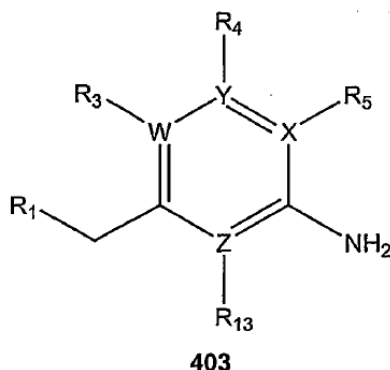


hidrolizar el compuesto de Fórmula 401 hasta un compuesto de Fórmula 402



en la que R está seleccionado de entre O y NH;

poner en contacto un compuesto de Fórmula 402 con un compuesto de fórmula R_1-H en la que R_1 es amino opcionalmente sustituido o heterocicloalquilo opcionalmente sustituido para formar un compuesto de Fórmula 403; y



20 poner en contacto un compuesto de Fórmula 403 con un compuesto de fórmula R_2-NCO para proporcionar un compuesto de Fórmula I.

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

30 Tal como se utilizan en la presente memoria descriptiva, los siguientes términos y expresiones pretenden tener generalmente los significados que se presentan a continuación, excepto en la medida en que el contexto en el que se utilizan indique lo contrario. Las siguientes abreviaturas y términos tienen los significados indicados en todas partes:

35

40

45

50

55

60

Ac	= acetilo
Boc	= t-butiloxi carbonilo
c-	= ciclo
CBZ	= carbobenzoxi = benciloxicarbonilo
DCM	= diclorometano = cloruro de metileno = CH_2Cl_2
DIBAL-H	= hidruro de diisobutilaluminio
DIEA o DIPEA	= N,N-diisopropiletilamina
DMF	= N,N-dimetilformamida
DMSO	= dimetilsulfóxido
eq	= equivalente
Et	= etilo
EtOAc	= acetato de etilo
EtOH	= etanol
g	= gramo
GC	= cromatografía de gases
h, hr, hrs	= hora u horas
Me	= metilo
min	= minuto
ml	= mililitro
mmol	= milimoles
Ph	= fenilo
PyBroP	= hexafluorofosfato de bromo-tris-pirrolidino-fosfonio
TA	= temperatura ambiente
s-	= secundario/a
t-	= terciario/a
TFA	= ácido trifluoroacético
THF	= tetrahidrofurano
TLC	= cromatografía en capa fina
Volumen	= ml/g de material en base al reactivo limitante a menos que se especifique lo contrario

Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, los siguientes términos y expresiones pretenden tener generalmente los significados que se presentan a continuación, excepto en la medida en que el contexto en el que se utilizan indique lo contrario.

65 Tal como se utiliza en el presente documento, cuando aparece cualquier variable más de una vez en una fórmula química, su definición en cada aparición es independiente de su definición en cualquier otra aparición.

Un guión ("-") que no está entre dos letras o símbolos se utiliza para indicar un punto de unión para un sustituyente. Por ejemplo, $-\text{CONH}_2$ está unido a través del átomo de carbono.

5 "Opcional" u "opcionalmente" se refiere a que el evento o circunstancia descritos posteriormente pueden producirse o no, y que la descripción incluye casos en los que el evento o circunstancia se produce y casos en los que no lo hace. Por ejemplo, "alquilo opcionalmente sustituido" abarca tanto "alquilo" como "alquilo sustituido" tal como se define a continuación. Los expertos en la materia entenderán, con respecto a cualquier grupo que contiene uno o más sustituyentes, que tales grupos no pretenden introducir ninguna sustitución o patrones de sustitución que sean estéricamente poco factibles, sintéticamente inviables y/o inherentemente inestables.

10 "Alquilo" abarca cadena lineal y cadena ramificada con el número indicado de átomos de carbono. Los grupos alquilo generalmente son aquellos de C_{20} o menos, tal como C_{13} o menos, por ejemplo, C_6 o menos. Por ejemplo, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ incluye alquilo de cadena tanto lineal como ramificada de 1 a 6 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos alquilo incluyen metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, sec-butilo, terc-butilo, pentilo, 2-pentilo, isopentilo, neopentilo, hexilo, 2-hexilo, 3-hexilo, 3-metilpentilo, y similares. Alquileno es otro subconjunto de alquilo, que se refiere a los mismos residuos que el alquilo, pero que tiene dos puntos de unión. Por ejemplo, alquileno C_o indica un enlace covalente y alquileno C_1 es un grupo metileno. Cuando se nombra un residuo alquilo con un número específico de carbonos, pretenden quedar abarcados todos los isómeros geométricos con ese número de carbonos; Por lo tanto, por ejemplo, "butilo" incluye n-butilo, sec-butilo, isobutilo y t-butilo; "propilo" incluye n-propilo e isopropilo. "Alquilo inferior" se refiere a grupos alquilo con uno a cuatro carbonos.

25 "Cicloalquilo" indica un anillo hidrocarburo saturado o un anillo bicíclico condensado, con el número especificado de átomos de carbono, normalmente de 3 a 12 átomos de carbono en el anillo, más habitualmente de 3 a 10, o de 3 a 7. Los ejemplos de grupos cicloalquilo incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo y ciclohexilo, así como grupos de anillos saturados con puentes y enjaulados tales como norbornano. Los ejemplos de anillos bicíclicos condensados incluyen octahidro-1H-indeno, octahidropentaleno, 1,2,3,3a,4,5-hexahidro-pentaleno, 1,2,4,5,6,7,7a-heptahidro-2H-indeno, 4,5,6,7-tetrahidro-2H-indeno y similares.

30 "Alcoxi" se refiere a un grupo alquilo unido a través de un puente de oxígeno tal como, por ejemplo, metoxi, etoxi, propoxi, isopropoxi, n-butoxi, sec-butoxi, terc-butoxi, pentoxi, 2-pentiloxi, isopentoxi, neopentoxi, hexoxi, 2-hexoxi, 3-hexoxi, 3-metilpentoxi, y similares. El grupo alquilo de un grupo alcoxi es generalmente de C_{20} o menos, tal como C_{13} o menos, por ejemplo, C_6 o menos. "Alcoxi inferior" se refiere a grupos alcoxi con uno a cuatro carbonos.

35 "Cicloalcoxi" se refiere a un grupo cicloalquilo unido a través de un puente de oxígeno tal como, por ejemplo, ciclopropoxi, ciclobutoxi, ciclopentoxi, ciclohexoxi, cicloheptoxi, y similares. El grupo cicloalquilo de un grupo cicloalcoxi es generalmente de C_{20} o menos, tal como C_{13} o menos, por ejemplo, C_6 o menos.

40 "Acilo" se refiere a los grupos (alquil)- $\text{C}(\text{O})-$; (cicloalquil)- $\text{C}(\text{O})-$; (aril)- $\text{C}(\text{O})-$; (heteroaril)- $\text{C}(\text{O})-$; y (heterocicloalquil)- $\text{C}(\text{O})-$, en los que el grupo está unido al precursor a través de la funcionalidad carbonilo y en los que alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterocicloalquilo son como se describe en el presente documento. Los grupos acilo tienen el número indicado de átomos de carbono, incluyéndose el carbono del grupo ceto en los átomos de carbono numerados. Por ejemplo, un grupo acilo C_2 es un grupo acetilo que tiene la fórmula $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})-$.

45 "Alcoxycarbonilo" se refiere a un grupo éster de fórmula (alcoxi) $\text{C}(\text{O})$ unido a través del carbono del carbonilo en el que el grupo alcoxi tiene el número indicado de átomos de carbono. Por lo tanto, un grupo alcoxycarbonilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ es un grupo alcoxi con 1 a 6 átomos de carbono unidos a través de su oxígeno a un enlazador carbonilo.

50 "Amino" se refiere al grupo $-\text{NH}_2$.

El término "aminocarbonilo" se refiere al grupo $-\text{CONR}^b\text{R}^c$, en el que R^b está seleccionado de entre hidrógeno, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido y heteroarilo opcionalmente sustituido; y R^c está seleccionado de entre hidrógeno y alquilo $\text{C}_1\text{-C}_4$ opcionalmente sustituido; o R^b y R^c junto con el nitrógeno al que están unidos, forman un heterocicloalquilo que contiene nitrógeno de 5 a 7 miembros opcionalmente sustituido que incluye opcionalmente 1 ó 2 heteroátomos adicionales seleccionados de entre O, N y S en el anillo heterocicloalquilo; en el que cada grupo sustituido está sustituido independientemente con uno o más sustituyentes seleccionados independientemente de entre alquilo $\text{C}_1\text{-C}_4$, arilo, heteroarilo, aril-alquilo $\text{C}_1\text{-C}_4$, heteroaril-alquilo $\text{C}_1\text{-C}_4$, haloalquilo $\text{C}_1\text{-C}_4$, -Oalquilo $\text{C}_1\text{-C}_4$, -Oalquilfenilo $\text{C}_1\text{-C}_4$, -alquilo $\text{C}_1\text{-C}_4\text{-OH}$, -Ohaloalquilo $\text{C}_1\text{-C}_4$, halo, -OH, $-\text{NH}_2$, -alquilo $\text{C}_1\text{-C}_4\text{-NH}_2$, -N(alquilo $\text{C}_1\text{-C}_4$)(alquilo $\text{C}_1\text{-C}_4$), -NH(alquilo $\text{C}_1\text{-C}_4$), -N(alquilo $\text{C}_1\text{-C}_4$)(alquilfenilo $\text{C}_1\text{-C}_4$), -NH(alquilfenilo $\text{C}_1\text{-C}_4$), ciano, nitro, oxo (como sustituyente para cicloalquilo, heterocicloalquilo o heteroarilo), $-\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{C}(\text{O})\text{Oalquilo}$ $\text{C}_1\text{-C}_4$, $-\text{CON}(\text{alquilo } \text{C}_1\text{-C}_4)(\text{alquilo } \text{C}_1\text{-C}_4)$, $\text{CONH}(\text{alquilo } \text{C}_1\text{-C}_4)$, $-\text{CONH}_2$, $-\text{NHC}(\text{O})(\text{alquilo } \text{C}_1\text{-C}_4)$, $-\text{NHC}(\text{O})(\text{fenilo})$, $-\text{N}(\text{alquilo } \text{C}_1\text{-C}_4)\text{C}(\text{O})(\text{alquilo } \text{C}_1\text{-C}_4)$, $-\text{N}(\text{alquilo } \text{C}_1\text{-C}_4)\text{C}(\text{O})(\text{fenilo})$, $-\text{C}(\text{O})\text{alquilo } \text{C}_1\text{-C}_4$, $-\text{C}(\text{O})\text{fenilo } \text{C}_1\text{-C}_4$,

-C(O)haloalquilo C₁-C₄, -OC(O)alquilo C₁-C₄, -SO₂(alquilo C₁-C₄), -SO₂(fenilo), -SO₂(haloalquilo C₁-C₄), -SO₂NH₂, -SO₂NH(alquilo C₁-C₄), -SO₂NH(fenilo), -NHSO₂(alquilo C₁-C₄), -NHSO₂(fenilo) y -NHSO₂(haloalquilo C₁-C₄).

5 "Arilo" abarca: anillos aromáticos carbocíclicos de 5 y 6 miembros, por ejemplo, benceno; sistemas de anillos bicíclicos en los que al menos un anillo es carbocíclico y aromático, por ejemplo, naftaleno, indano y tetralina; y sistemas de anillos tricíclicos en los que al menos un anillo es carbocíclico y aromático, por ejemplo, fluoreno.

10 Por ejemplo, arilo incluye anillos aromáticos carbocíclicos de 5 y 6 miembros condensados a un anillo heterocicloalquilo de 5 a 7 miembros que contiene 1 o más heteroátomos seleccionados de entre N, O y S. Para tales sistemas de anillo bicíclico condensado en los que sólo uno de los anillos es un anillo aromático carbocíclico, el punto de unión puede estar en el anillo aromático carbocíclico o el anillo heterocicloalquilo. Los radicales bivalentes formados a partir de derivados bencénicos sustituidos y que tienen las valencias libres en los átomos del anillo se nombran como radicales fenileno sustituido. Los radicales bivalentes derivados de radicales de hidrocarburo policíclicos univalentes cuyos nombres terminan en "ilo" por eliminación de un átomo de hidrógeno del átomo de carbono con la valencia libre se nombran añadiendo "ideno" al nombre del correspondiente radical univalente, por ejemplo, un grupo naftilo con dos puntos de unión se denomina naftilideno. Arilo, sin embargo, no abarca ni se solapa de ninguna manera con heteroarilo, que se define por separado más adelante. Por lo tanto, si uno o más anillos aromáticos carbocíclicos están condensados con un anillo aromático heterocicloalquilo, el sistema de anillo resultante es heteroarilo, no arilo, tal como se define en el presente documento.

20 El término "ariloxi" se refiere al grupo -O-arilo.

25 En el término "arilalquilo" o "aralquilo", arilo y alquilo son como se definen en el presente documento, y el punto de unión está en el grupo alquilo. Este término abarca, pero no se limita a, bencilo, fenetilo, fenilvinilo, fenilalilo y similares.

El término "halo" incluye fluoro, cloro, bromo y yodo, y el término "halógeno" incluye flúor, cloro, bromo y yodo.

30 "Haloalquilo" indica alquilo como se ha definido anteriormente con el número especificado de átomos de carbono, sustituido con 1 o más átomos de halógeno, generalmente hasta el número máximo admisible de átomos de halógeno. Los ejemplos de haloalquilo incluyen, pero no se limitan a, trifluorometilo, difluorometilo, 2-fluoroetilo y penta-fluoroetilo.

35 "Heteroarilo" abarca: anillos monocíclicos aromáticos de 5 a 7 miembros, que contienen uno o más, por ejemplo, de 1 a 4, o en determinadas formas de realización, de 1 a 3, heteroátomos seleccionados de entre N, O y S, siendo carbono los restantes átomos del anillo; y anillos heterocicloalquilo bicíclicos que contienen uno o más, por ejemplo, de 1 a 4, o en determinadas formas de realización, de 1 a 3, heteroátomos seleccionados de entre N, O, y S, siendo carbono los restantes átomos del anillo y en los que al menos está presente un heteroátomo en un anillo aromático.

40 Por ejemplo, heteroarilo incluye un anillo aromático heterocicloalquilo de 5 a 7 miembros condensado con un anillo cicloalquilo de 5 a 7 miembros. Para tales sistemas de anillo heteroarilo bicíclicos condensados, en los que sólo uno de los anillos contiene uno o más heteroátomos, el punto de unión puede estar en el anillo heteroaromático o el anillo cicloalquilo. Cuando el número total de átomos de S y O en el grupo heteroarilo excede de 1, esos heteroátomos no son adyacentes entre sí. En determinadas formas de realización, el número total de átomos de S y O en el grupo heteroarilo no es superior a 2. En determinadas formas de realización, el número total de átomos de S y O en el heterociclo aromático no es superior a 1. También se incluyen dentro de la definición de heteroarilo los derivados óxido, por ejemplo N-óxidos de nitrógeno que contienen grupos arilo, tales como piridina-1-óxido, o derivados >S(O) y >S(O)₂ de los grupos que contienen azufre. Los ejemplos de grupos heteroarilo incluyen, pero no se limitan a, sistemas (como se numeran a partir de la posición de unión a la que se asigna prioridad 1), tales como 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo, 2,3-pirazinilo, 3,4-pirazinilo, 2,4-pirimidinilo, 3,5-pirimidinilo, 2,3-pirazolinilo, 2,4-imidazolinilo, isoxazolinilo, oxazolinilo, tiazolinilo, tiadiazolinilo, tetrazolilo, tienilo, benzotiofenilo, furanilo, benzofuranilo, benzoimidazolinilo, indolinilo, piridizinilo, triazolilo, quinolinilo, pirazolilo y 5,6,7,8-tetrahidroisoquinolina. Los radicales bivalentes derivados de radicales heteroarilo univalentes cuyos nombres terminan en "ilo" por eliminación de un átomo de hidrógeno del átomo con la valencia libre se nombran añadiendo "ideno" al nombre del correspondiente radical univalente, por ejemplo, un grupo piridilo con dos puntos de unión es un piridilideno. Heteroarilo no abarca ni se solapa con arilo tal como se ha definido anteriormente.

60 En el término "heteroarilalquilo" o "heteroaralquilo", heteroarilo y alquilo son como se definen en el presente documento, y el punto de unión está en el grupo alquilo. Este término abarca, pero no se limita a, piridilmetilo, tiofenilmetilo y (pirrolil) 1-etilo.

65 "Heterocicloalquilo" se refiere a un residuo cicloalquilo en el que de uno a cuatro de los átomos de carbono están sustituidos por un heteroátomo tal como oxígeno, nitrógeno o azufre. Los grupos heterocicloalquilo adecuados incluyen, por ejemplo (como se numeran a partir de la posición de unión a la que se asigna prioridad 1), 2-pirrolinilo,

2,4-imidazolidinilo, 2,3-pirazolidinilo, 2-piperidilo, 3-piperidilo, 4-piperidilo y 2,5-piperazinilo. También se contemplan los grupos morfolinilo, incluidos 2-morfolinilo y 3-morfolinilo (numerados donde al oxígeno se asigna prioridad 1).

5 Tal como se utiliza en el presente documento, "modulación" se refiere a un cambio en la actividad de la miosina o del sarcómero como una respuesta directa o indirecta a la presencia de al menos una entidad química descrita en el presente documento, con respecto a la actividad de la miosina o del sarcómero en ausencia del compuesto. El cambio puede ser un aumento de la actividad o una disminución de la actividad, y puede deberse a la interacción directa del compuesto con la miosina o el sarcómero, o deberse a la interacción del compuesto con uno o más de otros factores que a su vez influyen en la actividad de la miosina o del sarcómero.

10 El término "sulfanilo" incluye los grupos: -S-(alquilo opcionalmente sustituido), -S-(arilo opcionalmente sustituido), -S-(heteroarilo opcionalmente sustituido) y -S-(heterocicloalquilo opcionalmente sustituido). Por lo tanto, sulfanilo incluye el grupo alquilsulfanilo C₁-C₆.

15 El término "sulfínilo" incluye los grupos: -S(O)H, -S(O)-(alquilo opcionalmente sustituido), -S(O)-(arilo opcionalmente sustituido), -S(O)-(heteroarilo opcionalmente sustituido), -S(O)-(heterocicloalquilo opcionalmente sustituido) y -S(O)-(amino opcionalmente sustituido).

20 El término "sulfonilo" incluye los grupos: -S(O₂)-H, -S(O₂)-(alquilo opcionalmente sustituido), -S(O₂)-(arilo opcionalmente sustituido), -S(O₂)-(heteroarilo opcionalmente sustituido), -S(O₂)-(heterocicloalquilo opcionalmente sustituido), -S(O₂)-(alcoxi opcionalmente sustituido), -S(O₂)-(ariloxi opcionalmente sustituido), -S(O₂)-(heteroariloxi opcionalmente sustituido), -S(O₂)-(heterocicloalquilo opcionalmente sustituido) y S(O₂)-(amino opcionalmente sustituido).

25 El término "sustituido", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a que uno cualquiera o más hidrógenos en el átomo o grupo indicado está sustituido con una selección del grupo indicado, siempre que no se supere la valencia normal del átomo indicado. Cuando un sustituyente sea oxo (es decir, =O), están sustituidos 2 hidrógenos en el átomo. Las combinaciones de sustituyentes y/o variables son aceptables sólo si tales combinaciones dan como resultado compuestos estables o productos intermedios sintéticos útiles. Un compuesto estable o estructura estable implica un compuesto que es suficientemente robusto para sobrevivir al aislamiento a partir de una mezcla de reacción, y la posterior formulación como agente con al menos utilidad práctica. A menos que se especifique lo contrario, los sustituyentes se nombran en la estructura central. Por ejemplo, debe entenderse que cuando aparece (cicloalquil)alquilo como posible sustituyente, el punto de unión de este sustituyente a la estructura central está en la porción alquilo.

35 Las expresiones alquilo, cicloalquilo, arilo, heterocicloalquilo y heteroarilo "sustituido", a menos que se definan expresamente de otro modo, se refieren respectivamente a alquilo, cicloalquilo, arilo, heterocicloalquilo y heteroarilo en los que uno o más (hasta 5, tal como hasta 3) átomos de hidrógeno están sustituidos por un sustituyente seleccionado independientemente de entre:

40 -R^a, -OR^b, -O(alquilo C₁-C₂)O- (por ejemplo, metilenedioxi-), -SR^b, guanidina, guanidina en la que uno o más de los hidrógenos de la guanidina están sustituidos con un grupo alquilo inferior, -NR^bR^c, halo, ciano, nitro, -COR^b, -CO₂R^b, -CONR^bR^c, -OCOR^b, -OCO₂R^a, -OCONR^bR^c, -NR^cCOR^b, -NR^cCO₂R^a, -NR^cCONR^bR^c, -SOR^a, -SO₂R^a, -SO₂NR^bR^c, y -NR^cSO₂R^a,

45 en el que R^a está seleccionado de entre alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido y heteroarilo opcionalmente sustituido;

R^b está seleccionado de entre hidrógeno, alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido y heteroarilo opcionalmente sustituido; y

R^c está seleccionado de entre hidrógeno y alquilo C₁-C₄ opcionalmente sustituido; o

50 R^b y R^c junto con el nitrógeno al que están unidos, forman un heterocicloalquilo que contiene nitrógeno de 5 a 7 miembros opcionalmente sustituido que incluye opcionalmente 1 ó 2 heteroátomos adicionales seleccionados de entre O, N y S en el anillo heterocicloalquilo;

55 en el que cada grupo opcionalmente sustituido no está sustituido o está sustituido independientemente con uno o más, tal como uno, dos o tres, sustituyentes seleccionados independientemente de entre alquilo C₁-C₄, arilo, heteroarilo, aril-alquilo C₁-C₄, heteroaril-alquilo C₁-C₄, haloalquilo C₁-C₄, -Oalquilo C₁-C₄, -Oalquilfenilo C₁-C₄, -alquilo C₁-C₄-OH, -Ohaloalquilo C₁-C₄, halo, -OH, -NH₂, -alquilo C₁-C₄-NH₂, N(alquilo C₁-C₄)(alquilo C₁-C₄), -NH(alquilo C₁-C₄), -N(alquilo C₁-C₄)(alquilfenilo C₁-C₄), -NH(alquilfenilo C₁-C₄), ciano, nitro, oxo (como sustituyente para cicloalquilo, heterocicloalquilo o heteroarilo), -CO₂H, -C(O)Oalquilo C₁-C₄, -CON(alquilo C₁-C₄)(alquilo C₁-C₄), CONH(alquilo C₁-C₄), -CONH₂, -NHC(O)(alquilo C₁-C₄), -NHC(O)(fenilo), N(alquilo C₁-C₄)C(O)(alquilo C₁-C₄), -N(alquilo C₁-C₄)C(O)(fenilo), -C(O)alquilo C₁-C₄, -C(O)fenilo C₁-C₄, -C(O)haloalquilo C₁-C₄, -OC(O)alquilo C₁-C₄, -SO₂(alquilo C₁-C₄), -SO₂(fenilo), -SO₂(haloalquilo C₁-C₄), -SO₂NH₂, -SO₂NH(alquilo C₁-C₄), -SO₂NH(fenilo), -NHSO₂(alquilo C₁-C₄), -NHSO₂(fenilo) y -NHSO₂(haloalquilo C₁-C₄).

65 Las expresiones cicloalquilo, arilo, heterocicloalquilo y heteroarilo "sustituido" también incluyen sustituyentes oxo (=O) y óxido (-O), por ejemplo N-óxidos de nitrógeno que contiene grupos arilo, tales como piridina-1-óxido, o derivados >S(O) y >S(O)₂ de grupos que contienen azufre.

La expresión "acilo sustituido" se refiere a los grupos (alquilo sustituido)-C(O)-; (cicloalquilo sustituido)-C(O)-; (arilo sustituido)-C(O)-; (heteroarilo sustituido)-C(O)-; y (heterocicloalquilo sustituido)-C(O)-, en los que el grupo está unido al precursor a través de la funcionalidad carbonilo y en los que alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterocicloalquilo sustituido, se refieren respectivamente a alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterocicloalquilo en los que uno o más (hasta 5, tal como hasta 3) átomos de hidrógeno están sustituidos por un sustituyente seleccionado independientemente de entre:

-R^a, -OR^b, -O(alquilo C₁-C₂)O- (por ejemplo, metilenedioxi-), -SR^b, guanidina, guanidina en la que uno o más de los hidrógenos de la guanidina están sustituidos con un grupo alquilo inferior, -NR^bR^c, halo, ciano, nitro, -COR^b, -CO₂R^b, -CONR^bR^c, -OCOR^b, -OCO₂R^a, -OCONR^bR^c, -NR^cCOR^b, -NR^cCO₂R^a, -NR^cCONR^bR^c, -CO₂R^b, -CONR^bR^c, -NR^cCOR^b, -SOR^a, -SO₂R^a, -SO₂NR^bR^c y -NR^cSO₂R^a,

en el que R^a está seleccionado de entre alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido y heteroarilo opcionalmente sustituido;

R^b está seleccionado de entre H, alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido y heteroarilo opcionalmente sustituido; y

R^c está seleccionado de entre hidrógeno y alquilo C₁-C₄ opcionalmente sustituido; o

R^b y R^c junto con el nitrógeno al que están unidos, forman un heterocicloalquilo que contiene nitrógeno de 5 a 7 miembros opcionalmente sustituido que incluye opcionalmente 1 ó 2 heteroátomos adicionales seleccionados de entre O, N y S en el anillo heterocicloalquilo;

en el que cada grupo opcionalmente sustituido no está sustituido o está sustituido independientemente con uno o más, tal como uno, dos o tres, sustituyentes seleccionados independientemente de entre alquilo C₁-C₄, arilo, heteroarilo, aril-alquilo C₁-C₄, heteroaril-alquilo C₁-C₄, haloalquilo C₁-C₄, -Oalquilo C₁-C₄, -Oalquilfenilo C₁-C₄, -alquilo C₁-C₄-OH, -Ohaloalquilo C₁-C₄, halo, -OH, -NH₂, -alquilo C₁-C₄-NH₂, -N(alquilo C₁-C₄)(alquilo C₁-C₄), -NH(alquilo C₁-C₄), -N(alquilo C₁-C₄)(alquilfenilo C₁-C₄), -NH(alquilfenilo C₁-C₄), ciano, nitro, oxo (como sustituyente para cicloalquilo, heterocicloalquilo o heteroarilo), -CO₂H, -C(O)Oalquilo C₁-C₄, -CON(alquilo C₁-C₄)(alquilo C₁-C₄), -CONH(alquilo C₁-C₄), -CONH₂, -NHC(O)(alquilo C₁-C₄), -NHC(O)(fenilo), -N(alquilo C₁-C₄)C(O)(alquilo C₁-C₄), -N(alquilo C₁-C₄)C(O)(fenilo), -C(O)alquilo C₁-C₄, -C(O)fenilo C₁-C₄, -C(O)haloalquilo C₁-C₄, -OC(O)alquilo C₁-C₄, -SO₂(alquilo C₁-C₄), -SO₂(fenilo), -SO₂(haloalquilo C₁-C₄), -SO₂NH₂, -SO₂NH(alquilo C₁-C₄), -SO₂NH(fenilo), -NHSO₂(alquilo C₁-C₄), -NHSO₂(fenilo) y -NHSO₂(haloalquilo C₁-C₄). Uno o más carbonos en el residuo acilo sustituido pueden estar sustituidos por nitrógeno, oxígeno o azufre, siempre y cuando el punto de unión al precursor permanezca en el carbonilo.

La expresión "alcoxi sustituido" se refiere a alcoxi en el que el componente alquilo está sustituido (es decir, -O-(alquilo sustituido)) en el que "alquilo sustituido" se refiere a alquilo en el que uno o más (hasta 5, tal como hasta 3) átomos de hidrógeno están sustituidos por un sustituyente seleccionado independientemente de entre:

-R^a, -OR^b, -O(alquilo C₁-C₂)O- (por ejemplo, metilenedioxi-), -SR^b, guanidina, guanidina en la que uno o más de los hidrógenos de la guanidina están sustituidos con un grupo alquilo inferior, -NR^bR^c, halo, ciano, nitro, -COR^b, -CO₂R^b, -CONR^bR^c, -OCOR^b, -OCO₂R^a, -OCONR^bR^c, -NR^cCOR^b, -NR^cCO₂R^a, -NR^cCONR^bR^c, -SOR^a, -SO₂R^a, -SO₂NR^bR^c y -NR^cSO₂R^a,

en el que R^a está seleccionado de entre alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido y heteroarilo opcionalmente sustituido;

R^b está seleccionado de entre H, alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido y heteroarilo opcionalmente sustituido; y R^c está seleccionado de entre hidrógeno y alquilo C₁-C₄ opcionalmente sustituido; en el que cada grupo opcionalmente sustituido no está sustituido o está sustituido independientemente

con uno o más, tal como uno, dos o tres, sustituyentes seleccionados independientemente de entre alquilo C₁-C₄, arilo, heteroarilo, aril-alquilo C₁-C₄, heteroaril-alquilo C₁-C₄, haloalquilo C₁-C₄, -Oalquilo C₁-C₄, -Oalquilfenilo C₁-C₄, -alquilo C₁-C₄-OH, -Ohaloalquilo C₁-C₄, halo, -OH, -NH₂, -alquilo C₁-C₄-NH₂, -N(alquilo C₁-C₄)(alquilo C₁-C₄), -NH(alquilo C₁-C₄), -N(alquilo C₁-C₄)(alquilfenilo C₁-C₄), -NH(alquilfenilo C₁-C₄), ciano, nitro, oxo (como sustituyente para cicloalquilo, heterocicloalquilo o heteroarilo), -CO₂H, -C(O)Oalquilo C₁-C₄, -CON(alquilo C₁-C₄)(alquilo C₁-C₄), -CONH(alquilo C₁-C₄), -CONH₂, -NHC(O)(alquilo C₁-C₄), -NHC(O)(fenilo), -N(alquilo C₁-C₄)C(O)(alquilo C₁-C₄), -N(alquilo C₁-C₄)C(O)(fenilo), -C(O)alquilo C₁-C₄, -C(O)fenilo C₁-C₄, -C(O)haloalquilo C₁-C₄, -OC(O)alquilo C₁-C₄, -SO₂(alquilo C₁-C₄), -SO₂(fenilo), -SO₂(haloalquilo C₁-C₄), -SO₂NH₂, -SO₂NH(alquilo C₁-C₄), -SO₂NH(fenilo), -NHSO₂(alquilo C₁-C₄), -NHSO₂(fenilo) y -NHSO₂(haloalquilo C₁-C₄). En algunas formas de realización, un grupo alcoxi sustituido es "polialcoxi" u -O-(alquileo opcionalmente sustituido)-(alcoxi opcionalmente sustituido), e incluye grupos tales como -OCH₂CH₂OCH₃, y residuos de éteres de glicol tales como polietilenglicol y -O(CH₂CH₂O)_xCH₃, en el que x es un número entero de 2-20, tal como 2-10, y por ejemplo, 2-5. Otro grupo alcoxi sustituido es hidroxialcoxi u -OCH₂(CH₂)_yOH, en el que y es un número entero de 1-10, tal como 1-4.

La expresión "alcoxicarbonilo sustituido" se refiere al grupo (alquilo sustituido)-OC(O)- en el que el grupo está unido al precursor a través de la funcionalidad carbonilo y en el que sustituido se refiere a alquilo en el que uno o más (hasta 5, tal como hasta 3) átomos de hidrógeno están sustituidos por un sustituyente seleccionado independientemente de entre:

-R^a, -OR^b, -O(alquilo C₁-C₂)O- (por ejemplo, metilenedioxi-), -SR^b, guanidina, guanidina en la que uno o más de los hidrógenos de la guanidina están sustituidos con un grupo alquilo inferior, -NR^bR^c, halo, ciano, nitro, -COR^b, -CO₂R^b, -CONR^bR^c, -OCOR^b, -OCO₂R^a, -OCONR^bR^c, -NR^cCOR^b, NR^cCO₂R^a, -NR^cCONR^bR^c, -CO₂R^b, -CONR^bR^c, -NR^cCOR^b, -SOR^a, -SO₂R^a, -SO₂NR^bR^c y -NR^cSO₂R^a,

5 en el que R^a está seleccionado de entre alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido y heteroarilo opcionalmente sustituido;

R^b está seleccionado de entre H, alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido y heteroarilo opcionalmente sustituido; y

R^c está seleccionado de entre hidrógeno y alquilo C₁-C₄ opcionalmente sustituido; o

10 R^b y R^c junto con el nitrógeno al que están unidos, forman un heterocicloalquilo que contiene nitrógeno de 5 a 7 miembros opcionalmente sustituido que incluye opcionalmente 1 ó 2 heteroátomos adicionales seleccionados de entre O, N y S en el anillo heterocicloalquilo;

en el que cada grupo opcionalmente sustituido no está sustituido o está sustituido independientemente con uno o más, tal como uno, dos o tres, sustituyentes seleccionados independientemente de entre alquilo C₁-C₄, arilo,

15 heteroarilo, aril-alquilo C₁-C₄, heteroaril-alquilo C₁-C₄, haloalquilo C₁-C₄, -Oalquilo C₁-C₄, -Oalquilfenilo C₁-C₄, -alquilo C₁-C₄-OH, -Ohaloalquilo C₁-C₄, halo, -OH, -NH₂, -alquilo C₁-C₄-NH₂, -N(alquilo C₁-C₄)(alquilo C₁-C₄), -NH(alquilo C₁-C₄), -N(alquilo C₁-C₄)(alquilfenilo C₁-C₄), -NH(alquilfenilo C₁-C₄), ciano, nitro, oxo (como sustituyente para cicloalquilo, heterocicloalquilo o heteroarilo), -CO₂H, -C(O)Oalquilo C₁-C₄, -CON(alquilo C₁-C₄)(alquilo C₁-C₄), -CONH(alquilo C₁-C₄), -CONH₂, -NHC(O)(alquilo C₁-C₄), -NHC(O)(fenilo), -N(alquilo C₁-C₄)C(O)(alquilo C₁-C₄), -N(alquilo C₁-C₄)C(O)(fenilo), -C(O)alquilo C₁-C₄, -C(O)fenilo C₁-C₄, -C(O)haloalquilo C₁-C₄, -OC(O)alquilo C₁-C₄, -SO₂(alquilo C₁-C₄), -SO₂(fenilo), -SO₂(haloalquilo C₁-C₄), -SO₂NH₂, -SO₂NH(alquilo C₁-C₄), -SO₂NH(fenilo), -NHSO₂(alquilo C₁-C₄), -NHSO₂(fenilo) y -NHSO₂(haloalquilo C₁-C₄).

25 La expresión "amino sustituido" se refiere al grupo -NHR^d o -NR^aR^d en el que cada R^d está seleccionado independientemente de entre: alquilo opcionalmente sustituido, cicloalquilo opcionalmente sustituido, acilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, heterocicloalquilo opcionalmente sustituido, alcoxicarbonilo, sulfinilo y sulfonilo, en el que alquilo, cicloalquilo, arilo, heterocicloalquilo y heteroarilo sustituido se refieren respectivamente a alquilo, cicloalquilo, arilo, heterocicloalquilo y heteroarilo en los que uno o más (hasta 5, tal como hasta 3) átomos de hidrógeno están sustituidos por un sustituyente seleccionado

30 independientemente de entre:

-R^a, -OR^b, -O(alquilo C₁-C₂)O- (por ejemplo, metilenedioxi-), -SR^b, guanidina, guanidina en la que uno o más de los hidrógenos de la guanidina están sustituidos con un grupo alquilo inferior, -NR^bR^c, halo, ciano, nitro, -COR^b, -CO₂R^b, -CONR^bR^c, -OCOR^b, -OCO₂R^a, -OCONR^bR^c, -NR^cCOR^b, -NR^cCO₂R^a, -NR^cCONR^bR^c, -CO₂R^b, -CONR^bR^c, -NR^cCOR^b, -SOR^a, -SO₂R^a, -SO₂NR^bR^c y -NR^cSO₂R^a,

35 en el que R^a está seleccionado de entre alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido y heteroarilo opcionalmente sustituido;

R^b está seleccionado de entre H, alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido y heteroarilo opcionalmente sustituido; y

40 R^c está seleccionado de entre hidrógeno y alquilo C₁-C₄ opcionalmente sustituido; o

R^b y R^c junto con el nitrógeno al que están unidos, forman un heterocicloalquilo que contiene nitrógeno de 5 a 7 miembros opcionalmente sustituido que incluye opcionalmente 1 ó 2 heteroátomos adicionales seleccionados de entre O, N y S en el anillo heterocicloalquilo;

en el que cada grupo opcionalmente sustituido no está sustituido o está sustituido independientemente con uno o más, tal como uno, dos o tres, sustituyentes seleccionados independientemente de entre alquilo C₁-C₄, arilo,

45 heteroarilo, aril-alquilo C₁-C₄, heteroaril-alquilo C₁-C₄, haloalquilo C₁-C₄, -Oalquilo C₁-C₄, -Oalquilfenilo C₁-C₄, -alquilo C₁-C₄-OH, -Ohaloalquilo C₁-C₄, halo, -OH, -NH₂, -alquilo C₁-C₄-NH₂, -N(alquilo C₁-C₄)(alquilo C₁-C₄), -NH(alquilo C₁-C₄), -N(alquilo C₁-C₄)(alquilfenilo C₁-C₄), -NH(alquilfenilo C₁-C₄), ciano, nitro, oxo (como sustituyente para cicloalquilo, heterocicloalquilo o heteroarilo), -CO₂H, -C(O)Oalquilo C₁-C₄, -CON(alquilo C₁-C₄)(alquilo C₁-C₄), -CONH(alquilo C₁-C₄), -CONH₂, -NHC(O)(alquilo C₁-C₄), -NHC(O)(fenilo), -N(alquilo C₁-C₄)C(O)(alquilo C₁-C₄), -N(alquilo C₁-C₄)C(O)(fenilo), -C(O)alquilo C₁-C₄, -C(O)fenilo C₁-C₄, -C(O)haloalquilo C₁-C₄, -OC(O)alquilo C₁-C₄, -SO₂(alquilo C₁-C₄), -SO₂(fenilo), -SO₂(haloalquilo C₁-C₄), -SO₂NH₂, -SO₂NH(alquilo C₁-C₄), -SO₂NH(fenilo), -NHSO₂(alquilo C₁-C₄), -NHSO₂(fenilo) y -NHSO₂(haloalquilo C₁-C₄), y

50 en el que el acilo, alcoxicarbonilo, sulfinilo y sulfonilo opcionalmente sustituido son como se definen en el presente documento.

55 Los compuestos de la invención incluyen, pero no se limitan a, isómeros ópticos, racematos y otras mezclas de los mismos. Además, los compuestos incluyen las formas Z y E (o formas *cis* y *trans*) de los compuestos con dobles enlaces carbono-carbono. En esas situaciones, los enantiómeros individuales o diastereómeros, es decir, las formas ópticamente activas, pueden obtenerse mediante síntesis asimétrica o por resolución de los racematos. La resolución de los racematos puede lograrse, por ejemplo, por métodos convencionales tales como cristalización en presencia de un agente de resolución, o cromatografía, utilizando, por ejemplo, una columna de cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC) quiral. Cuando los compuestos de Fórmula I existen en diversas formas tautómeras, las entidades químicas de la presente invención incluyen todas las formas tautómeras del compuesto.

65

Los compuestos de la invención también incluyen formas cristalinas y amorfas de los compuestos, incluidos, por ejemplo, polimorfos, pseudopolimorfos, solvatos, hidratos, polimorfos no solvatados (incluidos anhidratos), polimorfos conformacionales y formas amorfas de los compuestos, así como mezclas de los mismos. "Forma cristalina", "polimorfo" y "nueva forma" pueden utilizarse indistintamente en el presente documento, y pretenden incluir todas las formas cristalinas y amorfas del compuesto, incluidos, por ejemplo, polimorfos, pseudopolimorfos, solvatos, hidratos, polimorfos no solvatados (incluidos anhidratos), polimorfos conformacionales y formas amorfas, así como mezclas de los mismos, a menos que se haga referencia a una forma cristalina o amorfa concreta.

Las entidades químicas de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, compuestos y todas las formas farmacéuticamente aceptables de los mismos. Las formas farmacéuticamente aceptables de los compuestos mencionados en el presente documento incluyen quelatos, complejos no covalentes, profármacos, sales farmacéuticamente aceptables, y mezclas de los mismos. En determinadas formas de realización, los compuestos descritos en el presente documento están en forma de sales farmacéuticamente aceptables. Por lo tanto, las expresiones "entidad química" y "entidades químicas" también abarcan los quelatos, complejos no covalentes, profármacos, sales farmacéuticamente aceptables, y las mezclas.

"Sales farmacéuticamente aceptables" incluye, pero no se limita a, sales con ácidos inorgánicos, tales como clorhidrato, fosfato, difosfato, bromhidrato, sulfato, sulfinato, nitrato, y sales similares; así como sales con un ácido orgánico, tales como malato, maleato, fumarato, tartrato, succinato, citrato, acetato, lactato, metanosulfonato, p-toluensulfonato, 2-hidroxietilsulfonato, benzoato, salicilato, estearato y alcanoato, tales como acetato, $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$ en el que n es 0-4, y sales similares. De manera similar, los cationes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, sodio, potasio, calcio, aluminio, litio y amonio.

Además, si un compuesto se obtiene como una sal de adición de ácido, puede obtenerse la base libre basificando una solución de la sal de ácido. A la inversa, si el producto es una base libre, puede producirse una sal de adición, particularmente una sal de adición farmacéuticamente aceptable, disolviendo la base libre en un disolvente orgánico adecuado y tratando la solución con un ácido, según los procedimientos convencionales para preparar sales de adición de ácido a partir de compuestos básicos. Los expertos en la materia reconocerán diversas metodologías de síntesis que pueden utilizarse para preparar sales de adición farmacéuticamente aceptables no tóxicas.

El término "solvato" se refiere a la entidad química formada por la interacción de un disolvente y un compuesto. Los solvatos adecuados son solvatos farmacéuticamente aceptables, tales como hidratos, incluidos, por ejemplo, hemi-hidratos, monohidratos, dihidratos, trihidratos, etc.

La expresión "agente activo" se utiliza para indicar una entidad química que tiene actividad biológica. En determinadas formas de realización, un "agente activo" es un compuesto con utilidad farmacéutica.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" de una entidad química de la presente invención se refiere a una cantidad eficaz, cuando se administra a un paciente humano o no humano, para tratar una enfermedad, por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz puede ser una cantidad suficiente para tratar una enfermedad o trastorno sensible a la activación de la miosina. La cantidad terapéuticamente eficaz puede determinarse experimentalmente, por ejemplo, ensayando la concentración en sangre de la entidad química, o teóricamente, calculando la biodisponibilidad.

"Significativo" se refiere a cualquier cambio detectable que es estadísticamente significativo en un ensayo paramétrico convencional de significación estadística, tal como la t de Student, en la que $p < 0,05$.

"Paciente" se refiere a un animal, tal como un mamífero, por ejemplo un ser humano, que ha sido o será objeto de tratamiento, observación o experimentación. Los métodos de la invención pueden ser útiles tanto en el tratamiento de seres un ser humanos como en aplicaciones veterinarias. En algunas formas de realización, el paciente es un mamífero, y en algunas formas de realización el paciente es un ser humano.

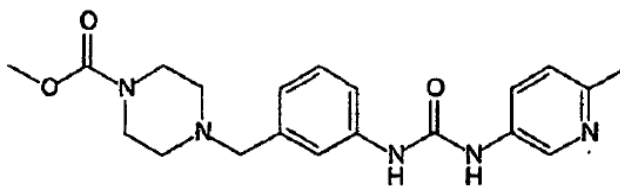
"Tratamiento" o "tratar" se refieren a cualquier tratamiento de una enfermedad en un paciente, incluidos:

- a) prevenir la enfermedad, es decir, hacer que no se desarrollen los síntomas clínicos de la enfermedad;
- b) inhibir la enfermedad;
- c) retrasar o detener el desarrollo de síntomas clínicos; y/o
- d) aliviar la enfermedad, es decir, provocar la regresión de los síntomas clínicos.

Los compuestos de la invención pueden denominarse y numerarse (por ejemplo, utilizando NamExpert™ disponible en Cheminnovation o la función de nomenclatura automática de ChemDraw Ultra versión 9.0 de Cambridge Soft Corporation) como se describe a continuación. Por ejemplo, el compuesto:

5

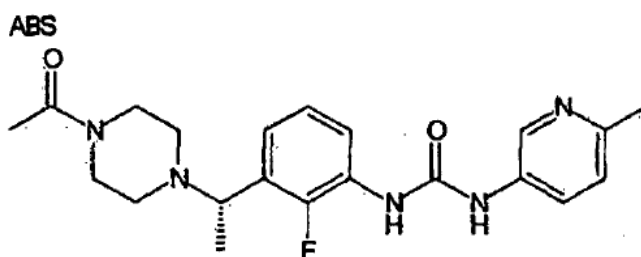
10



15 puede denominarse 4-[(3-[(6-metil-3-piridil)amino]carbonilamino)fenil]metil]piperacincarboxilato de metilo. Asimismo, el compuesto:

20

25

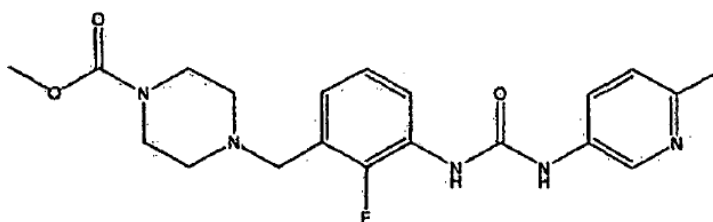


30

puede denominarse N-{3-[(1S)-1-(4-acetilpiperazinil)etil]-2-fluorofenil}[(6-metil(3-piridil))amino]carboxamida. Asimismo, el compuesto

35

40



45 puede denominarse éster metílico del ácido [3-fluoro-5-(3-piridin-3-il-ureido)-bencil]-metil-carbámico o 4-[(2-fluoro-3-[(6-metil(3-piridil))amino]carbonilamino)fenil]metil]piperacincarboxilato de metilo.

50 Las entidades químicas descritas en el presente documento pueden sintetizarse utilizando técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, como se ilustra más adelante con respecto a los Esquemas de Reacción.

55 A menos que se especifique lo contrario, las reacciones descritas en el presente documento tienen lugar a presión atmosférica, generalmente dentro de un intervalo de temperaturas de -10°C a 110°C. Además, salvo como se emplea en los Ejemplos o como se especifique de otra manera, las condiciones y los tiempos de reacción pretenden ser aproximados, por ejemplo, teniendo lugar a aproximadamente la presión atmosférica dentro de un intervalo de temperaturas de aproximadamente -10°C a aproximadamente 110°C durante un período de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 24 horas; las reacciones que se llevan a cabo durante toda la noche tienen un período medio de aproximadamente 16 horas.

60 El término "disolvente" y las expresiones "disolvente orgánico" o "disolvente inerte" se refieren a un disolvente inerte en las condiciones de la reacción que se describen junto con los mismos [incluidos, por ejemplo, benceno, tolueno, acetonitrilo, tetrahydrofurano ("THF"), dimetilformamida ("DMF"), cloroformo, cloruro de metileno (o diclorometano), éter dietílico, metanol, piridina y similares]. A menos que se especifique lo contrario, los disolventes utilizados en las reacciones de la presente invención son disolventes orgánicos inertes.

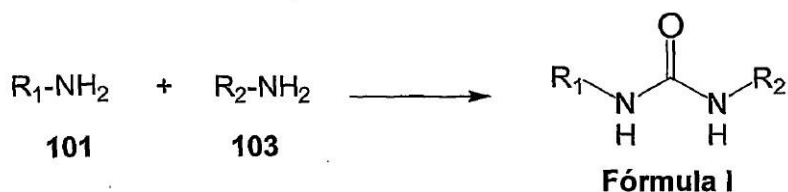
65 El aislamiento y la purificación de las entidades químicas y los productos intermedios descritos en el presente documento pueden lograrse, si se desea, mediante cualquier procedimiento de separación o purificación

adecuado tal como, por ejemplo, filtración, extracción, cristalización, cromatografía en columna, cromatografía en capa fina o cromatografía en capa gruesa, o una combinación de estos procedimientos. Pueden tenerse ilustraciones específicas de procedimientos de separación y aislamiento adecuados por referencia a los ejemplos que se presentan más adelante en el presente documento. Sin embargo, también pueden utilizarse otros procedimientos de separación o aislamiento equivalentes.

Cuando se desee, los isómeros (R) y (S) pueden resolverse por métodos conocidos para los expertos en la materia, por ejemplo por formación de complejos o sales diastereoisoméricas que pueden separarse, por ejemplo, por cristalización; a través de la formación de derivados diastereoisoméricos que pueden separarse, por ejemplo, por cristalización, cromatografía de líquidos o gas-líquido; reacción selectiva de un enantiómero con un reactivo específico de enantiómero, por ejemplo oxidación o reducción enzimática, seguido de separación de los enantiómeros modificados y no modificados; o cromatografía de líquidos o gas-líquido en un entorno quiral, por ejemplo sobre un soporte quiral, tal como sílice con un ligando quiral unido o en presencia de un disolvente quiral. Como alternativa, puede sintetizarse un enantiómero específico mediante síntesis asimétrica utilizando sustratos, catalizadores, disolventes o reactivos ópticamente activos, o convirtiendo un enantiómero en el otro por transformación asimétrica.

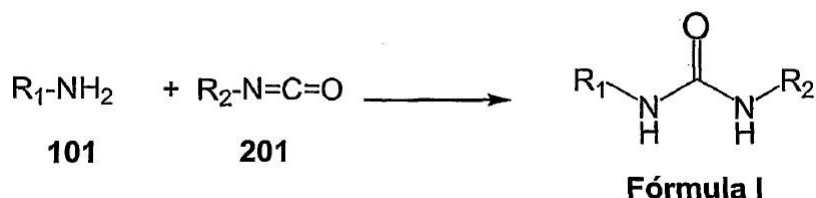
Muchos de los compuestos de partida opcionalmente sustituidos 101, 103, 201, 301 y otros reactivos están disponibles en el mercado, por ejemplo, en Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI) o pueden ser preparados fácilmente por los expertos en la materia utilizando la metodología de síntesis comúnmente empleada.

Esquema de Reacción 1



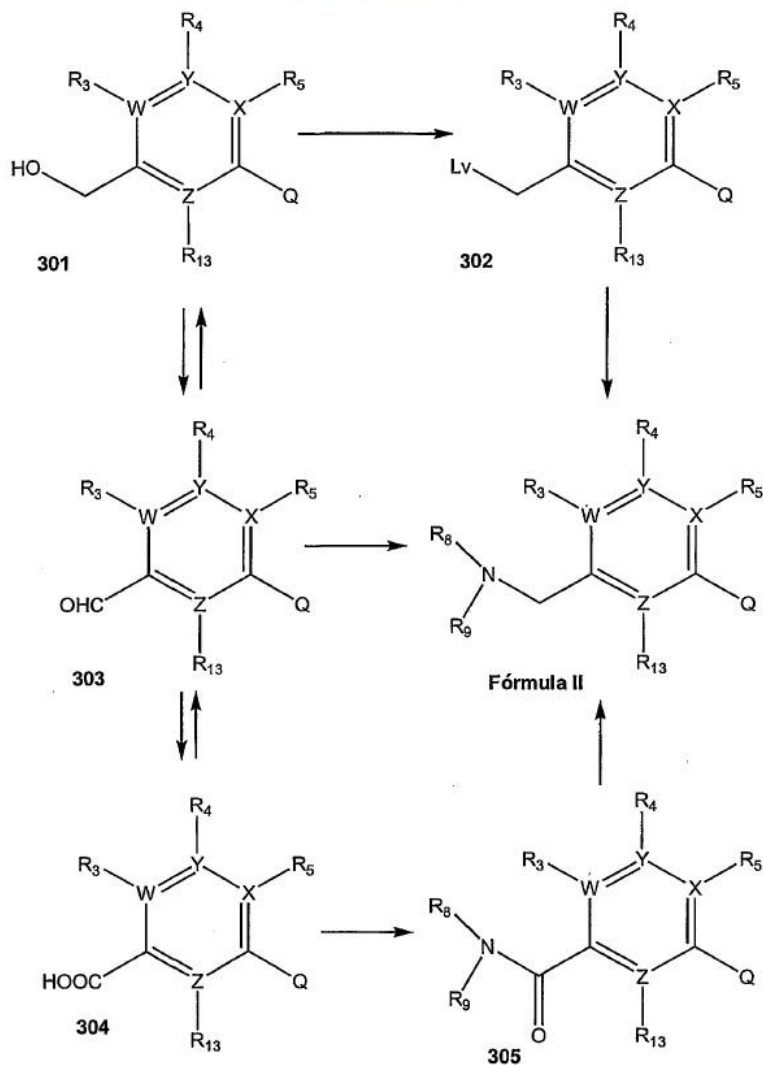
Preparación de compuestos de Fórmula I. Haciendo referencia al Esquema de Reacción 1, un matraz equipado con un agitador magnético, condensador de reflujo y pozo termométrico en atmósfera de nitrógeno, se carga con fosgeno o un equivalente de fosgeno (por lo general trifosgeno) y un disolvente no polar aprótico tal como diclorometano o tetrahidrofurano. Se añade, gota a gota, una solución de un compuesto de Fórmula 101 en un disolvente no polar aprótico tal como diclorometano o tetrahidrofurano, durante aproximadamente 10-60 minutos y se deja la solución en agitación entre 1 y 15 horas. Se añade en porciones un compuesto de Fórmula 103 y se agita la solución durante aproximadamente 10-60 min. Se añade, gota a gota, una base tal como DIEA durante aproximadamente una hora y se deja la solución en agitación durante aproximadamente 1-15 hr. Se aísla y purifica el producto, un compuesto de Fórmula 105.

ESQUEMA DE REACCIÓN 2



Preparación de compuestos de Fórmula I. El Esquema de Reacción 2 ilustra una síntesis alternativa de compuestos de Fórmula I. El isocianato de Fórmula 201 pueden formarse y aislarse de manera independiente a partir de la amina correspondiente (es decir, R_2-NH_2) utilizando fosgeno o un equivalente de fosgeno o del ácido carboxílico correspondiente (es decir, R_2-COOH) utilizando una transposición de Curtius o Hoffman. Se deja en agitación, durante 1 a 15 horas, una mezcla de compuestos de Fórmula 101 y 201 en un disolvente aprótico tal como diclorometano o tetrahidrofurano de $-40^\circ C$ a $110^\circ C$. Se aísla y purifica el producto, un compuesto de Fórmula I.

ESQUEMA DE REACCIÓN 3



Preparación de compuestos de Fórmula II. Haciendo referencia al Esquema de Reacción 3, el alcohol bencílico de fórmula 301 se convierte en un grupo saliente ("Lv" tal como halo, mesilato o triflato), 302 utilizando la metodología de síntesis comúnmente empleada (por ejemplo. véase: "Comprehensive Organic Transformation" LaRock, Richard C., 1989, editorial VCH, Inc. p. 353-365).

Se deja en agitación, durante 1 a 15 horas, una mezcla de un compuesto de Fórmula 302 y la amina de fórmula HNR_8R_9 en un disolvente aprótico tal como diclorometano o DMF de $-40^\circ C$ a $110^\circ C$. Se aísla y purifica el producto, un compuesto de Fórmula II.

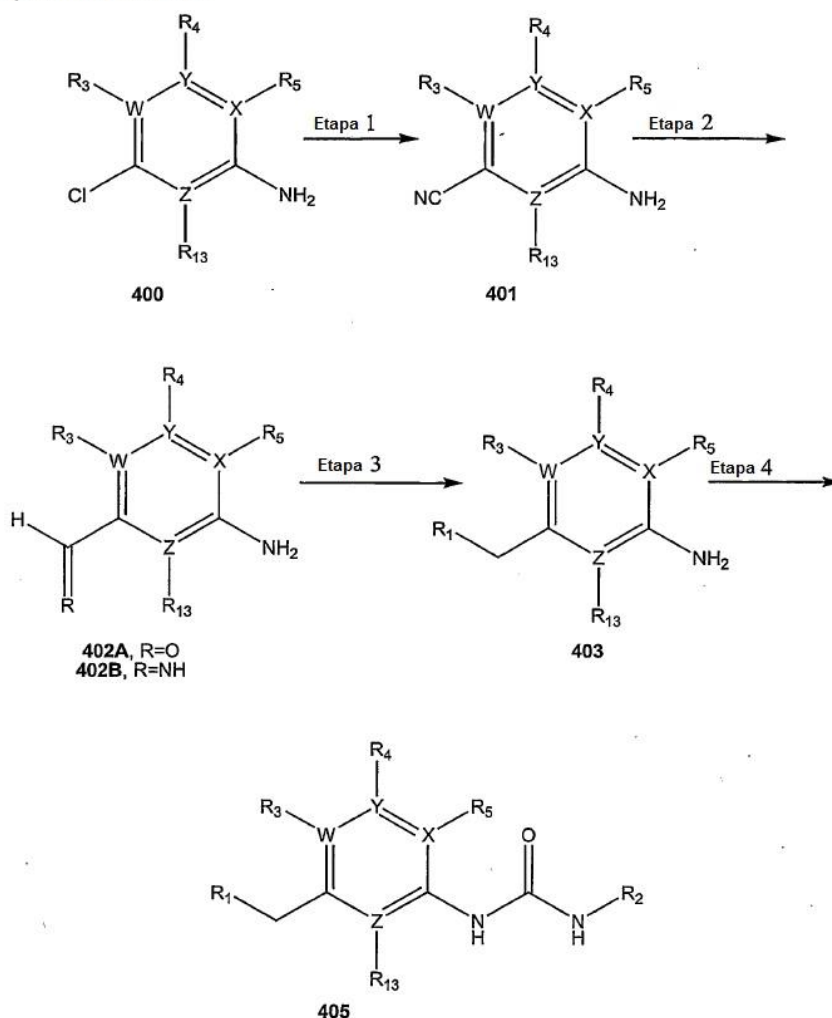
Como alternativa, el alcohol bencílico de Fórmula 301 se oxida al aldehído de Fórmula 303 utilizando la metodología de síntesis comúnmente empleada (véase por ejemplo: "Comprehensive Organic Transformation" LaRock, Richard C., 1989, editorial VCH, Inc. p. 604-615).

Se deja en agitación, durante 1 a 36 horas, una mezcla de un compuesto de Fórmula 303 y la amina de fórmula HNR_8R_9 en un disolvente tal como diclorometano con un agente reductor tal como triacetoxiborohidruro con o sin un ácido tal como ácido acético de $-40^\circ C$ a $110^\circ C$. Se aísla y purifica el producto, un compuesto de Fórmula II.

Como alternativa, el ácido carboxílico de Fórmula 304 se acopla a una amina utilizando la metodología de síntesis comúnmente empleada (por ejemplo, véase: "Comprehensive Organic Transformation" LaRock, Richard C., 1989, editorial VCH, Inc. p. 972-976) para formar la amida 305. La amida 305 se reduce a un compuesto de Fórmula II utilizando la metodología de síntesis comúnmente empleada, tal como tratando 305 con borano-sulfuro de dimetilo en THF de -40°C a reflujo durante 1-96 h.

Un compuesto de Fórmula II en el que Q es bromo, cloro, nitro, amino o un amino protegido puede convertirse en un compuesto de Fórmula 101 utilizando la metodología de síntesis comúnmente empleada. Por ejemplo, cuando Q es nitro, puede reducirse a la amina correspondiente utilizando hidrógeno con un catalizador de Pd/C.

Esquema de Reacción 4



Haciendo referencia al Esquema de Reacción 4, Etapa 1, a una solución de un compuesto de Fórmula 400 en NMP se añade un exceso (tal como aproximadamente al menos 2 equivalentes) de cianuro sódico y un exceso (tal como al menos 1 equivalente, por ejemplo, 1,35 equivalentes) de bromuro de níquel(II). Se añade NMP adicional, y la solución se calienta suavemente hasta aproximadamente 200°C y se agita durante aproximadamente 4 días. El producto, un compuesto de Fórmula 401, se aísla y opcionalmente se purifica.

A una solución -0°C de un compuesto de Fórmula 401 en un disolvente inerte tal como diclorometano, se añade, gota a gota, un exceso (tal como dos o más equivalentes) de un agente reductor, tal como DIBAL-H (tal como una solución 1 M de DIBAL-H), durante ~3,5 horas, manteniendo una temperatura de reacción interna ≤ 0°C. El producto, una mezcla de compuestos de Fórmula 402A y 402B, se aísla y opcionalmente se purifica.

Haciendo referencia al Esquema de Reacción 4, Etapa 3, a una solución de una mezcla de compuestos de Fórmula 402A y 402B en un disolvente inerte tal como THF, se añade en porciones un exceso (tal como aproximadamente 1,05 equivalentes) de un compuesto de fórmula R₁-H en el que R₁ es amino opcionalmente

sustituido o heterocicloalquilo opcionalmente sustituido y un exceso (tal como aproximadamente 1,5 equivalentes) de un agente reductor tal como triacetoxiborohidruro, durante ~40 min, manteniendo una temperatura de reacción interna por debajo de aproximadamente 45°C. El producto, un compuesto de Fórmula 403, se aísla y opcionalmente se purifica.

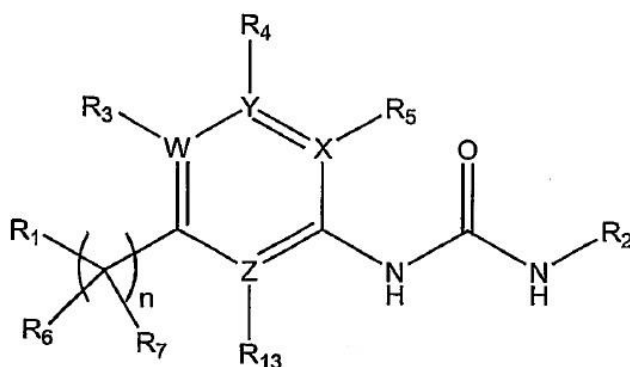
Haciendo referencia al Esquema de Reacción 4, Etapa 4, a una solución de un compuesto de Fórmula 403 en un disolvente tal como acetona, se añade gota a gota aproximadamente un equivalente de un compuesto de fórmula $R_2\text{-NCO}$. Se agita la reacción durante aproximadamente una hora y, opcionalmente, se calienta a reflujo. El producto, un compuesto de Fórmula 405, se aísla y opcionalmente se purifica.

Se coloca opcionalmente una mezcla racémica en una columna de cromatografía y se separa en los enantiómeros (R) y (S).

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

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

Determinadas formas de realización de la invención incluyen o emplean los compuestos de Fórmula I que tienen las siguientes combinaciones y permutaciones de grupos sustituyentes. Estos se presentan para apoyar otras combinaciones y permutaciones de grupos sustituyentes, que en aras de la brevedad no se han descrito específicamente en el presente documento, pero que debe entenderse quedan comprendidos dentro de las enseñanzas de la presente descripción.



Fórmula I

y quelatos, complejos no covalentes, profármacos, sales farmacéuticamente aceptables, y mezclas de los mismos, en el que

W, X, Y y Z son independientemente -C= o -N=, siempre que no más de dos de W, X, Y y Z sean -N=; n es uno, dos o tres;

R₁ es amino opcionalmente sustituido o heterocicloalquilo opcionalmente sustituido;

R₂ es arilo opcionalmente sustituido, aralquilo opcionalmente sustituido; cicloalquilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, heteroaralquilo opcionalmente sustituido o heterocicloalquilo opcionalmente sustituido,

R₃ es hidrógeno, halo, ciano, alquilo opcionalmente sustituido, heterocicloalquilo opcionalmente sustituido o heteroarilo opcionalmente sustituido cuando W es -C=, y R₃ está ausente cuando W es -N=;

R₄ es hidrógeno, halo, ciano, alquilo opcionalmente sustituido, heterocicloalquilo opcionalmente sustituido o heteroarilo opcionalmente sustituido cuando Y es -C=, y R₄ está ausente cuando Y es -N=; y

R₅ es hidrógeno, halo, ciano, alquilo opcionalmente sustituido, heterocicloalquilo opcionalmente sustituido o heteroarilo opcionalmente sustituido cuando X es -C=, y R₅ está ausente cuando X es -N=;

R₁₃ es hidrógeno, halo, ciano, hidroxilo, alquilo opcionalmente sustituido, heterocicloalquilo opcionalmente sustituido o heteroarilo opcionalmente sustituido cuando Z es -C=, y R₁₃ está ausente cuando Z es -N=; y

R₆ y R₇ son independientemente hidrógeno, aminocarbonilo, alcocarbonilo, alquilo opcionalmente sustituido o alcoxi opcionalmente sustituido, o R₆ y R₇, junto con el carbono al que están unidos, forman un anillo de 3 a 7 miembros opcionalmente sustituido que incorpora opcionalmente uno o dos heteroátomos adicionales, seleccionados de entre N, O y S en el anillo.

En determinadas formas de realización uno de W, X, Y y Z es -N=.

En determinadas formas de realización, W, X, Y y Z son -C=.

En determinadas formas de realización, R₁ es -NR₈R₉ en el que R₈ es alquilo inferior y R₉ es alquilo opcionalmente sustituido, heterocicloalquilo opcionalmente sustituido, acilo opcionalmente sustituido o sulfonilo opcionalmente sustituido.

En determinadas formas de realización, R₈ es metilo o etilo.

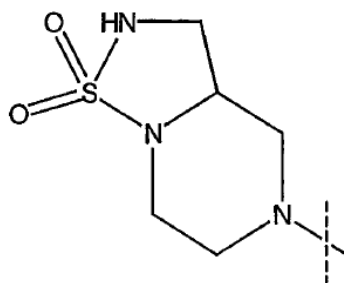
En determinadas formas de realización, R₉ es -(CO)OR₁₀ en el que R₁₀ es hidrógeno o alquilo inferior (tal como metilo o etilo). En determinadas formas de realización, R₁₀ es hidrógeno, metilo o etilo.

En determinadas formas de realización, R₉ es -(SO₂)-R₁₇ en el que R₁₇ es alquilo inferior o -NR₁₁R₁₂ en el que R₁₁ y R₁₂ son independientemente hidrógeno o alquilo inferior (tal como metilo o etilo).

En determinadas formas de realización, R₉ es alquilo opcionalmente sustituido con amino opcionalmente sustituido.

En determinadas formas de realización, R₉ es heterocicloalquilo opcionalmente sustituido.

En determinadas formas de realización, R₁ está seleccionado de entre piperazinilo opcionalmente sustituido; 1,1-dioxo-1λ⁶-[1,2,5]tiadiazolidin-2-ilo opcionalmente sustituido; 3-oxo-tetrahydro-pirrolol[1,2-c]oxazol-6-ilo opcionalmente sustituido, 2-oxo-imidazolidin-1-ilo opcionalmente sustituido; morfolinilo opcionalmente sustituido; 1,1-dioxo-1λ⁶-tiomorfolin-4-ilo opcionalmente sustituido; pirrolidin-1-ilo opcionalmente sustituido; piperidina-1-ilo opcionalmente sustituido, azepanilo opcionalmente sustituido, 1,4-diazepanilo opcionalmente sustituido, 3-oxo-tetrahydro-1H-oxazol[3,4-a]pirazin-3(5H)-ona opcionalmente sustituida, 5,6,7,8-tetrahydro-[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazinilo opcionalmente sustituido, y



opcionalmente sustituido.

En determinadas formas de realización, R₁ es piperazinilo sustituido; piperidina-1-ilo opcionalmente sustituido, pirrolidin-1-ilo opcionalmente sustituido, azepanilo opcionalmente sustituido o 1,4-diazepanilo opcionalmente sustituido. En determinadas formas de realización, R₁ es piperazinilo opcionalmente sustituido. En determinadas formas de realización, R₁ es piperidinilo opcionalmente sustituido.

En determinadas formas de realización, R₂ es arilo opcionalmente sustituido o heteroarilo opcionalmente sustituido. En determinadas formas de realización, R₂ es fenilo opcionalmente sustituido, naftilo opcionalmente sustituido, pirrolilo opcionalmente sustituido, tiazolilo opcionalmente sustituido, isoxazolilo opcionalmente sustituido, pirazolilo opcionalmente sustituido, oxazolilo opcionalmente sustituido, 1,3,4-oxadiazolilo opcionalmente sustituido, piridinilo opcionalmente sustituido, pirazinilo opcionalmente sustituido, pirimidinilo opcionalmente sustituido y piridazinilo opcionalmente sustituido.

En determinadas formas de realización, R₂ está seleccionado de entre piridin-3-ilo, piridin-4-ilo, piridin-1-óxido, fenilo, pirimidin-5-ilo e isoxazol-3-ilo, en el que cada piridin-3-ilo, piridin-4-ilo, piridin-1-óxido, fenilo, pirimidin-5-ilo e isoxazol-3-ilo está opcionalmente sustituido con alquilo inferior, alcoxi inferior, halo (tal como fluoro o cloro), ciano o acetilo. En determinadas formas de realización, R₂ es piridin-3-ilo, que está opcionalmente sustituido con alquilo inferior; R₂ es piridin-4-ilo que está opcionalmente sustituido con alquilo inferior; fenilo que está opcionalmente sustituido con halo; pirimidin-5-ilo opcionalmente sustituido; o isoxazol-3-ilo opcionalmente sustituido. En determinadas formas de realización, R₂ es piridin-3-ilo; 6-metil-piridin-3-ilo; 6-ciano-piridin-3-ilo; 6-acetil-piridin-3-ilo; 6-trifluorometil-piridin-3-ilo; piridin-4-ilo; 2-metil-piridin-4-ilo; fenilo; 4-fluorofenilo; 4-clorofenilo; o 5-metil-isoxazol-3-ilo.

En determinadas formas de realización, n es uno. En determinadas formas de realización, n es dos. En determinadas formas de realización, n es tres

En determinadas formas de realización, R_6 y R_7 son independientemente hidrógeno, aminocarbonilo, alcóxicarbonilo, alquilo opcionalmente sustituido o alcoxi opcionalmente sustituido, o R_6 y R_7 , junto con el carbono al que están unidos, forman un anillo de 3 a 7 miembros opcionalmente sustituido que incorpora opcionalmente uno o dos heteroátomos adicionales, seleccionados de entre N, O y S en el anillo.

En determinadas formas de realización, R_6 y R_7 son independientemente hidrógeno o metilo. En determinadas formas de realización, R_6 y R_7 son independientemente hidrógeno. En determinadas formas de realización, n es uno y R_6 y R_7 son independientemente hidrógeno o metilo. En determinadas formas de realización, n es uno y R_6 es metilo y R_7 es hidrógeno. En determinadas formas de realización, n es dos y cada R_6 y R_7 es hidrógeno. En determinadas formas de realización, n es tres y cada R_6 y R_7 es hidrógeno.-metil-isoxazol-3-ilo.

En determinadas formas de realización, R_3 es hidrógeno, ciano, alquilo inferior (tal como metilo o etilo) o halo (tal como cloro o fluoro). En determinadas formas de realización, R_3 es hidrógeno o fluoro.

En determinadas formas de realización, R_4 es hidrógeno, piridinilo, halo o alquilo inferior opcionalmente sustituido. En determinadas formas de realización, R_4 es hidrógeno, piridinilo, trifluorometilo o fluoro.

En determinadas formas de realización, R_5 es hidrógeno, piridinilo, halo o alquilo inferior opcionalmente sustituido. En determinadas formas de realización, R_5 es hidrógeno, cloro, fluoro, metilo o trifluorometilo.

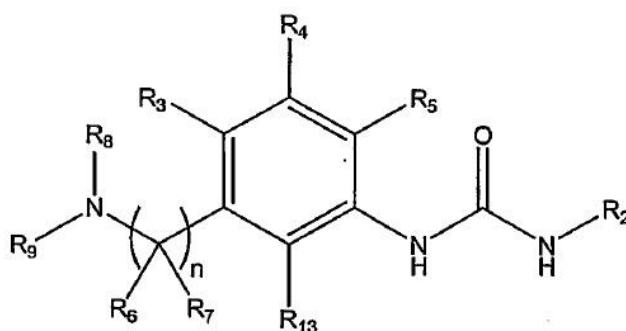
En determinadas formas de realización, R_{13} es hidrógeno, alquilo inferior (tal como metilo o etilo), hidroxilo o halo. hidrógeno, halógeno, hidroxilo o alquilo inferior. En determinadas formas de realización, R_{13} es hidrógeno o fluoro.

En determinadas formas de realización, R_3 , R_4 , R_5 y R_{13} son hidrógeno. En determinadas formas de realización, uno de R_3 , R_4 , R_5 y R_{13} no es hidrógeno.

En determinadas formas de realización, uno de R_3 , R_4 , R_5 y R_{13} es halo, alquilo inferior opcionalmente sustituido o ciano y los demás son hidrógeno. En determinadas formas de realización uno de R_3 , R_4 , R_5 y R_{13} es halo, metilo o ciano y los demás son hidrógeno. En determinadas formas de realización dos de R_3 , R_4 , R_5 y R_{13} son halo o ciano y los demás son hidrógeno.

En determinadas formas de realización, uno de R_3 , R_4 , R_5 y R_{13} es fluoro y los demás son hidrógeno. En determinadas formas de realización, uno de R_3 , R_4 , R_5 y R_{13} es ciano y los demás son hidrógeno. En determinadas formas de realización, dos de R_3 , R_4 , R_5 y R_{13} no son hidrógeno. En determinadas formas de realización, dos de R_3 , R_4 , R_5 y R_{13} son halo y los demás son hidrógeno. En determinadas formas de realización, dos de R_3 , R_4 , R_5 y R_{13} son fluoro y los demás son hidrógeno.

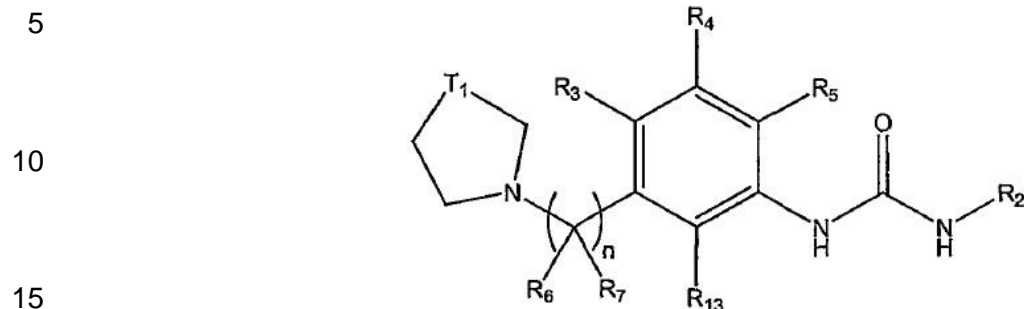
En determinadas formas de realización, la entidad química de Fórmula I está seleccionada de una entidad química de Fórmula Ib



Fórmula Ib

en la que R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 , R_9 , R_{13} y n son como se describen para los compuestos de Fórmula 1.

En determinadas formas de realización, la entidad química de Fórmula I está seleccionada de una entidad química de Fórmula Ic



Fórmula Ic

20 en la que R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , R_{13} y n son como se ha descrito para los compuestos de Fórmula 1 y en la que T_1 es $-\text{CHR}_{14}-$, $-\text{NR}_{15}\text{CHR}_{14}-$, $-\text{CHR}_{14}\text{NR}_{15}-$ o $-\text{CHR}_{14}\text{CHR}_{14}-$; y

25 cada R_{14} y R_{15} está seleccionado independientemente de entre hidrógeno, alquilo opcionalmente sustituido, acilo opcionalmente sustituido, carboxi, alcoxicarbonilo inferior opcionalmente sustituido, aminocarbonilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, cicloalcoxi opcionalmente sustituido, sulfonilo opcionalmente sustituido, amino opcionalmente sustituido, cicloalquilo opcionalmente sustituido y heterocicloalquilo opcionalmente sustituido.

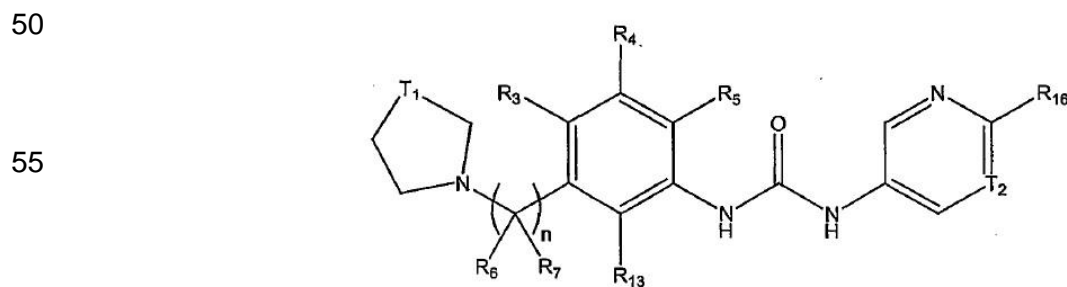
30 En determinadas formas de realización, T_1 es $-\text{NR}_{15}\text{CHR}_{14}-$, es decir, R_1 es un anillo piperazinilo sustituido con R_{14} y R_{15} . En determinadas formas de realización, T_1 es $-\text{CHR}_{14}\text{CHR}_{14}-$.

35 En determinadas formas de realización, R_{14} y R_{15} están seleccionados independientemente de entre hidrógeno, metilo, carboxi, metoxicarbonilo, etoxicarbonilo, propoxicarbonilo, isopropoxicarbonilo, *terc*-butoxicarbonilo, benciloxicarbonilo, N,N-dimetilcarbamoilo, acetilo, propionilo, isobutirilo, propoxi, metoxi, ciclohexilmetiloxi, metilsulfonilo, etilsulfonilo, n-propilsulfonilo, isopropilsulfonilo, azetidín-1-il-sulfonilo, dimetilamino sulfonilo, metanosulfonamido, N-metil-metanosulfonamido, etanosulfonamido, N-metil-etanosulfonamido, N-metoxicarbonil-N-metilamino, N-etoxicarbonil-N-metilamino, N-isopropoxicarbonil-N-metilamino, N-*terc*-butoxicarbonil-N-metilamino, acetamido, N-metilacetamido, N-metilpropionamido, N-metilisobutiramido, amino, metilamino, dimetilamino, N-metil-(dimetilaminosulfonil)amino y piperidín-1-ilo.

40 En determinadas formas de realización, R_{14} está seleccionado de entre hidrógeno, metilo y metoximetilo.

45 En determinadas formas de realización, R_{15} está seleccionado de entre acilo opcionalmente sustituido, alcoxicarbonilo inferior opcionalmente sustituido y sulfonilo opcionalmente sustituido. En determinadas formas de realización, R_{15} está seleccionado de entre alcoxicarbonilo inferior, alquilsulfonilo inferior y aminosulfonilo opcionalmente sustituido.

En determinadas formas de realización, la entidad química de Fórmula I es una entidad química de Fórmula Id:



Fórmula Id

65 en la que T_1 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , R_{13} y n son como se describen para los compuestos de Fórmula 1c y en la que T_2 es $-\text{C}=\text{C}-$ o $-\text{N}=\text{N}-$; y R_{16} está seleccionado de entre hidrógeno, halo, ciano, acilo opcionalmente sustituido, alquilo opcionalmente sustituido y alcoxi opcionalmente sustituido.

- En determinadas formas de realización, T₂ es -C=.
- En determinadas formas de realización, T₂ es -N=.
- En determinadas formas de realización, R₁₆ está seleccionado de entre hidrógeno, metilo, fluoro, ciano, metoxi y acetilo. En determinadas formas de realización, R₁₆ es hidrógeno o metilo.
- 5 En determinadas formas de realización,
W, X, Y y Z son -C=;
n es uno, dos o tres;
R₁ es -NR₈R₉ en el que R₈ es alquilo inferior y R₉ es acilo opcionalmente sustituido o sulfonilo opcionalmente sustituido;
- 10 R₂ es piridin-3-ilo que está opcionalmente sustituido con alquilo inferior; fenilo que está opcionalmente sustituido con halo (tal como fluoro); pirimidin-5-ilo opcionalmente sustituido; o isoxazol-3-ilo opcionalmente sustituido;
R₃ es hidrógeno o fluoro;
R₄ es hidrógeno, piridinilo o fluoro;
R₅ es hidrógeno o fluoro;
- 15 R₆ y R₇ son independientemente hidrógeno o metilo; y
R₁₃ es hidrógeno o fluoro.
En determinadas formas de realización,
W, X, Y y Z son -C=;
n es uno, dos o tres;
- 20 R₁ es -NR₈R₉ en el que R₈ es alquilo inferior y R₉ es acilo opcionalmente sustituido o sulfonilo opcionalmente sustituido;
R₂ es piridin-3-ilo que está opcionalmente sustituido con alquilo inferior; fenilo que está opcionalmente sustituido con halo (tal como fluoro); pirimidin-5-ilo opcionalmente sustituido; o isoxazol-3-ilo opcionalmente sustituido;
R₃ es hidrógeno o fluoro;
- 25 R₄ es hidrógeno, piridinilo o fluoro;
R₅ es hidrógeno o fluoro;
R₆ y R₇ son independientemente hidrógeno o metilo; y
R₁₃ es hidrógeno o fluoro,
en las que
- 30 uno de R₃, R₄ y R₅ no es hidrógeno.
En determinadas formas de realización,
W, X, Y y Z son -C=;
n es uno, dos o tres;
- 35 R₁ es un heterociclo que contiene nitrógeno de 5 a 7 miembros opcionalmente sustituido que incluye opcionalmente un oxígeno, nitrógeno o azufre adicional en el anillo heterocíclico;
R₂ es piridin-3-ilo que está opcionalmente sustituido con alquilo inferior; fenilo que está opcionalmente sustituido con halo (tal como fluoro); pirimidin-5-ilo opcionalmente sustituido; o isoxazol-3-ilo opcionalmente sustituido.
R₃ es hidrógeno o fluoro;
R₄ es hidrógeno, piridinilo o fluoro;
- 40 R₅ es hidrógeno o fluoro;
R₆ y R₇ son independientemente hidrógeno o metilo; y
R₁₃ es hidrógeno o fluoro.
En determinadas formas de realización,
W, X, Y y Z son -C=;
- 45 n es uno, dos o tres;
R₁ es un heterociclo que contiene nitrógeno de 5 a 7 miembros opcionalmente sustituido que incluye opcionalmente un oxígeno, nitrógeno o azufre adicional en el anillo heterocíclico.
En determinadas formas de realización, el compuesto es:
- 50 4-[(2-fluoro-3-[(6-metil(3-piridil)amino)carbonilamino]fenil)metil]piperazincarboxilato de metilo;
4-[(3-fluoro-5-[(6-metil(3-piridil)amino)carbonilamino]fenil)metil]piperazincarboxilato de metilo;
- 55 4-[(3-[(6-metil(3-piridil)amino)carbonilamino]fenil)metil]piperazincarboxilato de metilo;
4-[(4-fluoro-3-[(6-metil(3-piridil)amino)carbonilamino]fenil)metil]piperazincarboxilato de etilo;
- 60 4-[(1S)-1-(5-fluoro-3-[(6-metil(3-piridil)amino)carbonilamino]fenil)etil]piperazincarboxilato de metilo;
N- {3-[(1S)-1-(4-acetilpiperazinil)etil]-2-fluorofenil}[(6-metil(3-piridil)amino)carboxamida;

Las entidades químicas descritas en el presente documento son selectivas para el sarcómero cardíaco y lo modulan, y son útiles para unirse a la miosina cardíaca y/o potenciar su actividad, aumentando la velocidad a la que la miosina hidroliza el ATP. Tal como se utiliza en este contexto, "modular" se refiere a aumentar o disminuir la actividad de la miosina, mientras que "potenciar" se refiere a aumentar la actividad. También se ha determinado en

el ensayo de los compuestos representativos de la invención que su administración también puede aumentar la fuerza contráctil en la fibra del músculo cardíaco.

5 Las entidades químicas, composiciones farmacéuticas y entidades químicas y composiciones farmacéuticas para su uso en los métodos de la invención se utilizan para tratar cardiopatías, incluidas pero no limitadas a: la insuficiencia cardíaca congestiva aguda (o descompensada) y la insuficiencia cardíaca congestiva crónica; particularmente las enfermedades asociadas con la disfunción cardíaca sistólica. Las utilidades terapéuticas adicionales incluyen la administración para estabilizar la función cardíaca en pacientes que esperan un trasplante de corazón, y ayudar a un corazón parado o ralentizado a reanudar su función normal después del uso de una bomba de CEC.

10 La hidrólisis de ATP es empleada por la miosina en el sarcómero para producir fuerza. Por lo tanto, un aumento de la hidrólisis de ATP se correspondería con un aumento de la fuerza o la velocidad de la contracción muscular. En presencia de actina, la actividad ATPasa de la miosina se estimula > 100 veces. Por lo tanto, la hidrólisis de ATP no sólo mide la actividad enzimática de la miosina, sino también su interacción con el filamento de actina. Puede identificarse un compuesto que module el sarcómero cardíaco por un aumento o disminución de la velocidad de hidrólisis del ATP por la miosina, presentando en determinadas formas de realización un aumento de 1,4 veces a concentraciones inferiores a 10 μM (tal como inferior a 1 μM). Los ensayos para tal actividad pueden emplear miosina de una fuente humana, aunque suele utilizarse miosina de otros organismos. También se utilizan sistemas que simulan el papel regulador del calcio en la unión de la miosina al filamento fino decorado.

15 Como alternativa, puede utilizarse una preparación de sarcómero bioquímicamente funcional para determinar la actividad ATPasa *in vitro*, por ejemplo, como se describe en el documento de EE.UU. con número de serie 09/539.164, presentado el 29 de marzo de 2000. Puede reconstituirse el comportamiento bioquímico funcional del sarcómero, incluida la sensibilidad al calcio de la hidrólisis por la ATPasa, combinando sus componentes individuales purificados (incluidos particularmente sus componentes reguladores y la miosina). Otra preparación funcional es el ensayo de motilidad *in vitro*. Puede realizarse añadiendo compuesto de ensayo a un portaobjetos con miosina unida y observando la velocidad de los filamentos de actina que se deslizan sobre la superficie de vidrio cubierta con miosina (Kron SJ. (1991) *Methods Enzymol.* 196:399-416).

20 La velocidad de hidrólisis de ATP *in vitro* se correlaciona con la actividad potenciadora de la miosina, que puede determinarse monitorizando la producción de ADP o de fosfato, por ejemplo como se describe en el documento con número de serie 09/314.464, presentado el 18 de mayo de 1999. También puede monitorizarse la producción de ADP acoplado a la producción de ADP a la oxidación de NADH (usando las enzimas piruvato quinasa y lactato deshidrogenasa) y monitorizando el nivel de NADH mediante absorbancia o fluorescencia (Greengard, P., *Nature* 178 (parte 4534): 632-634 (1956); *Mol Pharmacol* 1970, enero; 6(1):31-40). Puede monitorizarse la producción de fosfato utilizando purina nucleósido fosforilasa para acoplar la producción de fosfato a la escisión de un análogo de purina, que da como resultado un cambio en la absorbancia (*Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 1 de junio; 89(11):4884-7) o fluorescencia (*Biochem J*, 1990, 1 de marzo; 266(2):611-4). Aunque puede emplearse una sola medición, generalmente se tomarán múltiples mediciones de la misma muestra en diferentes momentos para determinar la velocidad absoluta de la actividad de la proteína; tales mediciones tienen mayor especificidad particularmente en presencia de compuestos de ensayo con propiedades de absorbancia o fluorescencia similares a las de la lectura enzimática.

25 Los compuestos de ensayo pueden ensayarse de manera masivamente paralela utilizando placas de múltiples pocillos colocando los compuestos individualmente en los pocillos o ensayándolos en mezclas. A continuación, pueden añadirse a los pocillos los componentes del ensayo, incluidos el complejo de proteína diana, las enzimas de acoplamiento y los sustratos, y el ATP, y pueden medirse la absorbancia o la fluorescencia de cada pocillo de la placa con un lector de placas.

30 Un método utiliza un formato de placa de 384 pocillos y un volumen de reacción de 25 μl . Se utiliza un sistema de enzimas acopladas piruvato quinasa/lactato deshidrogenasa (Huang TG y Hackney DD. (1994) *J Biol Chem* 269(23):16493-16501) para medir la velocidad de hidrólisis de ATP en cada pocillo. Como entenderán los expertos en la materia, los componentes de ensayo se añaden en tampones y reactivos. Dado que los métodos esbozados en el presente documento permiten mediciones cinéticas, se optimizan los períodos de incubación para proporcionar señales de detección adecuadas sobre el fondo. El ensayo se realiza en tiempo real dando la cinética de la hidrólisis de ATP, lo que aumenta la relación señal-ruido del ensayo.

35 La fuerza contráctil y/o la modulación de la ATPasa de la fibra muscular cardíaca también pueden medirse utilizando fibras cardíacas permeabilizadas con detergente (también denominadas fibras cardíacas sin membrana) o miofibrillas (fragmentos musculares subcelulares), por ejemplo, como describen Haikala H, *et al.* (1995) *J Cardiovasc Pharmacol* 25(5):794-801. Las fibras cardíacas sin membrana conservan su organización sarcomérica intrínseca, pero no conservan todos los aspectos del ciclo del calcio celular, este modelo ofrece dos ventajas: en primer lugar, la membrana celular no es una barrera para la penetración del compuesto, y en segundo lugar, se controla la concentración de calcio. Por lo tanto, cualquier aumento de la fuerza contráctil o de ATPasa es una medida directa del efecto del compuesto de ensayo sobre las proteínas sarcoméricas. Las mediciones de ATPasa se realizan

utilizando métodos como los descritos anteriormente. Las mediciones de la tensión se realizan fijando un extremo de la fibra muscular a un soporte fijo y el otro extremo a un transductor que puede medir la fuerza. Después de estirar la fibra para eliminar la laxitud, el transductor de fuerza registra el aumento de la tensión a medida que la fibra comienza a contraerse. Esta medición se denomina tensión isométrica, ya que no se permite a la fibra acortarse. La activación de la fibra muscular permeabilizada se logra colocándola en una solución tamponada de calcio, seguido de adición del compuesto de ensayo o control. Al ensayarse de esta manera, las entidades químicas descritas en el presente documento provocaron un aumento de la fuerza a concentraciones de calcio asociadas con la actividad contráctil fisiológica, pero muy poco aumento de la fuerza en el tampón de relajación a concentraciones bajas de calcio o en ausencia de calcio (el punto de datos con EGTA).

Puede determinarse la selectividad para el sarcómero cardíaco y la miosina cardíaca sustituyendo la miosina y los componentes del sarcómero no cardíacos en uno o más de los ensayos descritos anteriormente y comparando los resultados obtenidos con los obtenidos utilizando los equivalentes cardíacos.

La capacidad de una entidad química para aumentar la velocidad de la ATPasa observada en una miofibrilla o ensayo de sarcómero reconstituido *in vitro* podría ser el resultado del aumento de la tasa de renovación de la miosina S1 o, como alternativa, del aumento de la sensibilidad a la activación por Ca^{++} de un filamento de actina decorado. Para distinguir entre estos dos posibles modos de acción, se mide inicialmente el efecto de la entidad química sobre la actividad ATPasa de S1 con los filamentos de actina no decorados. Si se observa un aumento de la actividad, podría refutarse el efecto de la entidad química en el aparato regulador sensible a Ca. Puede emplearse un segundo ensayo, más sensible, para identificar entidades químicas cuyo efecto activador sobre la miosina S1 se potencia en presencia de una actina decorada (en comparación con los filamentos de actina puros). En este segundo ensayo se comparan las actividades de la S1 cardíaca y la S1 esquelética sobre los filamentos de actina regulados cardíacos y esqueléticos (en las 4 permutaciones).

Puede determinarse la evaluación inicial de la actividad *in vivo* en modelos celulares de contractilidad de los miocitos, por ejemplo, como describen Popping S, *et al.* ((1996) Am. J. Physiol. 271: H357-H364) y Wolska BM, *et al.* ((1996) Am. J. Physiol. 39: H24-H32). Una de las ventajas del modelo de miocitos es que pueden aislarse los sistemas componentes que dan como resultado cambios en la contractilidad y determinarse el(los) sitio(s) principal(es) de la acción. A continuación, pueden evaluarse las entidades químicas con actividad celular (por ejemplo, seleccionando entidades químicas con el siguiente perfil: aumento >120% en el acortamiento fraccional sobre el valor basal en 2 μ M, o dar como resultado cambios en la longitud diastólica (<5% de cambio)), en modelos de órganos completos, tal como el modelo de corazón aislado (Langendorff) de la función cardíaca, *in vivo* mediante ecocardiografía o medidas hemodinámicas invasivas, y en modelos de insuficiencia cardíaca en animales, tales como el modelo de oclusión de arteria coronaria izquierda de rata. En última instancia, la actividad para el tratamiento de la cardiopatía se demuestra en ensayos clínicos en seres humanos, controlados con placebo, con enmascaramiento.

Las entidades químicas descritas en el presente documento se administran a una dosificación terapéuticamente eficaz, por ejemplo, una dosificación suficiente para proporcionar tratamiento para las patologías descritas anteriormente. Aunque todavía no se han optimizado los niveles de dosificación en seres humanos para las entidades químicas descritas en el presente documento, en general, una dosis diaria es de aproximadamente 0,05 mg/kg a 100 mg/kg de peso corporal; en determinadas formas de realización, de aproximadamente 0,10 mg/kg a 10,0 mg/kg de peso corporal, y en determinadas formas de realización, de aproximadamente 0,15 mg/kg a 1,0 mg/kg de peso corporal. Por lo tanto, para la administración a una persona de 70 kg, en determinadas formas de realización, el intervalo de dosificación sería de aproximadamente entre 3,5 mg a 7.000 mg al día; en determinadas formas de realización, de aproximadamente 7,0 mg a 700,0 mg al día, y en determinadas formas de realización, de aproximadamente 10,0 mg a 100,0 mg al día. La cantidad de entidad química administrada dependerá, por supuesto, del sujeto y de la patología que se está tratando, la gravedad de la enfermedad, la forma y programa de administración y el juicio del médico prescriptor; por ejemplo, un intervalo de dosis probable para la administración oral sería de aproximadamente 70 mg a 700 mg al día, mientras que para la administración intravenosa un intervalo de dosis probable sería de aproximadamente 70 mg a 700 mg al día, dependiendo de la farmacocinética del compuesto.

La administración de las entidades químicas descritas en el presente documento puede ser mediante cualquiera de los modos de administración aceptados para agentes con utilidades similares, incluidos, pero no limitados a, por vía oral, sublingual, subcutánea, intravenosa, intranasal, tópica, transdérmica, intraperitoneal, intramuscular, intrapulmonar, vaginal, rectal o intraocular. La administración oral y la parenteral son habituales en el tratamiento de las indicaciones que son objeto de la presente invención.

Las composiciones farmacéuticamente aceptables incluyen formas de dosificación sólidas, semisólidas, líquidas y en aerosol, tales como, por ejemplo, comprimidos, cápsulas, polvos, líquidos, suspensiones, supositorios, aerosoles o similares. Las entidades químicas también pueden administrarse en formas de dosificación de liberación sostenida o controlada, incluidas inyecciones depot, bombas osmóticas, píldoras, parches transdérmicos (incluidos de electrotransporte), y similares, para la administración pulsátil prolongada y/o temporizada, a una velocidad

predeterminada. En determinadas formas de realización, las composiciones se proporcionan en formas de dosificación unitaria adecuadas para la administración única de una dosis precisa.

5 Las entidades químicas descritas en el presente documento pueden administrarse en solitario o más generalmente en combinación con un excipiente, vehículo farmacéutico convencional, o similares, (por ejemplo, manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, croscarmelosa de sodio, glucosa, gelatina, sacarosa, carbonato de magnesio, y similares). Si se desea, la composición farmacéutica también puede
10 contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas tales como humectantes, emulsionantes, solubilizantes, agentes amortiguadores del pH y similares (por ejemplo, acetato de sodio, citrato de sodio, derivados de ciclodextrina, monolaurato de sorbitán, acetato de trietanolamina, oleato de trietanolamina, y similares). Generalmente, dependiendo del modo de administración pretendido, la composición farmacéutica contendrá de aproximadamente un 0,005% a un 95%; en determinadas formas de realización, de aproximadamente un 0,5% a un 50% en peso de una entidad química. Los métodos exactos para preparar tales formas de dosificación son
15 conocidos, o serán evidentes, para los expertos en esta materia; por ejemplo, véase Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania.

Además, las entidades químicas descritas en el presente documento pueden administrarse conjuntamente con, y las composiciones farmacéuticas pueden incluir, otros agentes medicinales, agentes farmacéuticos, adyuvantes, y similares. Los agentes activos adicionales adecuados incluyen, por ejemplo: tratamientos que retardan
20 la evolución de la insuficiencia cardíaca regulando por disminución la estimulación neurohormonal del corazón y tratan de prevenir la remodelación cardíaca (por ejemplo, inhibidores de ACE o β -bloqueantes); tratamientos que mejoran la función cardíaca mediante la estimulación de la contractilidad cardíaca (por ejemplo, agentes inotrópicos positivos, tales como el agonista β -adrenérgico dobutamina o el inhibidor de la fosfodiesterasa milrinona); y los tratamientos que reducen la precarga cardíaca (por ejemplo, diuréticos, tal como la furosemida). Otros agentes
25 activos adicionales adecuados incluyen vasodilatadores, digitoxina, anticoagulantes, antagonistas de mineralocorticoides, bloqueadores de los receptores de angiotensina, nitroglicerina, otros inotrópicos, y cualquier otro tratamiento utilizado en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca.

En determinadas formas de realización, las composiciones adoptarán la forma de píldora o comprimido y, por lo tanto, la composición contendrá, junto con el principio activo, un diluyente tal como lactosa, sacarosa, fosfato
30 dicálcico, o similares; un lubricante tal como estearato de magnesio o similares; y un aglutinante tal como almidón, goma de acacia, polivinilpirrolidina, gelatina, celulosa, derivados de celulosa, o similares. En otra forma de dosificación sólida, se encapsula un polvo, "marume" (un tipo de granulado), solución o suspensión (por ejemplo, en carbonato de propileno, aceites vegetales o triglicéridos) en una cápsula de gelatina.

35 Las composiciones líquidas farmacéuticamente administrables pueden prepararse, por ejemplo, disolviendo, dispersando, etc., al menos una entidad química y adyuvantes farmacéuticos opcionales en un vehículo (por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa acuosa, glicerol, glicoles, etanol, o similares) para formar una solución o suspensión. Pueden prepararse inyectables en formas convencionales, como suspensiones o soluciones líquidas, como emulsiones, o en formas sólidas adecuadas para la disolución o suspensión en líquido antes de la inyección. El porcentaje de entidades químicas contenido en tales composiciones parenterales depende en gran medida de la naturaleza específica de las mismas, así como de la actividad de las entidades químicas y las necesidades del sujeto. Sin embargo, pueden emplearse porcentajes de principio activo del 0,01% al 10% en solución, y serán
40 mayores si la composición es un sólido que se diluirá posteriormente hasta los porcentajes anteriormente indicados. En determinadas formas de realización, la composición comprenderá un 0,2%-2% del agente activo en solución.

Las composiciones farmacéuticas de las entidades químicas descritas en el presente documento también pueden administrarse al tracto respiratorio en forma de aerosol o solución para un nebulizador, o en forma de polvo
50 microfino para la insuflación, en solitario o en combinación con un vehículo inerte tal como lactosa. En tal caso, las partículas de la composición farmacéutica tienen diámetros inferiores a 50 micras, en determinadas formas de realización, inferiores a 10 micras.

En general, para emplear las entidades químicas descritas en el presente documento en un método de cribado para la unión a miosina, la miosina se une a un soporte y se añade al ensayo un compuesto de la invención.
55 Como alternativa, las entidades químicas descritas en el presente documento pueden unirse al soporte y añadirse la miosina. Las clases de compuestos entre los que puede buscarse agentes de unión novedosos incluyen anticuerpos específicos, agentes de unión no naturales identificados en cribados de quimiotecas, análogos peptídicos, etc. Resultan de especial interés los ensayos de cribado para agentes candidatos con baja toxicidad para las células humanas. Puede utilizarse para este fin una gran diversidad de ensayos, incluidos ensayos de unión
60 proteína-proteína *in vitro* marcados, ensayos de cambio de movilidad electroforética, inmunoensayos para la unión a proteínas, ensayos funcionales (ensayos de fosforilación, etc.) y similares. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 6.495.337.

Los siguientes ejemplos sirven para describir más detalladamente la manera de utilizar la invención
65 anteriormente descrita. Se entiende que estos ejemplos no sirven en modo alguno para limitar el verdadero alcance de la presente invención, sino que se presentan con fines ilustrativos.

Ejemplo 1 Etapa 1

5

10



15

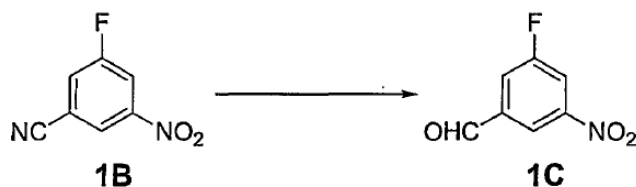
20

A una solución de 1,0 eq de **1A** en DMF seco (0,37 M) se añadió $\text{Zn}(\text{CN})_2$ (0,92 eq) y $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (0,058 eq). La mezcla de reacción se purgó con nitrógeno y se calentó a 80°C durante toda la noche. A continuación se añadieron 0,023 eq adicionales de $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ y se calentó la reacción durante otras 6 hrs. A continuación, se enfrió la mezcla de reacción a TA, se diluyó con 15 volúmenes de EtOAc (en base a **1A**) y se lavó la capa orgánica 3 veces con agua y una vez con salmuera. Se secó la capa orgánica sobre sulfato sódico, se filtró y se concentró. La purificación por cromatografía sobre gel de sílice utilizando como eluyente Et_2O /hexano al 10% proporcionó **1B** en forma de sólido (90%).

Ejemplo 1 Etapa 2

25

30



35

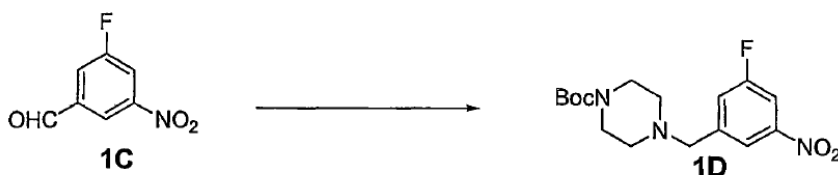
40

A una solución de 1,0 eq de **1B** en Et_2O seco (0,06 M) a 0°C se añadió, gota a gota, una solución de hidruro de diisobutil litio aluminio (1,1 eq, 1,0 M en hexanos) con una jeringa. La solución resultante se mantuvo a 0°C durante toda la noche. Se añadió la mezcla de reacción a una mezcla de hielo y ácido acético glacial. A continuación, se diluyó la mezcla de reacción con acetato de etilo y se extrajo la capa acuosa con acetato de etilo dos veces más. Se lavaron las capas orgánicas combinadas dos veces con bicarbonato sódico saturado y una vez con salmuera. A continuación, se secaron las capas orgánicas sobre sulfato sódico, se filtraron y se concentraron a vacío. La purificación sobre gel de sílice utilizando como eluyente EtOAc/hexanos al 10% proporcionó un sólido amarillo (100%) en forma de mezcla 80:20 de **1C:1B**.

Ejemplo 1 Etapa 3

45

50



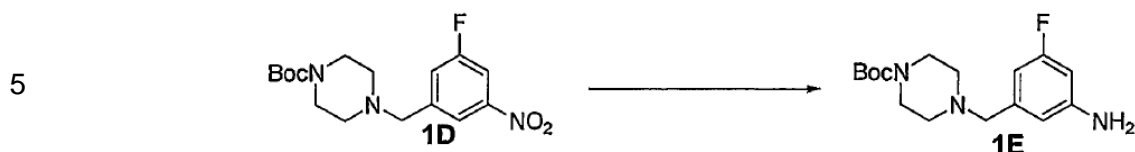
55

60

A una suspensión enfriada (0°C) de una mezcla 80:20 de **1C:1B** (1,0 eq) y Boc-piperazina (aproximadamente 2 eq) en una mezcla de HOAc y DCM (Boc-piperazina 4,8 M en HOAc/DCM 1:1,4 v/v) se añadió triacetoxiborohidruro de sodio en forma de sólido durante aproximadamente 5 minutos. Se dejó calentar la reacción a TA y se agitó durante dos horas. Se inactivó la mezcla de reacción con bicarbonato sódico saturado y se diluyó con acetato de etilo. Se separaron las capas y se lavó la capa acuosa tres veces con acetato de etilo. Las capas orgánicas se combinaron y se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato sódico, y se concentraron a vacío. La purificación por cromatografía sobre gel de sílice utilizando como eluyente acetato de etilo/hexanos al 50% proporcionó **1D** (67,7%) en forma de aceite amarillo.

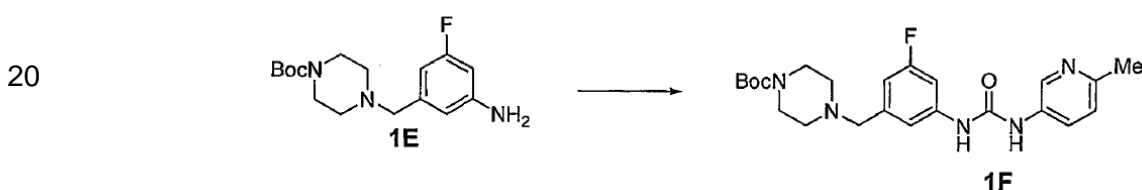
Ejemplo 1 Etapa 4

65



10 Una mezcla de 1,0 eq de **1D** y una cantidad catalítica de Pd/C al 10% (aproximadamente 10% p/p) en MeOH (aproximadamente 0,6 M de **1D** en MeOH) se agitó en atmósfera de H₂ a 50 psi durante 45 min. Después de sustituir la atmósfera de H₂ con N₂, se filtró la mezcla de reacción a través de tierra de diatomeas y se lavó la tierra de diatomeas con MeOH. La concentración del MeOH dio como resultado el aislamiento de **1E**.

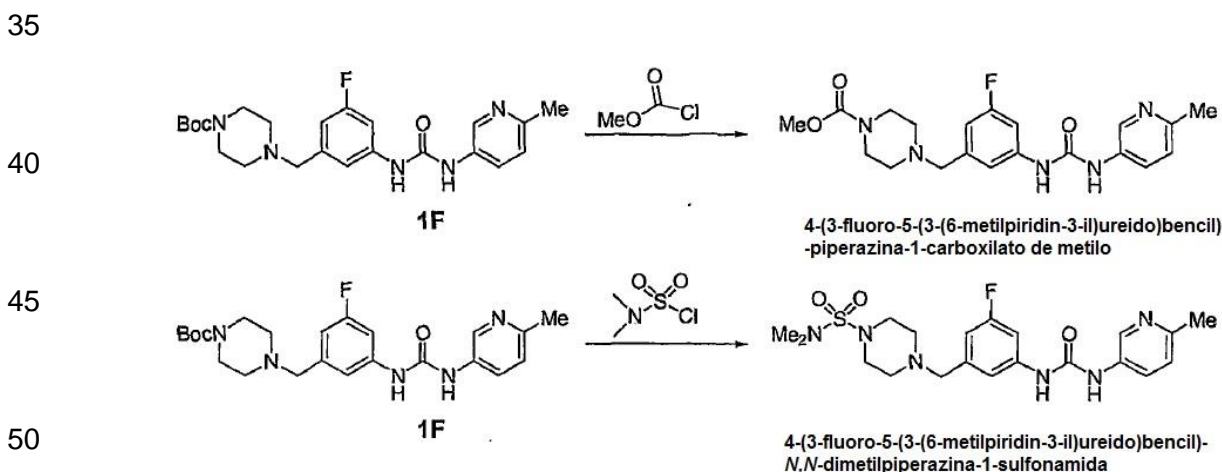
15 **Ejemplo 1 Etapa 5**



25 A una solución de anilina **1E** (1,0 eq) en DCM seco (aproximadamente 0,1 M de **1E** en DCM) a TA en atmósfera de N₂ se añadió el 2-metil-5-isocianatopiridina (ligero exceso, aproximadamente 1,2 eq) con una jeringa. Se agitó la mezcla durante 1 hora. Se añadió secuencialmente a la mezcla de reacción bicarbonato sódico acuoso saturado y acetato de etilo. Se separaron las capas y se lavó la capa orgánica dos veces con NaHCO₃ saturado y una vez con salmuera. Se secó la capa orgánica sobre sulfato sódico, se filtró y se concentró a vacío. La purificación por cromatografía sobre gel de sílice utilizando como eluyente metanol/DCM al 5% proporcionó **1F**.

30

35 **Ejemplo 1 Etapas 6 y 7**



55 A una solución de 1,0 eq de **1F** en CH₂Cl₂ (aproximadamente 0,14 M de **1F** en DCM) se añadieron aproximadamente 200 eq de ácido trifluoroacético (TFA). Se agitó la mezcla de reacción durante 30 min y se concentró. Se disolvió el residuo resultante en EtOAc (aproximadamente 1,6 veces el volumen de la mezcla de reacción) y se lavó secuencialmente con NaOH 3N (2 veces) y salmuera. Se secó la capa orgánica (NaSO₄) y se concentró para proporcionar la base libre deseada que se utilizó sin purificación adicional.

60 A una solución de la base libre anterior (1,0 eq) y DIPEA (1,2 eq) en THF seco (aproximadamente 0,2 M de base libre en THF) se añadió cloroformiato de metilo (1,1 eq) con una jeringa y se agitó la mezcla resultante durante 1h. Se añadió a la mezcla bicarbonato sódico acuoso, seguido de acetato de etilo. Se separó la capa orgánica y se lavó dos veces con bicarbonato sódico acuoso y una vez con salmuera. Las capas acuosas combinadas se extrajeron una vez con acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato sódico, se filtraron y se concentraron a vacío. La purificación por cromatografía sobre gel de sílice utilizando como eluyente MeOH/DCM al 5% proporcionó 4-(3-fluoro-5-(3-(6-metilpiridin-3-il)ureido)encil)-piperazina-1-carboxilato de metilo. MS 402 (M+H).

65

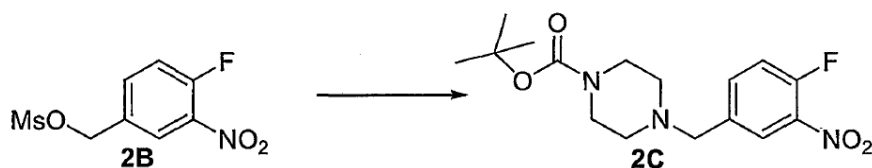
A una solución de la base libre anterior (1,0 eq) y DIPEA (1,2 eq) en THF seco (aproximadamente 0,2 M de base libre en THF) se añadió cloruro de dimetilsulfamoilo (1,1 eq) con una jeringa. Después de unas horas, se dio por terminada la reacción. La mezcla se inactivó con bicarbonato sódico acuoso, se diluyó con acetato de etilo y se lavó dos veces con bicarbonato y una vez con salmuera. Las capas acuosas combinadas se extrajeron una vez con acetato de etilo y las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato sódico, se filtraron y se concentraron a vacío. La purificación por cromatografía sobre gel de sílice utilizando como eluyente MeOH/DCM al 5% proporcionó 4-(3-fluoro-5-(3-(6-metilpiridin-3-il)ureido)encil)-N,N-dimetilpiperazina-1-sulfonamida. MS 451 (M+H).

Ejemplo 2 Etapa 1



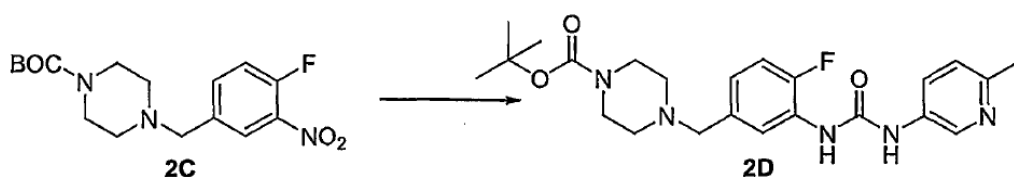
A 1,0 eq de (4-fluoro-3-nitro-fenil)-metanol (2A) en THF (aproximadamente 1 M de 2A en THF) y (aproximadamente 1,1 eq) de piridina, se añadieron aproximadamente 1,1 eq de cloruro de metanosulfonilo. Se agitó la mezcla durante toda la noche a temperatura ambiente y a continuación se concentró. Se purificó el residuo utilizando cromatografía ultrarrápida sobre sílice con EtOAc/hexanos al 10%-50% como eluyente para producir éster 4-fluoro-3-nitro-bencilico del ácido metanosulfónico (2B) (57%).

Ejemplo 2 Etapa 2



A 1,0 eq de éster 4-fluoro-3-nitro-bencilico del ácido metanosulfónico (**2B**) en DMF (aproximadamente 0,6 M de **2B** en DMF) se añadieron aproximadamente 1,05 eq de TEA y aproximadamente 1,0 eq de *t*-butil piperazina-1-carboxilato. Se agitó la mezcla durante 30 min a temperatura ambiente, se diluyó con EtOAc, se lavó con solución de NH₄Cl, se secó (Na₂SO₄) y se evaporó. La purificación por cromatografía ultrarrápida sobre sílice con EtOAc/hexanos al 50% como eluyente produjo éster *tert*-butílico del ácido 4-(4-(3-fluoro-5-nitro-bencil)-piperazina-1-carboxílico (**2C**).

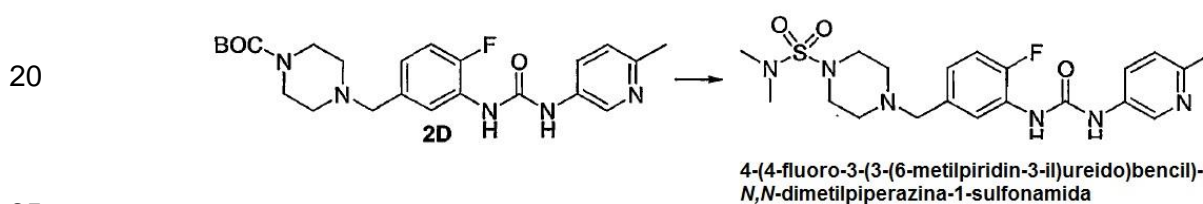
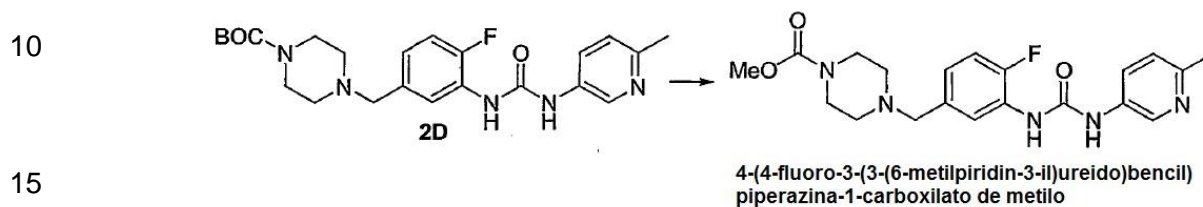
Ejemplo 2 Etapa 3



Se trató éster *tert*-butílico del ácido 4-(4-(3-fluoro-5-nitro-bencil)-piperazina-1-carboxílico (**2C**, 1,0 eq) en metanol (aproximadamente 0,2 M de **2C** en MeOH) con Pd(OH)₂/C catalítico en atmósfera de hidrógeno a 60 psi durante toda la noche. Se filtró la mezcla a través de tierra de diatomeas y se concentró hasta obtener un aceite. Este aceite se disolvió en THF y se trató con aproximadamente 1,05 eq de 6-metil-piridina-3-isocianato. Después de

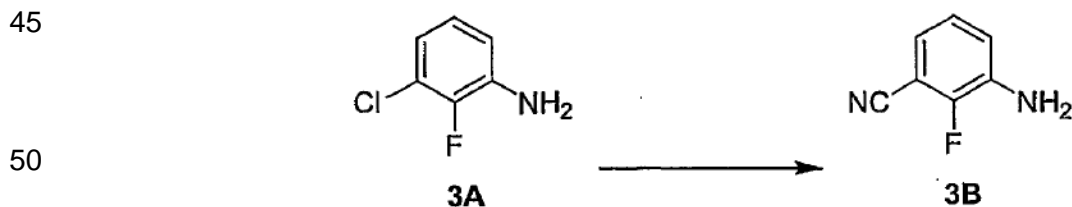
agitar a 50°C durante 30 min, se concentró la mezcla. Se purificó el residuo mediante HPLC en fase inversa para proporcionar éster *tert*-butílico del ácido 4-{4-fluoro-3-[3(6-metil-piridin-3-il)-ureido]-bencil}-piperazina-1-carboxílico (**2D**).

5 Ejemplo 2, etapas 4 y 5



30 A 1,0 eq de éster *tert*-butílico del ácido 4-{4-fluoro-3-[3(6-metil-piridin-3-il)-ureido]-bencil}-piperazina-1-carboxílico (**2D**) en MeOH (aproximadamente 0,1 M de **2D** en MeOH) se añadieron 2 volúmenes de HCl en dioxano (4 N) y se agitó la mezcla de reacción a 50°C durante 15 min y se evaporó hasta obtener un sólido. El sólido se combinó con DCM y se trató con aproximadamente 5 eq de TEA y se dividió en 3 porciones iguales de mezcla de reacción **A**. Una porción de la mezcla de reacción **A** se trató con 1,2 eq de cloruro de metilcarbonilo y se agitó durante toda la noche. La mezcla resultante se concentró y se purificó mediante HPLC en fase inversa para proporcionar éster metílico del ácido 4-{4-fluoro-3-[3(6-metil-piridin-3-il)-ureido]-bencil}-piperazina-1-carboxílico. MS 402 (M+H). Una segunda porción de la mezcla de reacción **A** se trató con 1,2 eq de cloruro de dimetilsulfamilo y se agitó durante toda la noche. La mezcla resultante se concentró y se purificó mediante HPLC en fase inversa para proporcionar dimetilamida del ácido 4-{4-fluoro-3-[3(6-metil-piridin-3-il)-ureido]-bencil}-piperazina-1-sulfónico. MS 451 (M+H).

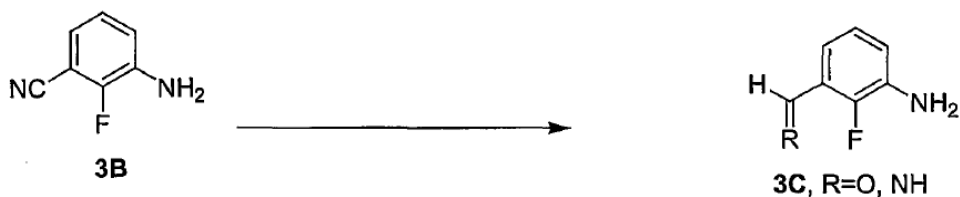
40 Ejemplo 3 Etapa 1



55 Se cargó un matraz de fondo redondo con 1 eq de 3-cloro-2-fluoroanilina (**3A**), 1-metil-2-pirrolidinona (aproximadamente 1,5 M de **3A** en NMP), 2,2 eq de cianuro sódico y 1,35 eq de bromuro de níquel(II) a TA en atmósfera de N₂. La concentración se redujo a la mitad introduciendo NMP adicional en atmósfera de N₂ y se calentó suavemente la solución a 200±5°C y se agitó durante 4 días en atmósfera de N₂. Se dejó enfriar la mezcla de reacción a temperatura ambiente. Se diluyó la mezcla de reacción con 30 volúmenes de metil *tert*-butil éter (MTBE) y se filtró a través de celite. A continuación, se aclaró el lecho de celite con 10 volúmenes de MTBE. Se lavó la parte orgánica con 40 volúmenes de salmuera, 2 x 40 volúmenes de agua y 40 volúmenes de salmuera. Se secó la parte orgánica combinada sobre sulfato sódico y se concentró para proporcionar un sólido marrón, que se secó a vacío (~ 30 pulgadas de mercurio) a 40°C durante 8 horas para proporcionar el compuesto de Fórmula **3B** (rendimiento del 71%).

65 Ejemplo 3 Etapa 2

5



10

15

20

Se enfrió a $\sim 0^{\circ}\text{C}$ una solución de **3B** en diclorometano (aproximadamente 1,5 M de **3B** en DCM) a TA en una mezcla de nitrógeno y se añadieron, gota a gota, 2,0 eq de hidruro de diisobutilitioaluminio 1M (DIBA1H) en DCM durante $\sim 3,5$ horas, manteniendo una temperatura de reacción interna $\leq 0^{\circ}\text{C}$. Al término de la adición del DiBA1H, se añadió, gota a gota, la mezcla de reacción con agitación enérgica a una solución enfriada ($\sim 0^{\circ}\text{C}$) de 40 volúmenes de sal Rochelle al 15% y 10 volúmenes de DCM, manteniendo una temperatura de reacción interna por debajo de 10°C . Se aclaró el matraz con 10 volúmenes de DCM y se dejó calentar la mezcla a temperatura ambiente y se agitó durante 4 horas. Se separaron las capas y se extrajeron de nuevo las capas acuosas con 20 volúmenes de DCM. Se lavaron las capas orgánicas combinadas con 20 volúmenes de agua. Se secó la capa orgánica sobre sulfato sódico y se concentró para proporcionar una espuma marrón, que se secó a vacío (~ 30 pulgadas de mercurio) a TA para proporcionar **3C** (rendimiento del 92%).

Ejemplo 3 Etapa 3

25

30



35

Etapas 3A/B:

40

45

50

Se dejó en agitación a temperatura ambiente, durante 3 horas, una solución de 1 eq de **3C**, tetrahidrofurano (aproximadamente 1,4 M de **3C** en THF) y 1,05 eq de piperazina-1-carboxilato de metilo. Se añadieron a la mezcla de reacción 1,5 eq de triacetoxiborohidruro de sodio en porciones durante ~ 40 min, manteniendo una temperatura de reacción interna por debajo de 45°C . Se agitó la mezcla de reacción durante toda la noche a temperatura ambiente. Se añadieron gota a gota a la mezcla de reacción 5 volúmenes de agua, durante 1 hora, manteniendo una temperatura de reacción interna por debajo de 30°C . A continuación, se añadió acetato de etilo (EtOAc, 5 volúmenes) y se separaron las capas. Se extrajeron de nuevo las capas acuosas con 5 volúmenes de EtOAc. Se lavaron las capas orgánicas combinadas con bicarbonato sódico saturado y se añadió, según fuese necesario, bicarbonato sódico sólido para llevar el pH a 8 (tiras pHydrión). Se separaron las capas y se lavó la capa orgánica con 5 volúmenes de salmuera. Se secó la capa orgánica sobre sulfato sódico y se añadió carbón activado en la etapa de secado. Se filtró la parte orgánica a través de celite y se aclaró el lecho de celite 4 veces con EtOAc. Se concentraron las fases orgánicas y se secaron durante toda la noche en el rotavapor (~ 30 pulgadas de mercurio a TA) para proporcionar un aceite de color ámbar-marrón.

Etapa 3 (C):

55

60

Todos los cálculos se basan en la cantidad de **3C** (R= O).

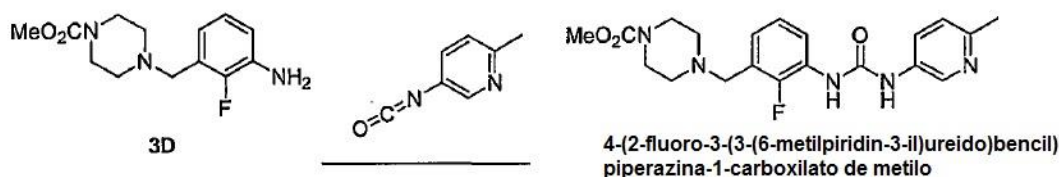
A 3 volúmenes de metanol (en base a **3C**, R=O) en atmósfera de N_2 en un baño de hielo/salmuera/acetona se añadieron, gota a gota, 3 eq de cloruro de acetilo durante 3 horas, manteniendo una temperatura de reacción interna por debajo de 0°C . A continuación, se agitó la solución durante 1 hora más por debajo de 0°C . Se añadió, gota a gota durante 30 min, una solución de 1,0 eq de **3D** sin purificar (de las Etapas 3A/3B anteriores) en MeOH (aproximadamente 3,6 M en base a **3C**, R=O), manteniendo una temperatura de reacción interna por debajo de 15°C . Se dejó calentar la reacción a temperatura ambiente durante toda la noche. Al día siguiente se filtraron los sólidos y se aclararon con 2x 0,5 volúmenes de MeOH, 5 volúmenes de metil *terc*-butil éter (MTBE): MeOH 1:1 y 5 volúmenes de MTBE.

65

A continuación, se recogieron los sólidos en 5 volúmenes de EtOAc y se añadieron, según fuese necesario, bicarbonato sódico saturado y bicarbonato sódico sólido para llevar el pH de la capa acuosa a 8 (tiras pHydrión). Se separaron las capas y se extrajo la capa acuosa con 5 volúmenes de EtOAc. Se lavaron las capas orgánicas combinadas con 5 volúmenes de salmuera, se secaron sobre sulfato sódico y se concentraron para proporcionar un

sólido de color naranja pálido que se secó a vacío (~ 30 pulgadas de mercurio) a ~ 40°C para proporcionar **3D** (rendimiento del 50%).

Ejemplo 3 Etapa 4

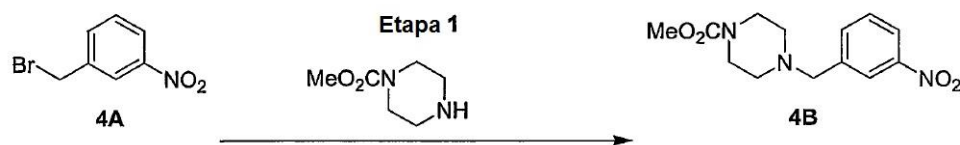


A una solución de **3D** en acetona (aproximadamente 2,7 M de **3D** en acetona) se añadieron, gota a gota, 1,0 eq de 5-isocianato-2-metilpiridina durante 9 min. Se formó un precipitado voluminoso durante la adición y se agitó la reacción durante una hora. Se calentó a reflujo la mezcla de reacción durante 2 horas y se enfrió a TA durante 2,5 horas. A continuación, se calentó a reflujo la reacción durante 1 hr y se enfrió a TA durante toda la noche. Se filtró la reacción y se aclaró con 1 volumen de acetona, a continuación tres veces con 2 volúmenes de acetato de etilo. Se secaron los sólidos a vacío (~ 30 pulgadas de mercurio) a 60°C durante toda la noche para proporcionar un polvo blanco (rendimiento del 86%) de 4-(2-fluoro-3-(3-(6-metilpiridin-3-il)ureido)encil)piperazina-1-carboxilato de metilo. El material se volvió a procesar de la siguiente manera:

Se disolvió en acetona (aproximadamente 0,2 M) el 4-(2-fluoro-3-(3-(6-metilpiridin-3-il)ureido)encil)piperazina-1-carboxilato de metilo anterior, en atmósfera de N₂. A continuación, se calentó a reflujo la reacción durante 2,5 horas y se enfrió a TA durante toda la noche. Se filtró la reacción y se aclaró con 1 volumen de acetona, a continuación, tres veces con 2 volúmenes de acetato de etilo. Se secaron los sólidos a vacío (~ 30 pulgadas de mercurio) a 60°C durante toda la noche para proporcionar 4-(2-fluoro-3-(3-(6-metilpiridin-3-il)ureido)encil)piperazina-1-carboxilato de metilo en forma de polvo blanco (rendimiento del 79%). El material se volvió a procesar de la siguiente manera:

Se disolvió en acetona (aproximadamente 0,2 M) el 4-(2-fluoro-3-(3-(6-metilpiridin-3-il)ureido)encil)piperazina-1-carboxilato de metilo anterior, en atmósfera de N₂. A continuación, se calentó a reflujo la reacción y se enfrió a TA durante toda la noche. Se filtró la reacción y se aclaró con 1 volumen de acetona, a continuación, tres veces más con 2 volúmenes de acetato de etilo. Se secaron los sólidos a vacío (~ 30 pulgadas de mercurio) a 60°C durante toda la noche para proporcionar 4-(2-fluoro-3-(3-(6-metilpiridin-3-il)ureido)encil)piperazina-1-carboxilato de metilo en forma de polvo blanco (rendimiento del 73%). MS 402 (M+H).

Ejemplo 4 Etapa 1



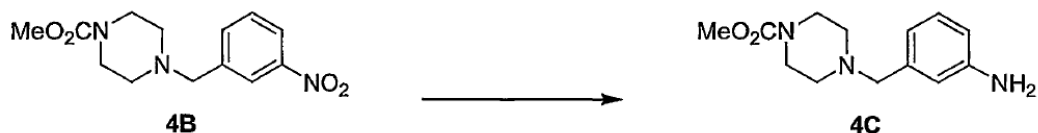
Se purgó con nitrógeno un matraz de fondo redondo de 3 bocas, durante al menos diez minutos. Se cargó el matraz con 1,0 eq de **4A**, CH₂Cl₂ (aproximadamente 1,2 M de **4A** en DCM) y aproximadamente 1,1 eq de DIPEA. A continuación, se enfrió el matraz a 10±5°C. Mientras se enfriaba el matraz, se recogieron en CH₂Cl₂ (aproximadamente 5,3 M) 1,2 eq de piperazina-1-carboxilato de metilo. El material no se disolvió, por lo que se añadieron 0,05 eq adicionales de DIPEA en DCM (aproximadamente 0,3 M). El material no se disolvió, y a continuación se añadió gota a gota la suspensión durante 50 min, manteniendo una temperatura de reacción interna ≤ 30°C. Se retiró el baño de enfriamiento y se calentó a reflujo la mezcla de reacción. Se mantuvo a reflujo la mezcla de reacción durante 19 horas. Se añadieron 0,05 eq adicionales de piperazina-1-carboxilato de metilo y se sometió a reflujo la reacción durante otras 2,5 horas. Se enfrió la reacción a TA y se lavó con 5 volúmenes agua. Se volvió a extraer la capa de agua con 5 volúmenes de CH₂Cl₂. Se lavaron las capas orgánicas combinadas con 5 volúmenes de AcOH/agua al 10%. A continuación, se lavó la capa orgánica con 5 volúmenes de bicarbonato sódico saturado y 5 volúmenes de salmuera. Se secó la capa orgánica sobre sulfato sódico, se filtró y se concentró mediante un rotavapor a 30±5°C hasta obtener un residuo. Se cargó MTBE en el matraz del rotavapor a 20±5°C y se hizo rotar el matraz hasta conseguir una solución. Se cargó hexano en el matraz y se agitó la solución durante 2,5 horas a 20±5°C. Se filtraron los sólidos y se aclararon con hexanos. Se secaron los sólidos a ≤40°C a vacío máximo hasta

conseguir una masa constante (~ 22 horas) para proporcionar **4B** en forma de sólido de color amarillo pálido (rendimiento del 66%).

Ejemplo 4 Etapa 2

5

10



15

20

25

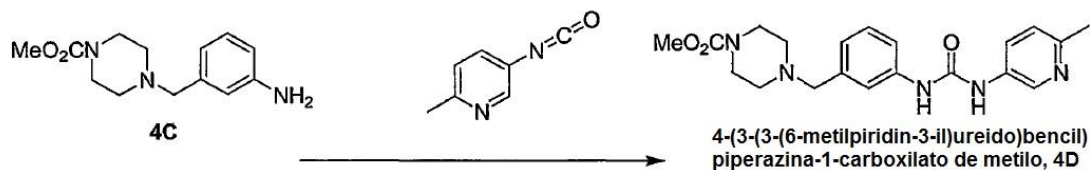
30

Se cargó un reactor de alta presión con una suspensión de Pt/C al 25% en peso con respecto a **4B** en 8 volúmenes de THF (con respecto a Pt/C) seguido de una suspensión de 1,5 eq de K₂CO₃, en THF (aproximadamente 0,67 M), a continuación una solución de 1,0 eq de **4B** en THF (aproximadamente 0,47 M). Se fijó la camisa del reactor a 10°C y se cargó el reactor con H₂ a 50 psi mientras se mantenía una temperatura de reacción interna ≤ 30°C. Se agitó la reacción durante 9 horas, 45 min y a continuación se agitó durante otras 3,5 horas. Se filtró la reacción. Se aclararon el matraz de reacción y los filtros con 9 volúmenes de MeOH (con respecto a **4B**) y se concentraron mediante rotavapor a ≤ 50°C. Se disolvió el residuo en 4 volúmenes de EtOAc y se lavó con 4 volúmenes de agua. Se volvió a extraer la capa acuosa con 4 volúmenes de EtOAc. Los extractos orgánicos combinados se lavaron con 4 volúmenes de salmuera, se secaron sobre sulfato sódico, se filtraron y se concentraron mediante rotavapor a ≤ 50°C para proporcionar un residuo. Una vez que dejó de salir el disolvente del rotavapor, se cargó el residuo con 2 volúmenes de MTBE y se concentró la solución mediante rotavapor a ≤ 50°C para proporcionar un residuo. Una vez que dejó de salir el disolvente del rotavapor, se mantuvo el material en el rotavapor a vacío máximo durante 15 horas. A continuación, se cargó MTBE (2 volúmenes) para triturar el material y se hizo rotar el matraz durante 2 horas. Se filtraron los sólidos y se aclararon con 0,5 volúmenes de MTBE. Se secaron los sólidos a ≤ 50°C a vacío máximo hasta conseguir una masa constante (~ 22 horas) para proporcionar **4C** en forma de sólido de color amarillo pálido (rendimiento del 87%).

Ejemplo 4 Etapa 3

35

40



45

50

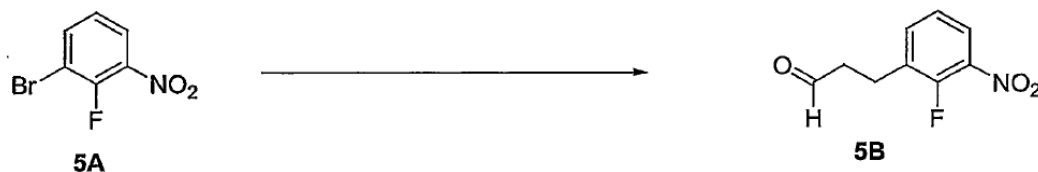
55

Se purgó con nitrógeno un matraz de fondo redondo de 3 bocas, durante al menos diez minutos. A continuación, se cargó el matraz con 1,0 eq de **4C** en acetona (aproximadamente 0,56 M). Se calentó el matraz a 27°C para formar una solución. Se añadió, gota a gota, aproximadamente 1 eq de 5-isocianato-2-piridina durante 68 min, controlando la velocidad de adición para mantener la temperatura interna ≤ 45°C. Después de la adición, se mantuvo la mezcla de reacción ≤ 45°C durante aproximadamente 5 horas. A continuación, se calentó a reflujo suave la reacción durante 35 min y a continuación se enfrió de nuevo a temperatura ambiente durante toda la noche (15 hrs). Se filtraron los sólidos y se aclararon con 0,45 volúmenes de acetona y 1,7 volúmenes de EtOAc. Se secaron los sólidos en un horno de vacío ≤ 50°C para proporcionar **4D**, 4-(3-(3-(6-metilpiridin-3-il)ureido)benzil)piperazina-1-carboxilato de metilo (rendimiento del 89%). MS 384 (M+H).

Ejemplo 5 Etapa 1

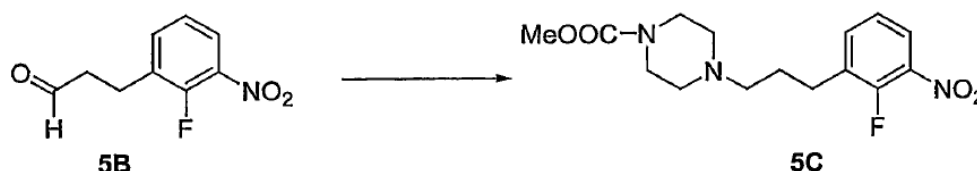
60

65



A una mezcla de 1,0 eq de 2-fluoro-3-bromo-nitrobenzoceno (**5A**), 1,0 eq de cloruro de tetrabutilamonio, 1,5 eq de NaHCO₃ y 2,0 eq de alcohol alílico en DMF (aproximadamente alcohol alílico 1 M en DMF) en atmósfera de N₂ se añadieron 0,4 eq de PdCl₂. Se calentó la mezcla de reacción a 60°C y se agitó en atmósfera de N₂ durante 16 h. Se elevó la temperatura a 70°C y se agitó la mezcla de reacción durante 4 h más. Se añadieron alícuotas adicionales de 1 eq de alcohol alílico y 0,1 eq de PdCl₂ y se agitó la mezcla de reacción en atmósfera de N₂ durante 6 h. Se enfrió la mezcla de reacción a temperatura ambiente y se diluyó con EtOAc. Se lavó la mezcla secuencialmente con agua, HCl 1N y salmuera. Se secó la capa orgánica y se concentró hasta obtener un residuo. La purificación sobre gel de sílice utilizando como eluyente con gradiente de EtOAc/Hexano al 10% hasta EtOAc/hexano al 60%, proporcionó **5B**.

Ejemplo 5 Etapa 2



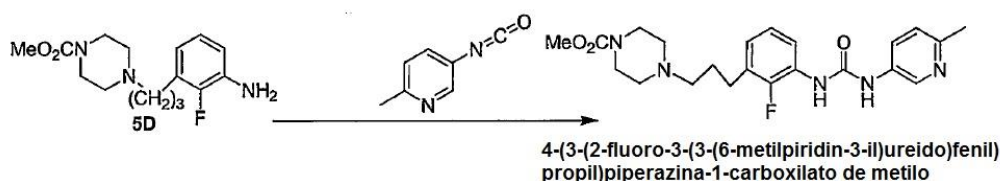
A una solución de 1,0 eq de **5B** en CH₂Cl₂ (aproximadamente 0,04 M) en atmósfera de N₂ se añadieron 1,3 eq de sal de HCl de piperazina-1-carboxilato de metilo seguido de 1,2 eq de triacetoxiborohidruro de sodio. Se agitó la mezcla de reacción a TA durante toda la noche. Se añadieron a la mezcla de reacción 0,5 eq adicionales de sal de HCl de piperazina-1-carboxilato de metilo seguido de 2 eq de triacetoxiborohidruro de sodio y se agitó la mezcla a TA durante 4 h. Se diluyó la mezcla de reacción con CH₂Cl₂ y se lavó secuencialmente con agua y salmuera. Se secó la capa orgánica y se concentró hasta obtener un residuo. La purificación sobre gel de sílice utilizando como eluyente EtOAc/hexano 2:1 produjo **5C**.

Ejemplo 5 Etapa 3



Se agitó una mezcla de 1 eq de **5C** y 50 eq en peso de Pd/C al 10% en MeOH (0,06 M de **5C** en MeOH) en atmósfera de H₂ a 30 psi durante 2 h. Después de sustituir la atmósfera de H₂ con N₂, se filtró la mezcla de reacción a través de tierra de diatomeas y se lavó la tierra de diatomeas con MeOH. La concentración del MeOH dio como resultado el aislamiento de **5D** con un rendimiento casi cuantitativo.

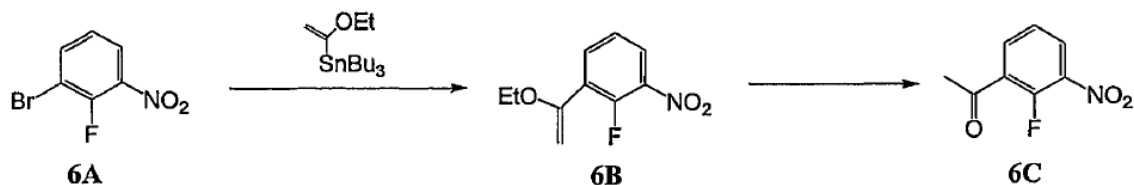
Ejemplo 5 Etapa 4



A una solución de 1 eq de **5D** en CH₂Cl₂ (aproximadamente 0,1 M) en atmósfera de N₂ a TA, se añadió 1 eq de 5-isocianato-2-piridina y se agitó la mezcla resultante a TA durante 12 h. Se diluyó la mezcla de reacción con CH₂Cl₂ y se lavó secuencialmente con agua y salmuera. Se secó la capa orgánica y se concentró hasta obtener un residuo. La purificación mediante HPLC preparativa en fase inversa (columna C-18) utilizando como eluyente con

gradiente de CH₃CN/agua al 10% hasta CH₃CN al 100% proporcionó 4-(3-(2-fluoro-3-(3-(6-metilpiridin-3-il)ureido)fenil)propil)piperazina-1-carboxilato de metilo. MS 430 (M+H).

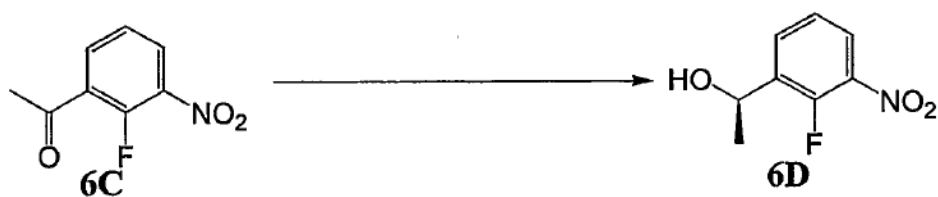
Ejemplo 6 Etapas 1 y 2



Se añadió $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (0,05 eq) a una mezcla de 1,0 eq de **6A**, 1,0 eq de tributil(1-etoxivinil)-estaño en dioxano (aproximadamente 0,4 M) en atmósfera de N_2 . Se calentó la mezcla a 95°C durante 4 horas en atmósfera de N_2 . Se añadió a la mezcla de reacción una mezcla de solución de EtOAc/(KF 1M) 1:1 v/v y se agitó la mezcla durante 1 hora. El precipitado se separó por filtración. Se secó la capa orgánica y se concentró para proporcionar **6B** que se utilizó sin purificación adicional.

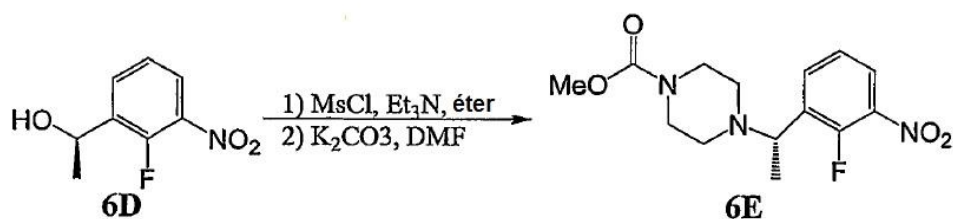
A una mezcla de **6B** en THF (0,8 M con respecto a **6A**) se añadieron aproximadamente 2,3 volúmenes de HCl 2N y se agitó la mezcla a TA durante 1 h. Se añadió a la mezcla de reacción NaHCO_3 saturado. Se concentró la mezcla de reacción para eliminar el THF y se añadió a la mezcla resultante un volumen de éter aproximadamente 3 veces superior al de la mezcla de reacción. Se secó la capa orgánica y se concentró hasta obtener un residuo. Se purificó el residuo sobre gel de sílice para obtener **6C** (87% en 2 etapas).

Ejemplo 6 Etapa 3



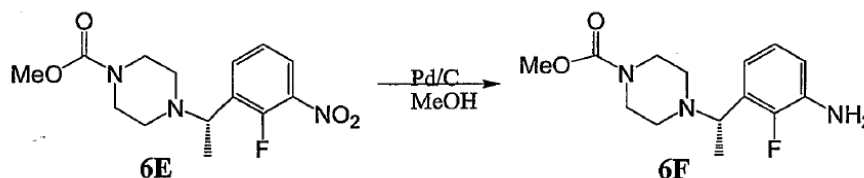
A una mezcla de 0,1 eq a 0,15 eq de (S)-1-metil-3,3-difenil-hexahidropirrol[1,2-c][1,3,2]oxazaborol en tolueno (1 M-1,5 M) y tolueno (un volumen de aproximadamente 10 veces superior al del oxazaborol en tolueno) en atmósfera de N_2 a 20°C, se añadieron 1,05 eq de $\text{Et}_2\text{NPh-BH}_3$. Se añadieron a esta mezcla de reacción, gota a gota, 1,0 eq de **6C** en tolueno (aproximadamente 0,4 M) durante 1,5 horas. A continuación, se agitó la mezcla de reacción durante 1 hora más a TA. Se añadieron a la mezcla de reacción aproximadamente 1,9 volúmenes de MeOH, seguido de aproximadamente 3,4 volúmenes de HCl 1N. Se agitó la mezcla durante 20 min. Se añadieron a la mezcla de reacción aproximadamente 7,8 volúmenes de éter y aproximadamente 7,8 volúmenes de salmuera. Se separó la capa orgánica, se secó y se concentró hasta obtener un residuo. Se purificó el residuo mediante cromatografía sobre gel de sílice para proporcionar **6D** (79%).

Ejemplo 6 Etapa 4



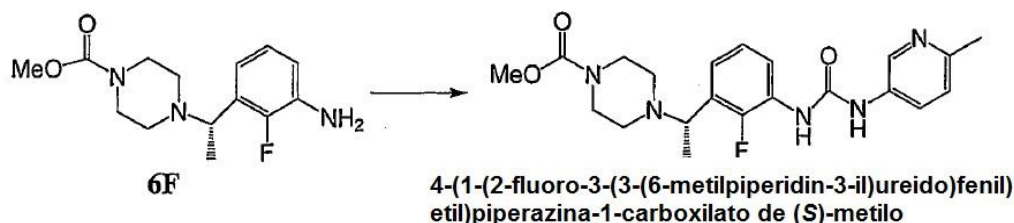
A 1,0 eq de **6D** en éter (aproximadamente 0,55 M) y 1,2 eq de Et₃N se añadieron, gota a gota a 0°C, aproximadamente 1,1 eq de cloruro de metanosulfonilo. Se agitó la mezcla a TA durante 30 min. Se filtró la mezcla de reacción y se concentró hasta obtener un residuo. Se disolvió el residuo en aproximadamente 5,9 volúmenes de DMF y 1,2 eq de sal de HCl de piperazina-1-carboxilato de metilo y se añadieron 4 equivalentes de K₂CO₃. Se calentó la mezcla de reacción a 50°C durante 16 horas. Se enfrió la mezcla de reacción a TA y se añadieron aproximadamente 29 volúmenes de EtOAc y 29 volúmenes de NH₄Cl saturado. Se separó la capa orgánica, se secó y se concentró. Se purificó el residuo resultante mediante cromatografía sobre gel de sílice para proporcionar **6E**.

10 Ejemplo 6 Etapa 5



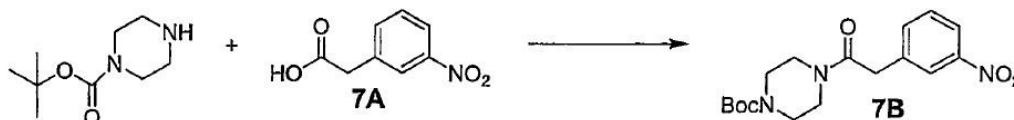
Se agitó una mezcla de 1 eq de **6E** y 10 eq en peso de Pd/C al 10% en MeOH en atmósfera de H₂ a 45 psi durante 0,5 h. Después sustituir la atmósfera de H₂ con N₂, se filtró la mezcla de reacción a través de tierra de diatomeas y se lavó la tierra de diatomeas con MeOH. La concentración del MeOH dio como resultado el aislamiento de **6F**.

25 Ejemplo 6 Etapa 6



A una solución de 1,0 eq de **6F** en CH₂Cl₂ (a aproximadamente 0,3 M) en atmósfera de N₂ a TA se añadió 1,0 eq de 5-isocianato-2-metilpiridina y se agitó la mezcla resultante a TA durante 0,5 h. Se concentró la mezcla de reacción hasta obtener un residuo. La purificación mediante HPLC en fase inversa (columna C-18) proporcionó 4-(1-(2-fluoro-3-(3-(6-metilpiperidin-3-il)ureido)fenil)etil)-piperazina carboxilato de (S)-metilo en forma de sólido blanco. MS 416 (M+H).

45 Ejemplo 7 Etapa 1



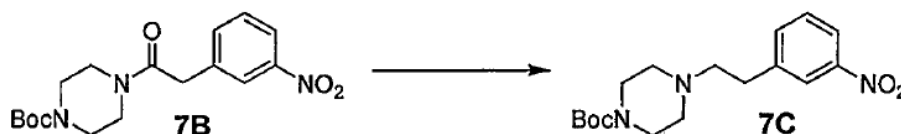
piperazina-1-carboxilato de *terc*-butilo

Se cargó un matraz de fondo redondo, secado en horno, con piperazina-1-carboxilato de *terc*-butilo (1,1 eq), ácido 3-nitrofenilacético (**7A**, 1,0 eq), EDC (1,2 eq) y HOBT (1,2 eq). Se lavó abundantemente el matraz con nitrógeno y se añadieron con una jeringa *N,N*-dimetil-formamida (aproximadamente 0,5 M de **7A** en DMF) y trietilamina (2,0 eq). Se agitó la mezcla de reacción resultante durante toda la noche a temperatura ambiente. A continuación, se diluyó la mezcla de reacción con EtOAc y se lavó 4 veces con H₂O, dos veces con KHSO₄ acuoso 1 N, una vez con NaHCO₃ saturado y una vez con salmuera. Se secó la capa orgánica sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró a vacío. Se aisló 4-(2-(3-nitrofenil)acetil)piperazina-1-carboxilato de *terc*-butilo (**7B**) en forma de sólido (80%) y se utilizó sin purificación adicional.

Ejemplo 7 Etapa 2

5

10



15

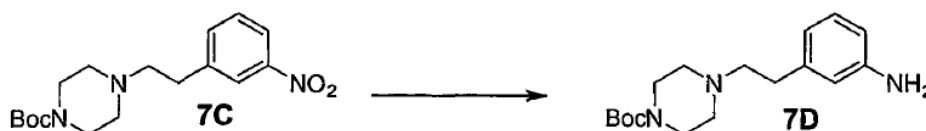
20

A una solución de 4-(2-(3-nitrofenil)acetil)piperazina-1-carboxilato de *tert*-butilo (**7B**, 1,0 eq) en THF (aproximadamente 0,5 M de **7B** en THF) se añadió borano-THF (2,0 eq) con una jeringa. Se calentó a reflujo la mezcla de reacción resultante durante 2 h. Se enfrió la mezcla de reacción en un baño de hielo/agua y se añadió lentamente HOAc acuoso al 10%. Se concentró la mezcla a vacío y se disolvió el residuo en EtOAc. Se repartió la capa orgánica con agua y se basificó la capa acuosa (pH ~ 9) añadiendo NaOH al 50%. A continuación, se lavó la capa orgánica dos veces con NaHCO₃ acuoso saturado y una vez con salmuera. Se secó la capa orgánica sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró a vacío. El 4-(3-nitrofenetil)piperazina-1-carboxilato de *tert*-butilo resultante (**7C**, cuant.) se utilizó sin purificación adicional.

Ejemplo 7 Etapa 3

25

30



35

40

Se cargó un inserto de vidrio Parr con 4-(3-nitrofenetil)piperazina-1-carboxilato de *tert*-butilo (**7C**, 1,0 eq) y metanol (aproximadamente 0,2 M de **7C** en MeOH). A esta solución se añadió una suspensión de 12,5 eq en peso de Pd/C al 10% en metanol. Se selló la mezcla de reacción en un hidrogenador de Parr y se sometió a 3 ciclos de presurización/aireación con H₂. Se dejó continuar la mezcla de reacción a temperatura ambiente y 45 psi de H₂ durante 2,5 h. A continuación, se cargó la mezcla de reacción con 12,5 eq en peso de Pd(OH)₂/C y se presurizó el recipiente con hidrógeno (45 psi). Al cabo de 1 h, se filtró la mezcla de reacción a través de un lecho de tierra de diatomeas, se lavó la tierra de diatomeas con MeOH y se concentraron a vacío las capas orgánicas combinadas para proporcionar el 4-(3-aminofenetil)-piperazina-1-carboxilato de *tert*-butilo deseado (**7D**, 63%), que se utilizó sin purificación adicional.

45

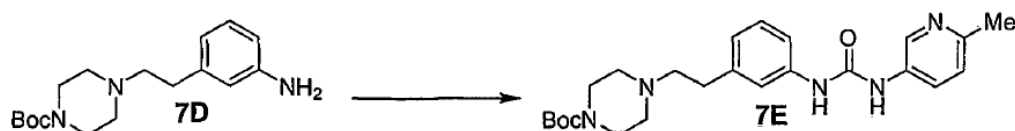
Ejemplo 7 Etapa 4

50

55

60

65



A una solución de 4-(3-aminofenil)piperazina-1-carboxilato de *tert*-butilo (**7D**, 1,0 eq) en THF (aproximadamente 0,3 M de **7D** en THF) se añadió, gota a gota, 5-isocianato-2-metilpiridina (1,0 eq). Se agitó la mezcla de reacción resultante durante 2 h. Se añadió a la mezcla de reacción NaHCO₃ acuoso saturado. Se diluyó la mezcla con EtOAc y se separaron las capas. Se lavó la capa orgánica dos veces con NaHCO₃ acuoso saturado y una vez con salmuera. Se secó la capa orgánica sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró a vacío. La purificación sobre gel de sílice utilizando como eluyente con gradiente de MeOH/CH₂Cl₂ al 5%-12% proporcionó 4-(3-(3-(6-metilpiridin-3-il)ureido)fenil)piperazina-1-carboxilato de *tert*-butilo (**7E**, 63 %).

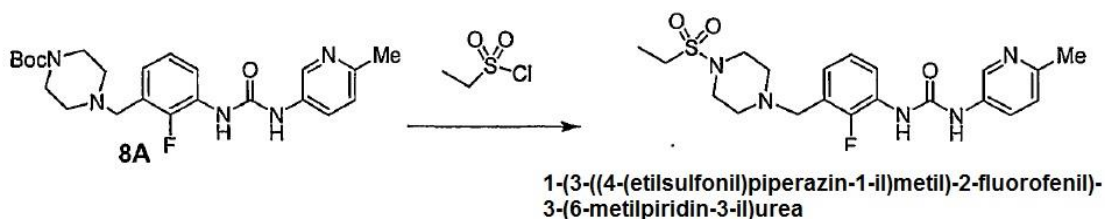
Ejemplo 7 Etapa 5



A una solución de 4-(3-(3-(6-metilpiridin-3-il)ureido)fenil)piperazina-1-carboxilato de *tert*-butilo (**7E**, 1,0 eq) en MeOH (aproximadamente 0,2 M de **7E** en MeOH) se añadió una solución de HCl 2 M en dioxano (aproximadamente 12 eq). Al cabo de 70 min se concentró la mezcla de reacción a vacío y se utilizó sin purificación para posteriores acilaciones. MS 398 (M+H).

La sal de HCl resultante (1,0 eq) de la etapa anterior se suspendió en THF (aproximadamente 0,15 M de sal en THF) y se añadió trietilamina (4,0 eq). Se enfrió la mezcla de reacción a 0°C y se añadió, gota a gota, cloroformiato de metilo (1,05 eq) y se agitó la mezcla resultante durante 5 min a TA. Se añadió a la mezcla de reacción NaHCO₃ acuoso saturado seguido de EtOAc. Se separaron las capas y se lavó la capa orgánica una vez con NaHCO₃ acuoso saturado, una vez con salmuera, se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró a vacío. La purificación sobre gel de sílice utilizando como eluyente con gradiente de MeOH/CH₂Cl₂ al 2%-10% proporcionó 4-(3-(3-(6-metilpiridin-3-il)ureido)fenil)piperazina-1-carboxilato de metilo.

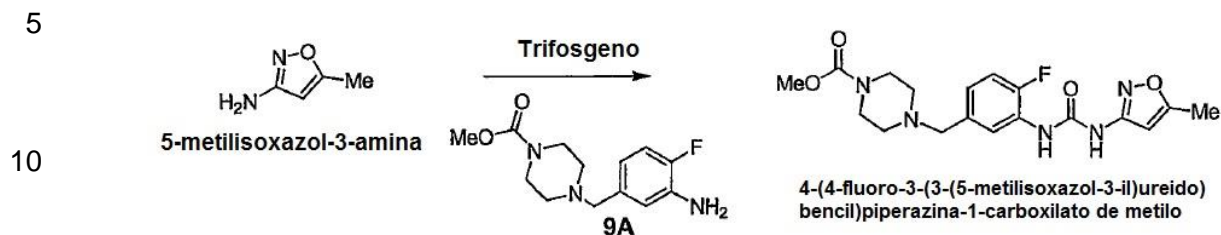
Ejemplo 8



A una solución de 1,0 eq de **8A** en MeOH (aproximadamente 0,07 M) se añadió una solución de HCl 2 M en dioxano (aproximadamente 30 eq). Al cabo de 70 min se concentró la mezcla de reacción a vacío y se utilizó sin purificación para posteriores acilaciones.

La sal de HCl resultante de la etapa anterior se suspendió en THF (0,05 M) y se añadieron aproximadamente 18 eq de diisopropiletilamina. Se enfrió la mezcla de reacción a 0°C y se añadió, gota a gota, aproximadamente 1 eq de cloruro de etanosulfonilo. Se agitó la mezcla resultante durante 5 min a TA. Se añadió a la mezcla de reacción NaHCO₃ acuoso saturado seguido de EtOAc. Se separaron las capas y se lavó la capa orgánica una vez con NaHCO₃ acuoso saturado, una vez con salmuera, se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró a vacío. La purificación sobre gel de sílice utilizando como eluyente con gradiente de MeOH/CH₂Cl₂ al 1%-10% seguido de trituración en acetona/éter 1:1 proporcionó 1-(3-(4-(etilsulfonyl)piperazin-1-il)metil)-2-fluorofenil)-3-(6-metilpiridin-3-il)urea. MS 436 (M+H).

Ejemplo 9



20

25

A una solución de aproximadamente 0,4 eq de trifosgeno en THF (aproximadamente 0,04 M) a TA en atmósfera de N₂ se añadieron 1 eq de 5-metilisoxazol-3-amina y 2 eq de diisopropiletilamina en THF (aproximadamente 0,2 M de amina en THF). Se agitó la mezcla de reacción durante 15 min. A esta mezcla se añadió 1,0 eq de **9A** en THF (aproximadamente 0,2 mM de **9A** en THF). Se agitó la mezcla resultante durante 10 min. Se añadió a la mezcla de reacción NaHCO₃ acuoso saturado seguido de EtOAc. Se separaron las capas y se lavó la capa orgánica una vez con NaHCO₃ acuoso saturado, una vez con salmuera, se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró a vacío. La purificación sobre gel de sílice utilizando como eluyente con gradiente de MeOH/CH₂Cl₂ al 1%-10% proporcionó 4-(4-fluoro-3-(3-(5-metilisoxazol-3-il)ureido)encil)piperazina-1-carboxilato de metilo. MS 392 (M+H).

Se sintetizaron los siguientes compuestos de manera similar a los compuestos representativos anteriores:

30

Datos de espectrometría de masas	Nombre del compuesto
402 (M+H)	4-[(3-fluoro-5-[(6-metil(3-piridil))amino]carbonilamino)fenil]metil] piperazincarboxilato de metilo
35 416 (M+H)	4-[(4-fluoro-3-[(6-metil(3-piridil))amino]carbonilamino)fenil]metil] piperazincarboxilato de etilo
416 (M+H)	4-[(1S)-1-(5-fluoro-3-[(6-metil(3-piridil))amino]carbonilamino)fenil]etil] piperazincarboxilato de metilo
40 400 (M+H)	N-{3-[(1S)-1-(4-acetilpiperazinil)etil]-2-fluorofenil} [(6-metil(3-piridil))amino] carboxamida
410 (M+H)	N-{3-[(3-etil(1,2,4-triazolo[3,4-c]piperazin-7-il))metil]-2-fluorofenil} [(6-metil(3-piridil))amino]carboxamida
45 408 (M+H)	N-(2-fluoro-3-[[4-(metilsulfonil)piperazinil]metil]fenil)(4-piridilamino)carboxamida
422 (M+H)	N-(3-[[4-(etilsulfonil)piperazinil]metil]-2-fluorofenil)(4-piridilamino)carboxamida
50 402 (M+H)	4-[(2-fluoro-3-[(6-metil(3-piridil))amino]carbonilamino)fenil]metil] piperazincarboxilato de metilo

Ejemplo 10

Ensayos de identificación de dianas

55

Ensayos de especificidad: la especificidad hacia la miosina cardíaca se evalúa comparando el efecto de la entidad química sobre la ATPasa estimulada por actina de un panel de isoformas de miosina: músculo cardíaco, esquelético y liso, a una sola concentración de 50 µM o a múltiples concentraciones de la entidad química.

Ejemplo 11

Modelos *in vitro* de la modulación de la miosina ATPasa cardíaca dependiente de la dosis

65

Ensayo de sarcómero cardíaco reconstituido: Se miden las respuestas a la dosis utilizando un ensayo de ATPasa acoplada a piruvato quinasa y lactato deshidrogenasa, tamponada con calcio, que contiene los siguientes reactivos (las concentraciones expresadas son las concentraciones de ensayo finales): PIPES de potasio

(12 mM), MgCl₂ (2 mM), ATP (1 mM), DTT (1 mM), BSA (0,1 mg/ml), NADH (0,5 mM), PEP (1,5 mM), piruvato quinasa (4 U/ml), lactato deshidrogenasa (8 U/ml) y ANTIFOAM (antiespumante) (90 ppm). Se ajustó el pH a 6,80 a 22°C añadiendo hidróxido potásico. Los niveles de calcio se controlan mediante un sistema de amortiguación del pH que contiene EGTA 0,6 mM y concentraciones variables de calcio, para conseguir una concentración de calcio libre de 1x10⁻⁴ M a 1x10⁻⁸ M.

Los componentes proteicos específicos para este ensayo son miosina cardíaca de bovino, subfragmento 1 (por lo general 0,5 μM), actina cardíaca de bovino (14 μM), tropomiosina cardíaca de bovino (por lo general 3 μM) y troponina cardíaca de bovino (por lo general 3 μM-8 μM). Las concentraciones exactas de tropomiosina y troponina se determinan empíricamente, mediante titulación para conseguir la máxima diferencia en la actividad ATPasa MEDIDA en presencia de EGTA 2 mM frente a la medida en presencia de CaCl₂ 0,1 mM. La concentración exacta de miosina en el ensayo también se determina empíricamente, mediante titulación para conseguir una velocidad deseada de hidrólisis de ATP. Esto cambia entre las preparaciones de proteínas, debido a variaciones en la fracción de moléculas activas en cada preparación.

Las respuestas a la dosis se miden por lo general a la concentración de calcio correspondiente al 25% ó 50% de la actividad ATPasa máxima (pCa₂₅ o pCa₅₀), por lo que se realiza un experimento preliminar para ensayar la respuesta de la actividad ATPasa a concentraciones de calcio libre en el intervalo de 1x10⁻⁴ M a 1x10⁻⁸ M. Posteriormente, la mezcla de ensayo se ajusta a la pCa₅₀ (por lo general 3x10⁻⁷ M). Los ensayos se realizan preparando en primer lugar una serie de diluciones del compuesto de ensayo, cada una con una mezcla de ensayo que contiene Pipes de potasio, MgCl₂, BSA, DTT, piruvato quinasa, lactato deshidrogenasa, subfragmento 1 de miosina, antiespumante, EGTA, CaCl₂ y agua. El ensayo se inicia añadiendo un volumen igual de solución que contienen Pipes de potasio, MgCl₂, BSA, TDT, ATP, NADH, PEP, actina, tropomiosina, troponina, antiespumante y agua. La hidrólisis del ATP se monitoriza mediante la absorbancia a 340 nm. La curva dosis-respuesta resultante se ajusta mediante la ecuación de 4 parámetros $y = \text{Bottom} + \frac{(\text{Top}-\text{Bottom})}{(1 + ((\text{EC50}/X)^{\text{Hill}}))}$ [y = Parte inferior + ((Parte superior-Parte inferior)/(1+((EC50/X)^Hill)))]]. La AC1.4 se define como la concentración a la que la actividad ATPasa es 1,4 veces mayor que la parte inferior de la curva de dosis.

Ensayo de miofibrillas cardíacas: Para evaluar el efecto de las entidades químicas sobre la actividad ATPasa de la miosina cardíaca de longitud completa en el contexto del sarcómero natural, se realizan ensayos de miofibrillas sin membrana. Las miofibrillas cardíacas se obtienen homogeneizando tejido cardíaco en presencia de un detergente no iónico. Tal tratamiento elimina las membranas y la mayoría de las proteínas citoplasmáticas solubles pero deja intacto el aparato de actomiosina sarcomérica cardíaca. Las preparaciones de miofibrillas conservan la capacidad de hidrolizar el ATP de manera controlada por Ca⁺⁺. Las actividades de la ATPasa de tales preparaciones de miofibrillas en presencia y ausencia de ENTIDADES químicas se ensayan a concentraciones de Ca⁺⁺ en todo el intervalo de respuestas al calcio pero dando las concentraciones de calcio preferentes, el 25%, el 50% y el 100% de una velocidad máxima.

Las miofibrillas pueden prepararse a partir de tejido fresco o congelado instantáneamente que se ha descongelado rápidamente. El tejido se pica finamente y se resuspende en un tampón de relajación que contiene los siguientes reactivos (las concentraciones expresadas son las concentraciones de las soluciones finales): Tris-HCl (10 mM), MgCl₂ (2 mM), KCl (75 mM), EGTA (2 mM), NaN₃ (1 mM), ATP (1 mM), fosfocreatina (4 mM), BDM (50 mM), DTT (1 mM), benzamidina (1 mM), PMSF (0,1 mM), leupeptina (1 ug/ml), pepstatina (1 ug/ml) y triton X-100 (1%). El pH se ajusta a 7,2 a 4°C añadiendo HCl. Después de la adición de EDTA a 10 mM, se pica a mano el tejido a 4°C, en una sala fría y se homogeneiza utilizando un gran homogeneizador con rotor-estator (Omni Mixer). Después de mezclar durante 10 s, se sedimenta el material por centrifugación (5 minutos, 2.000x g máx, 4°C). A continuación, se resuspenden las miofibrillas en un tampón convencional que contiene los siguientes reactivos (las concentraciones expresadas son las concentraciones de las soluciones finales): Tris-HCl (10 mM) pH 7,2 a 4°C, MgCl₂ (2 mM), KCl (75 mM), EGTA (2 mM), NaN₃ (1 mM), Triton X-100 (1%), utilizando un triturador de tejidos de vidrio-vidrio (Kontes) hasta quedar sin grumos, por lo general 4-5 pasadas. Los sedimentos de miofibrillas se lavan varias veces mediante homogeneización breve, utilizando el homogeneizador de rotor-estator en 10 volúmenes de tampón convencional, seguido de centrifugación. Para eliminar el detergente, se lavan las miofibrillas varias veces más con tampón convencional sin Triton X-100. A continuación, se someten las miofibrillas a tres rondas de filtración por gravedad utilizando malla de nailon de 600 μm, 300 μm y finalmente de 100 μm (Spectrum Lab Products) para generar mezclas homogéneas y se hacen sedimentar. Finalmente, se resuspenden las miofibrillas en un tampón de almacenamiento que contiene los siguientes reactivos (las concentraciones expresadas son las concentraciones de las soluciones finales): PIPES de potasio (12 mM), MgCl₂ (2 mM) y DTT (1 mM). Se añade sacarosa sólida mientras se agita a 10% (p/v) antes de la congelación en gotas en nitrógeno líquido y almacenamiento a -80°C.

Las respuestas a la dosis se miden utilizando un ensayo de ATPasa acoplada a lactato deshidrogenasa y piruvato quinasa, tamponada con calcio, que contiene los siguientes reactivos (las concentraciones expresadas son las concentraciones de ensayo finales): PIPES de potasio (12 mM), MgCl₂ (2 mM), ATP (0,05 mM), DTT (1 mM), BSA (0,1 mg/ml), NADH (0,5 mM), PEP (1,5 mM), piruvato quinasa (4 U/ml), lactato deshidrogenasa (8 U/ml) y antiespumante (90 ppm). Se ajustó el pH a 6,80 a 22°C añadiendo hidróxido potásico. Los niveles de calcio se controlan mediante un sistema de amortiguación del pH 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. La concentración de miofibrillas en el ensayo final es por lo general de 0,2 mg/ml a 1 mg/ml.

Las respuestas a la dosis se miden por lo general a la concentración de calcio correspondiente al 25%, 50% o 100% de la actividad ATPasa máxima (pCa_{25} , pCa_{50} , pCa_{100}), por lo que se realiza un experimento preliminar para ensayar la respuesta de la actividad ATPasa a concentraciones de calcio libre en el intervalo de 1×10^{-4} M a 1×10^{-8} M. Posteriormente, la mezcla de ensayo se ajusta a la pCa_{50} (por lo general 3×10^{-7} M). Los ensayos se realizan preparando en primer lugar 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 quinasa, lactato deshidrogenasa, miofibrillas cardíacas, antiespumante, EGTA, $CaCl_2$ y agua. El ensayo se inicia añadiendo un volumen igual de solución que contiene Pipes de potasio, $MgCl_2$, BSA, TDT, ATP, NADH, PEP, antiespumante y agua. La hidrólisis de ATP se monitoriza mediante absorbancia a 340 nm. La curva de respuesta a la dosis resultante se ajusta mediante la ecuación de 4 parámetros $y = Bottom + ((Top-Bottom)/(1+((EC50/X)^{Hill})))$. La $AC_{1.4}$ se define como la concentración a la que la actividad ATPasa es 1,4 veces mayor que la parte inferior de la curva de dosis.

Ejemplo 12

Ensayos de miocitos

PREPARACIÓN DE MIOCITOS CARDIACOS VENTRICULARES DE RATA ADULTA. Se anestesia a ratas macho adultas Sprague-Dawley con una mezcla de gas isoflurano y oxígeno. Se extirpan rápidamente los corazones, se lavan y se canaliza la aorta ascendente. Se inicia la perfusión retrógrada continua en los corazones a una presión de perfusión de 60 cm de H_2O . En primer lugar, se perfunden los corazones con una solución de Krebs modificada nominalmente libre de Ca^{2+} de la siguiente composición: NaCl 110 mM, KCl 2,6 mM, KH_2PO_4 1,2 mM, 7 H_2O , $MgSO_4$ 1,2 mM, $NaHCO_3$ 2,1 mM, glucosa 11 mM y Hepes 4 mM (todos de Sigma). Este medio no se hace recircular y se gasea continuamente con O_2 . Al cabo de aproximadamente 3 minutos, se perfunde el corazón con tampón de Krebs modificado complementado con colagenasa al 3,3% (169 μ g/mg de actividad, Clase II, Worthington Biochemical Corp., Freehold, NJ) y una concentración final de calcio 25 μ M hasta que el corazón se vuelve lo suficientemente pálido y blando. Se retira el corazón de las cánulas, se desechan las aurículas y los vasos y se cortan los ventrículos en trozos pequeños. Se dispersan los miocitos mediante agitación suave del tejido ventricular en Krebs con colagenasa de nueva aportación antes de hacerlo pasar suavemente a través de una malla de nailon de 200 μ m en un tubo de 50 cc. Los miocitos resultantes se resuspenden en solución de Krebs modificada que contiene 25 μ M de calcio. Los miocitos se hacen tolerantes al calcio añadiendo una solución de calcio (de reserva 100 mM) a intervalos de 10 minutos hasta que se consigue calcio 100 μ M. Al cabo de 30 minutos, se desecha el sobrenadante y se añaden a las células 30 ml-50 ml de tampón de Tyrode (NaCl 137 mM, KCl 3,7 mM, MgCl 0,5 mM, glucosa 11 mM, Hepes 4 mM y $CaCl_2$ 1,2 mM, pH 7,4). Las células se mantienen durante 60 min a 37°C antes de iniciar los experimentos y se utilizan dentro de las 5 horas siguientes al aislamiento. Las preparaciones de células sólo se utilizan si las células han superado primero los criterios de control de calidad, respondiendo a un estándar (>150% del valor basal) e isoproterenol (ISO; > 250% del valor basal). Además, en los siguientes experimentos se utilizan sólo las células cuya contractilidad basal se encuentra entre un 3% y un 8%.

EXPERIMENTOS DE CONTRACTILIDAD DE LOS MIOCITOS VENTRICULARES ADULTOS. Se colocan alícuotas de tampón de Tyrode que contienen los miocitos, en cámaras de perfusión (serie 20 RC-27NE; Warner Instruments) equipadas con plataformas de calentamiento. Se deja que los miocitos se fijen, se calientan las cámaras a 37°C y a continuación se perfunden las células con tampón de Tyrode a 37°C. Los miocitos se estimulan con campo a 1 Hz con electrodos de platino (20% por encima del umbral). Para los experimentos de contractilidad sólo se utilizan células que tienen estrías claras y son quiescentes antes de la estimulación. Para determinar la contractilidad basal, se crean imágenes de los miocitos a través de un objetivo de 40x y utilizando una cámara de dispositivo de carga acoplada de cadencia variable de toma de imágenes (60 Hz-240 Hz), las imágenes se digitalizan y se muestran en una pantalla de ordenador a una velocidad de muestreo de 240 Hz. [El capturador de imágenes ("frame grabber"), MyoPacer, software de adquisición y análisis para la contractilidad celular están disponibles en IonOptix (Milton, MA)]. Al cabo de un período de contractilidad basal mínimo de 5 minutos, se perfunden en los miocitos los compuestos de ensayo (0,01 μ M a 15 μ M) durante 5 minutos. Después de este tiempo, se perfunde tampón de Tyrode de nueva aportación para determinar las características de lavado del compuesto. Mediante la estrategia de detección de contornos, se registran continuamente la contractilidad de los miocitos y las velocidades de contracción y relajación.

ANÁLISIS DE CONTRACTILIDAD: Por cada entidad química se ensayan tres o más miocitos individuales, utilizando dos o más preparaciones de miocitos diferentes. Para cada célula, se promedian y se comparan veinte o más transitorios de contractilidad en el valor basal (definido como 1 min antes de la perfusión de la entidad química) y después de la adición de la entidad química. Estos transitorios promedio se analizan para determinar cambios en la longitud diastólica y mediante el programa de análisis Ionwizard (IonOptix), se determinan el acortamiento fraccional (% de disminución en la longitud diastólica) y las velocidades de contracción y relajación máximas (μ m/seg). Se combina el análisis de las células individuales. El aumento del acortamiento fraccional sobre el valor basal indica la potenciación de la contractilidad de los miocitos.

ANÁLISIS DEL TRANSITORIO DE CALCIO: *Carga de Fura*: se disuelve Fura-2 (Molecular Probes) permeable a células en cantidades iguales de pluronic (Mol Probes) y FBS durante 10 min a TA. Se prepara una solución de reserva de Fura 1 μM en tampón de Tyrode que contiene probenecid 500 mM (Sigma). Para cargar las células, se añade esta solución a los miocitos a TA. Al cabo de 10 minutos se retira el tampón, se lavan las células con Tyrode que contiene probenecid y se incuban a TA durante 10 min. Se repite este lavado e incubación. Se determinan las mediciones de calcio y contractilidad simultáneas dentro de los 40 minutos siguientes a la carga.

Obtención de imágenes: Se perfunde en las células un compuesto de ensayo. Se determinan las relaciones de transitorio de calcio y contractilidad simultáneas al inicio del estudio y después de la adición del compuesto. Se obtienen imágenes digitales de las células y se determina la contractilidad como se ha descrito anteriormente, utilizando un filtro rojo en la trayectoria de la luz para evitar la interferencia con las mediciones de calcio fluorescente. El hardware y software de adquisición y análisis para el análisis de transitorios de calcio se obtienen de IonOptix. La instrumentación para la medición de la fluorescencia incluye una lámpara de arco de xenón y una fuente de luz de excitación doble Hyperswitch que oscila entre longitudes de onda de 340 y 380 a 100 Hz mediante un espejo accionado por galvanómetro. Una guía de luz llena de líquido suministra luz de excitación doble al microscopio y se determina la fluorescencia de emisión utilizando un tubo fotomultiplicador (PMT). Las rutas de interfaz del sistema de fluorescencia, la señal del PMT y las relaciones se registran mediante el programa de adquisición Ion Wizard.

Análisis: Para cada célula, se promediaron y compararon diez o más transitorios de la relación de calcio y contractilidad en el valor basal y después de la adición del compuesto. Los transitorios medios de contractilidad se analizaron utilizando el programa de análisis Ionwizard para determinar los cambios en la longitud diastólica y el acortamiento fraccional (% de disminución en la longitud diastólica). Los transitorios de la relación de calcio promediados se analizan utilizando el programa de análisis Ionwizard para determinar los cambios en las relaciones diastólica y sistólica y el tiempo hasta el 75% de la línea basal (T_{75}).

DURABILIDAD: Para determinar la durabilidad de la respuesta, se provoca a los miocitos con un compuesto de ensayo durante 25 minutos, seguido de un período de lavado 2 min. La respuesta de contractilidad se compara a los 5 y 25 minutos después de la perfusión del compuesto.

POTENCIAL UMBRAL: Los miocitos se estimulan con campo a una tensión de aproximadamente un 20% por encima del umbral. En estos experimentos la tensión umbral (tensión mínima para estimular las células) se determina empíricamente, la célula se estimula a ese umbral y a continuación se perfunde el compuesto de ensayo. Una vez que la actividad se encuentra en estado de equilibrio, se reduce la tensión durante 20 segundos y a continuación se reinicia. La alteración de los canales iónicos se corresponde con el aumento o la reducción del potencial de acción umbral.

FRECUENCIA Hz: La contractilidad de los miocitos se determina a 3 Hz de la siguiente manera: un instante de tiempo basal de 1 minuto seguido de perfusión del compuesto de ensayo durante 5 minutos seguido de un lavado de 2 minutos. Una vez la contractilidad celular ha vuelto por completo a la línea basal, se reduce la frecuencia Hz a 1. Después de un período de aclimatación inicial, se provoca a la célula con el mismo compuesto. Como esta especie, la rata, presenta una fuerza-frecuencia negativa a 1 Hz, a 3 Hz el FS de la célula debería ser menor, pero la célula todavía debería responder aumentando su acortamiento fraccional en presencia del compuesto.

ADITIVO CON ISOPROTERENOL: Para demostrar que un compuesto actúa a través de un mecanismo diferente que el estimulante adrenérgico isoproterenol, se cargan las células con fura-2 y se determina la medición simultánea de las relaciones de calcio y contractilidad. Los miocitos se provocan secuencialmente con 5 μM o menos de un compuesto de ensayo, tampón, isoproterenol 2 nM, tampón, y una combinación de un compuesto de ensayo e isoproterenol.

50 Ejemplo 13

Modelo *in vitro* de modulación de la miosina ATPasa cardíaca dependiente de la dosis

Se purificaron miosinas cardíacas de bovino y de rata a partir de los respectivos tejidos cardíacos. Las miosinas del músculo esquelético y liso utilizadas en los estudios de especificidad se purificaron a partir de músculo esquelético de conejo y mollejas de pollo, respectivamente. Todas las miosinas utilizadas en los ensayos se convierten en una forma soluble de una sola cabeza (S1) mediante una proteólisis limitada con quimotripsina. Otros componentes del sarcómero: se purifican complejo troponina, tropomiosina y actina a partir de corazones de bovino (sarcómero cardíaco) o de músculo pectoral de pollo (sarcómero esquelético).

La actividad de las miosinas se monitoriza midiendo las velocidades de hidrólisis de ATP. La miosina ATPasa es activada de manera muy significativa por los filamentos de actina. La renovación de ATP se detecta en un ensayo enzimático acoplado utilizando piruvato quinasa (PK) y lactato deshidrogenasa (LDH). En este ensayo cada ADP producido como resultado de la hidrólisis de ATP es reciclado a ATP por la PK con una oxidación simultánea de molécula de NADH por la LDH. La oxidación de NADH puede monitorizarse de manera práctica disminuyendo la absorbancia a una longitud de onda de 340 nm.

Las respuestas a la dosis se miden utilizando un ensayo de ATPasa acoplada a piruvato quinasa y lactato deshidrogenasa, tamponada con calcio, que contiene los siguientes reactivos (las concentraciones expresadas son las concentraciones de ensayo finales): 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 quinasa (4 U/ml), lactato deshidrogenasa (8 U/ml) y antiespumante (90 ppm). Se ajustó el pH a 6,80 a 22°C añadiendo hidróxido potásico. Los niveles de calcio se controlan mediante un sistema de amortiguación del pH 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.

Los componentes proteicos específicos para este ensayo son subfragmento 1 de miosina cardíaca de bovino (por lo general 0,5 μ M), actina cardíaca de bovino (14 μ M), tropomiosina cardíaca de bovino (por lo general 3 μ M) y troponina cardíaca de bovino (por lo general 3 μ M-8 μ M). Las concentraciones exactas de tropomiosina y troponina se determinan empíricamente, mediante titulación para conseguir la máxima diferencia en la actividad ATPasa medida en presencia de EGTA 1 mM frente a la medida en presencia de $CaCl_2$ 0,2 mM. La concentración exacta de la miosina en el ensayo también se determina empíricamente, mediante titulación para conseguir una velocidad deseada de hidrólisis de ATP. Esto cambia entre las preparaciones de proteínas, debido a variaciones en la fracción de moléculas activas en cada preparación.

Las respuestas a la dosis de compuesto se miden por lo general a la concentración de calcio correspondiente al 50% de la actividad ATPasa máxima (pCa_{50}), por lo que se realiza un experimento preliminar para ensayar la respuesta de la actividad ATPasa a concentraciones de calcio libre en el intervalo de 1×10^{-4} M a 1×10^{-8} M. Posteriormente, la mezcla de ensayo se ajusta a la pCa_{50} (por lo general 3×10^{-7} M). Los ensayos se realizan preparando en primer lugar una serie de diluciones del compuesto de ensayo, cada uno con una mezcla de ensayo que contiene Pipes de potasio, $MgCl_2$, BSA, DTT, piruvato quinasa, lactato deshidrogenasa, subfragmento 1 de miosina, antiespumante, EGTA, $CaCl_2$ y agua. El ensayo se inicia añadiendo un volumen igual de solución que contienen Pipes de potasio, $MgCl_2$, BSA, TDT, ATP, NADH, PEP, actina, tropomiosina, troponina, antiespumante y agua. La hidrólisis de ATP se monitoriza mediante la absorbancia a 340 nm. La curva dosis-respuesta resultante se ajusta mediante la ecuación de 4 parámetros $y = Bottom + ((Top-Bottom)/(1+((EC50/X)^{Hill})))$. La AC1.4 se define como la concentración a la que la actividad ATPasa es 1,4 veces mayor que la parte inferior 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 del subfragmento S1 estimulada por actina. Los filamentos de actina en el ensayo están decorados con troponina y tropomiosina y la concentración de Ca^{++} se ajusta a un valor que daría como resultado un 50% de activación máxima. La S1 ATPasa se mide en presencia de una serie de diluciones del compuesto. La concentración de compuesto necesaria para la activación de un 40% por encima de la velocidad ATPasa medida en presencia del control (volumen equivalente de DMSO) se registra como la AC₄₀.

Ejemplo 14

Ensayo de el acortamiento fraccional *in vivo*

ANIMALES. Se utilizan ratas macho Sprague Dawley de Charles River Laboratories (275 g-350 g) para los estudios de perfusión y eficacia de bolo. Los animales con insuficiencia cardíaca se describen más adelante. Se alojan dos por jaula y tienen acceso a alimentos y agua a discreción. Hay un período mínimo de aclimatación de tres días antes de los experimentos.

ECOCARDIOGRAFÍA. Se anestesia a los animales con isoflurano y se mantienen dentro de un plano quirúrgico durante todo el procedimiento. La temperatura interna corporal se mantiene a 37°C utilizando una almohadilla térmica. Una vez anestesiados, se afeita a los animales y se aplica un depilador para eliminar todos los restos de pelo de la zona del tórax. La zona del tórax se prepara adicionalmente con EtOH al 70% y se aplica gel para ultrasonido. Mediante un sistema de ultrasonido GE System Vingmed (General Electric Medical Systems), se coloca en la pared torácica una sonda de 10 MHz y se adquieren las imágenes en la vista del eje corto a nivel de los músculos papilares. Se obtienen imágenes 2-D en modo M del ventrículo izquierdo antes y después de la perfusión o inyección en bolo del compuesto. El acortamiento fraccional *in vivo* ((diámetro diastólico final - diámetro sistólico final)/diámetro diastólico final x 100) se determina mediante el análisis de las imágenes en modo M utilizando el programa de software de GE EchoPak.

EFICACIA DE BOLO Y DE PERFUSIÓN. Para los protocolos de bolo y de perfusión, el acortamiento fraccional se determina mediante ecocardiografía como se ha descrito anteriormente. Para los protocolos de bolo y de perfusión, se obtienen cinco imágenes en modo M previas a la dosis a intervalos de 30 segundos antes de la inyección en bolo o la perfusión de los compuestos. Después de la inyección, se obtienen imágenes en modo M a intervalos de 1 min y de cinco minutos posteriormente hasta 30 min. La inyección en bolo (0,5 mg/kg-5 mg/kg) o la perfusión es a través de un catéter en la vena de la cola. Los parámetros de perfusión se determinan a partir de los perfiles farmacocinéticos de los compuestos. Para la perfusión, los animales recibieron una dosis de carga de 1 minuto seguida inmediatamente de una dosis de perfusión de 29 minutos a través de un catéter en la vena de la cola. La dosis de carga se calcula determinando la concentración diana x el volumen de distribución en estado de equilibrio. La concentración de la dosis de mantenimiento se determina tomando la concentración diana x la

eliminación. Los compuestos se formulan en vehículo cavitron al 25% para los protocolos de bolo y de perfusión. Se extraen muestras de sangre para determinar la concentración plasmática de los compuestos.

Ejemplo 15

5

Hemodinámica en animales normales y con insuficiencia cardíaca

Se anestesia a los animales con isoflurano, se mantienen dentro de un plano quirúrgico y a continuación se afeitan para prepararlos para el cateterismo. Se realiza una incisión en la región del cuello y se despeja y aísla la arteria carótida derecha. Se canaliza en la arteria carótida derecha un catéter de presión Micro-tip de Millar de 2 French (Millar Instruments, Houston, TX) y se hace pasar más allá de la aorta, al ventrículo izquierdo. Se determinan de forma continua las lecturas de presión diastólica final, máx +/- dp/dt, las presiones sistólicas y la frecuencia cardíaca mientras se perfunde el compuesto o el vehículo. Se registran y analizan las mediciones utilizando un PowerLab y el programa de software Chart 4 (ADInstruments, Mountain View, CA). Las mediciones de hemodinámica se realizan a una concentración de perfusión escogida. Se extraen muestras de sangre para determinar la concentración plasmática de los compuestos.

Ejemplo 16

20

Modelo de oclusión de arteria coronaria izquierda de insuficiencia cardíaca congestiva

ANIMALES. En este experimento se utilizaron ratas macho Sprague-Dawley CD (220 g-225 g; Charles River). Los animales tienen libre acceso al agua y a dieta para roedores comercial en condiciones estándar de laboratorio. La temperatura ambiente se mantiene a 20°C-23°C y la iluminación de la sala tiene un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 horas. Los animales se aclimatan al entorno de laboratorio 5 a 7 días antes del estudio. Los animales se mantienen en ayunas durante la noche anterior a la cirugía.

PROCEDIMIENTO DE OCLUSIÓN. Se anestesia a los animales con ketamina/xilazina (95 mg/kg y 5 mg/kg) y se intuban con un catéter intravenoso modificado de calibre 14-16. Se comprueba el nivel de anestesia mediante un pellizco en un dedo. La temperatura interna corporal se mantiene a 37°C mediante una manta calefactora. Se afeita y se limpia la zona de la cirugía. Se coloca al animal en decúbito lateral derecho y se coloca inicialmente en un respirador con una presión inspiratoria máxima de 10 a 15 cm de H₂O y una frecuencia respiratoria de 60-110 respiraciones/min. Se administra a los animales un 100% de O₂ mediante el respirador. El sitio quirúrgico se limpia con lavado quirúrgico y alcohol. Se realiza una incisión en la caja torácica en el 4º y 5º espacio intercostal. Se diseccionan con cuidado los músculos subyacentes para evitar la vena torácica lateral, para exponer los músculos intercostales. Se entra a la cavidad torácica a través del 4º-5º espacio intercostal y se amplía 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 cilíndrica alrededor de la arteria coronaria izquierda cerca de su origen, que se encuentra en contacto con el margen izquierdo del cono arterioso, a aproximadamente 1 mm de la inserción del apéndice auricular izquierdo. Se liga la arteria coronaria izquierda atando la sutura alrededor de la arteria ("LCL"). Los animales del grupo de simulación se tratan de la misma manera, salvo porque no se liga la sutura. La incisión se cierra en tres capas. Se aplica a la rata respiración artificial hasta que puede respirar por sí misma. Se retira la intubación a las ratas y se deja que se recuperen en una almohadilla térmica. Los animales reciben buprenorfina (0,01-0,05 mg/kg, subcutáneo) para la analgesia postoperatoria. Una vez despiertas, se les devuelve a su jaula. Se monitoriza diariamente a los animales para detectar signos de infección o sufrimiento. Se sacrifica a los animales con infección o moribundos. Se pesa a los animales una vez a la semana.

ANÁLISIS DE EFICACIA. Aproximadamente ocho semanas después de la cirugía de infarto, se realiza una exploración a las ratas en busca de signos de infarto de miocardio mediante ecocardiografía. Sólo se utilizan adicionalmente en los experimentos de eficacia los animales con disminución del acortamiento fraccional en comparación con las ratas del grupo de simulación. En todos los experimentos, hay cuatro grupos, simulación + vehículo, simulación + compuesto, LCL + vehículo y LCL + compuesto. A las 10 a 12 semanas después de la LCL, se perfunde a las ratas una concentración de perfusión escogida. Al igual que antes, se obtienen cinco imágenes en modo M previas a la dosis a intervalos de 30 segundos antes de la perfusión de los compuestos y se obtienen imágenes en modo M a intervalos de 30 segundos hasta los 10 minutos y cada minuto o a intervalos de cinco minutos posteriormente. El acortamiento fraccional se determina a partir de las imágenes en modo M. Las comparaciones entre el acortamiento fraccional antes de la dosis y el tratamiento con compuesto se realizan mediante ANOVA y un Student - Newman - Keuls *post-hoc*. Se deja que los animales se recuperen y en 7-10 días, se perfunden de nuevo a los animales los compuestos utilizando el protocolo de hemodinámica para determinar los cambios hemodinámicos de los compuestos en animales con insuficiencia cardíaca. Al final de la perfusión, se sacrifica a las ratas y se determinan los pesos de los corazones.

Cuando se ensayan como se ha descrito en los Ejemplos 10-16, las entidades químicas descritas en el presente documento demuestran tener la actividad deseada.

65

Ejemplo 17**Contractilidad cardíaca *in vitro* e *in vivo* en un modelo de rata de insuficiencia cardíaca**

Se utiliza un ensayo de miofibrillas para identificar los compuestos (activadores de miosina) que activan directamente la miosina ATPasa cardíaca. A continuación se determina el mecanismo celular de acción, la función cardíaca *in vivo* en ratas Sprague Dawley (SD) y la eficacia en ratas SD con insuficiencia cardíaca definida al compuesto activo. Se cuantificó la contractilidad celular utilizando una estrategia de detección de contornos y transitorio de calcio medido utilizando miocitos cardíacos de rata adulta cargados con fura-2. La contractilidad celular aumentó sobre la línea basal dentro de los 5 minutos siguientes a la exposición a un compuesto activo (0,2 μ M) sin modificar el transitorio de calcio. La combinación de compuesto activo con isoproterenol (agonista β -adrenérgico) debería dar como resultado sólo un aumento de aditivo en la contractilidad sin más cambios en el transitorio de calcio, lo que demuestra que el compuesto activo no estaba inhibiendo la vía PDE. La función contráctil *in vivo* en ratas SD anestesiadas se cuantifica mediante ecocardiografía (modo M) y mediciones de presión simultáneas. Se perfunde a ratas SD vehículo o compuesto activo a 0,25-2,5 mg/kg/hr. El compuesto activo debería aumentar el acortamiento fraccional (FS) y la fracción de eyección (EF) de manera dependiente de la dosis sin cambio significativo en las presiones de sangre periférica o de la frecuencia cardíaca, salvo a la dosis más alta. Las ratas con insuficiencia cardíaca definida inducida por la ligadura de la coronaria izquierda o las ratas con tratamiento simulado pueden tener aumentos similares y significativos en la FS y EF cuando se tratan con 0,7-1,2 mg/kg/hr de compuesto activo. En resumen, el compuesto activo aumentó la contractilidad cardíaca sin aumentar el transitorio de calcio y resultó eficaz en un modelo de rata de insuficiencia cardíaca, lo que indica que el compuesto activo puede ser un agente terapéutico útil en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca en seres humanos.

Ejemplo 18**25 Farmacología**

Se investiga la farmacología de al menos una entidad química descrita en el presente documento en miocitos cardíacos aislados de ratas adultas, ratas anestesiadas y en un modelo canino instrumentado crónicamente de insuficiencia cardíaca inducida por infarto de miocardio en combinación con estimulación ventricular rápida. El compuesto activo aumenta la contractilidad del miocito cardíaco ($EC_{20} = 0,2$ M), pero no aumenta la magnitud ni cambia la cinética del transitorio de calcio a concentraciones de hasta 10 M en miocitos cargados con Fura-2. El compuesto activo (30 M) no inhibe la fosfodiesterasa de tipo 3.

En ratas anestesiadas, el compuesto activo aumenta el acortamiento fraccional ecocardiográfico de un 45 5,1% a un 56 4,6% después de una perfusión de 30 minutos a 1,5 mg/kg/h ($n = 6$, $p < 0,01$).

En perros conscientes con insuficiencia cardíaca, el compuesto activo (0,5 mg/kg en bolo, a continuación 0,5 mg/kg/hr i.v. durante 6-8 horas) aumenta el acortamiento fraccional en un 74 7%, el gasto cardíaco en un 45 9%, y el volumen sistólico en un 101 19%. La frecuencia cardíaca disminuye en un 27 4% y la presión de la aurícula izquierda desciende de 22 2 mmHg a 10 2 mmHg ($p < 0,05$ para todos). Además, ni la presión arterial media ni el flujo de sangre coronaria cambian significativamente. La función diastólica no se ve afectada a esta dosis. No hay cambios significativos en el grupo tratado con vehículo. El compuesto activo mejoró la función cardíaca de una manera que sugiere que los compuestos de esta clase pueden ser beneficiosos en pacientes con insuficiencia cardíaca.

45 Ejemplo 19**Composición farmacéutica**

Se prepara una composición farmacéutica para la administración intravenosa de la siguiente manera. 1 mg/ml (como base libre) de solución IV siendo el vehículo ácido cítrico 50 mM, pH ajustado a 5,0 con NaOH:

Composición	Fórmula unitaria (mg/ml)
Agente activo	1,00
Ácido cítrico	10,51
Hidróxido sódico	c.s.p. hasta pH 5,0
Agua para inyectables (WFI)	c.s.p. hasta 1 ml
* Todos los componentes distintos del compuesto activo están en conformidad con la USP / Ph. Eur.	

Se llena un recipiente mezclador adecuado con WFI hasta aproximadamente un 5% del volumen de solución a granel. Se pesa el ácido cítrico (10,51 g), se añade al recipiente mezclador y se agita para producir ácido cítrico 1 M. Se pesa el agente activo (1,00 g) y se disuelve en la solución de ácido cítrico 1 M. La solución resultante

ES 2 522 579 T3

se transfiere a un recipiente mezclador adecuado más grande y se añade WFI hasta aproximadamente un 85% del volumen de solución a granel. Se mide el pH de la solución a granel y se ajusta a 5,0 con NaOH 1 N. La solución se lleva a su volumen final (1 litro) con WFI.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

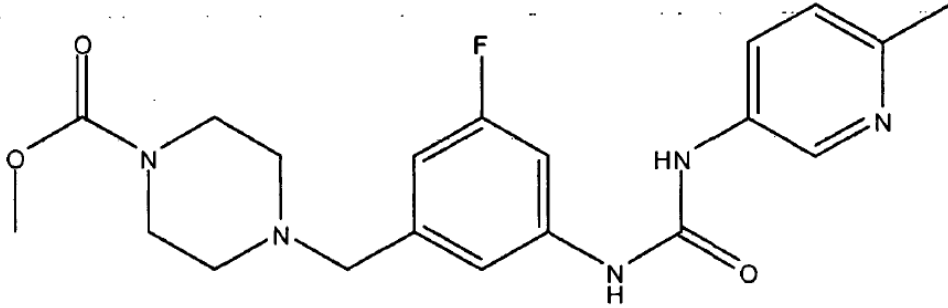
REIVINDICACIONES

1. Compuesto seleccionado de entre:

5 i) 4-[(3-fluoro-5-[(6-metil(3-piridil))amino]carbonilamino)fenil]metil]piperazincarboxilato de metilo

10

15



20

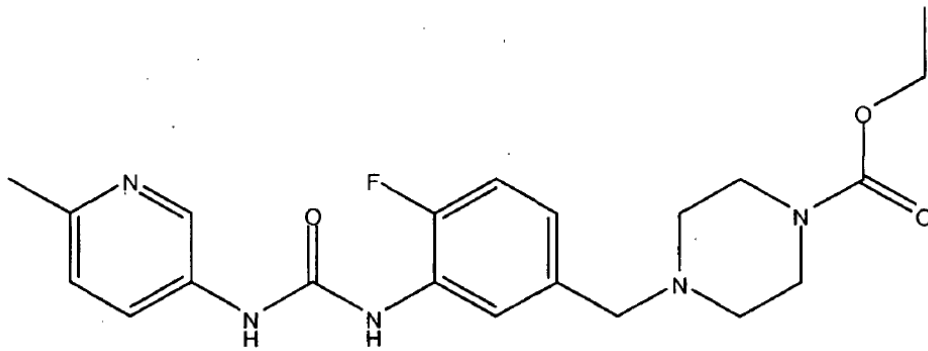
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

ii) 4-[(4-fluoro-3-[(6-metil(3-piridil))amino]carbonilamino)fenil]-metil]piperazincarboxilato de etilo

25

30

35



40

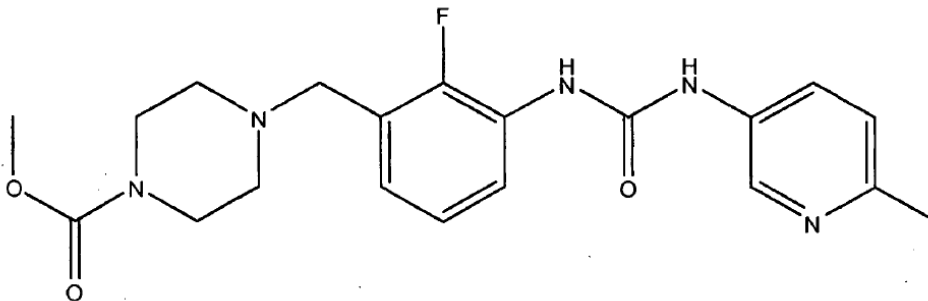
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

iii) 4-[(2-fluoro-3-[(6-metil(3-piridil))amino]carbonilamino)-fenil]metil]piperazincarboxilato de metilo

45

50

55



60

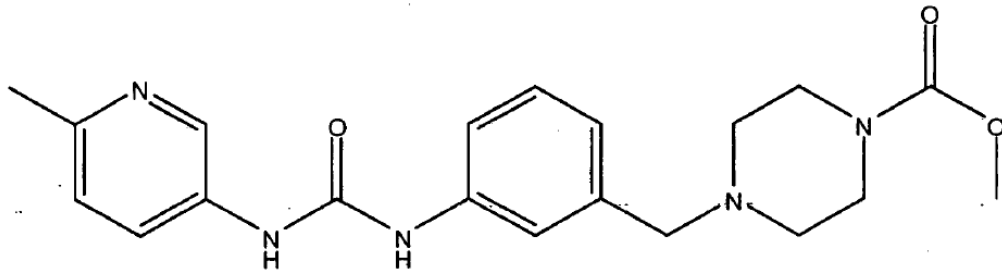
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

iv) 4-[(3-[(6-metil-3-piridil)amino]carbonilamino)fenil]-metil]piperazincarboxilato de metilo

65

5

10

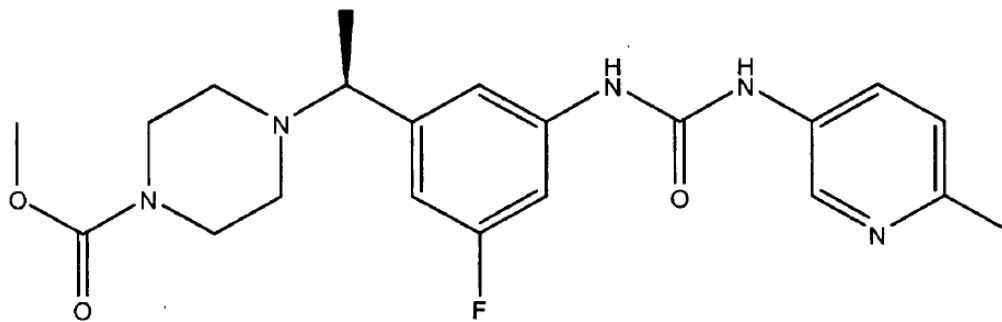


15

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;
v) 4-[(1S)-1-(5-fluoro-3-[(6-metil(3-piridil))amino]carbonilamino)-fenil)etil]piperazincarboxilato de metilo

20

25



30

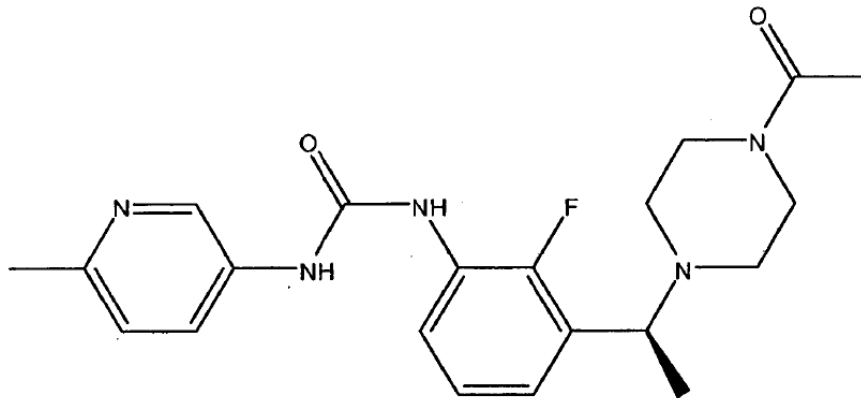
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y
vi) N-{3-[(1S)-1-(4-acetilpiperazinil)etil]-2-fluorofenil}[(6-metil(3-piridil))amino]carboxamida

35

40

45

50



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

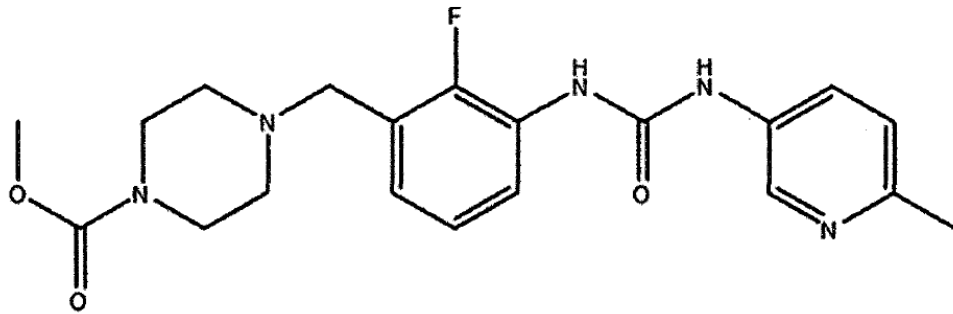
55

2. Compuesto según la reivindicación 1, que es 4-[(2-fluoro-3-[(6-metil(3-piridil))amino]carbonilamino)-fenil)etil]piperazincarboxilato de metilo

60

65

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

3. Composición farmacéutica que comprende un excipiente, vehículo o adyuvante farmacéuticamente aceptable y un compuesto según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

4. Compuesto o composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso en un método de tratamiento de una cardiopatía en un mamífero, método que comprende administrar a un mamífero que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o una composición farmacéutica según la reivindicación 3.

5. Compuesto o composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 4, en el que la cardiopatía es la insuficiencia cardíaca congestiva aguda o descompensada o la insuficiencia cardíaca congestiva crónica.

6. Compuesto o composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 4, en el que la cardiopatía es la disfunción cardíaca sistólica.