(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 786 298**

(51) Int. Cl.:

C07D 235/14	(2006.01)	***C07C 237/06***	(2006.01)	***C07D 241/08***	(2006.01)
A61K 31/165	(2006.01)	***C07C 237/30***	(2006.01)		
A61K 31/166	(2006.01)	***C07D 207/16***	(2006.01)		
A61K 31/401	(2006.01)	***C07D 211/60***	(2006.01)		
A61K 31/4184	(2006.01)	***C07D 401/04***	(2006.01)		
A61K 31/4458	(2006.01)	***C07D 403/04***	(2006.01)		
A61K 31/454	(2006.01)	***C07D 403/06***	(2006.01)		
A61K 31/5377	(2006.01)	***C07D 413/04***	(2006.01)		
A61P 25/00	(2006.01)	***C07D 413/06***	(2006.01)		
A61P 29/00	(2006.01)	***C07D 401/12***	(2006.01)		

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.03.2012** **E 15195678 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2019** **EP 3009427**

(54) Título: **Inhibidores de benzimidazol del canal de sodio**

(30) Prioridad:

03.03.2011 US 201161448923 P
03.03.2011 US 201161448910 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.10.2020

(73) Titular/es:

ZALICUS PHARMACEUTICALS LTD. (100.0%)
2389 Health Sciences Mall, Suite 301
Vancouver, British Columbia V6T 1Z3, CA

(72) Inventor/es:

PAJOUHESH, HASSAN;
HOLLAND, RICHARD;
ZHANG, LINGYUN;
PAJOUHESH, HOSSEIN;
LAMONTAGNE, JASON y
WHELEN, BRENDAN

(74) Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 786 298 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

Inhibidores de benzimidazol del canal de sodio

Campo de la invención

La invención se refiere a compuestos útiles en el tratamiento de afecciones asociadas con la función del canal de iones regulado por voltaje, particularmente condiciones asociadas con actividad del canal de sodio. Más específicamente, la invención se refiere a compuestos de benzimidazol que son útiles en el tratamiento de numerosas enfermedades y afecciones.

Antecedentes de la invención

Los canales de sodio regulados por voltaje (Na_V) están presentes en las neuronas y los tejidos excitables donde contribuyen a procesos como la excitabilidad de la membrana y la contracción muscular (Ogata et al., Jpn. J. Pharmacol. (2002) 88(4) 365-77). Nueve subunidades α transmembrana diferentes ($Na_V1,1$-$1,9$) de una familia individual Na_V1 se combinan con subunidades β auxiliares que modifican la función del canal para formar canales funcionales de Na_V. De las nueve isoformas de la subunidad α de Na_V1, cinco se expresan en el ganglio de la raíz dorsal, donde participan en el establecimiento del potencial de membrana en reposo y el umbral para generar potenciales de acción, y también contribuyen al recorrido ascendente también como al disparo de los potenciales de acción durante la despolarización sostenida. En particular, los subtipos de canales $Na_V1,7$ sensibles a la tetrodotoxina (TTX) e insensibles a TTX $Na_V1,8$ actúan como los principales contribuyentes al dolor inflamatorio y neuropático (Momin et al., Curr Opin Neurobiol. 18(4):383-8, 2008; Rush et al., J Physial. 579(Pt 1):1-14, 2007).

Los documentos WO 2011/026241 A1, WO 2007/118853 A1 y WO 2008/008398 A2 divulgan compuestos heterocíclicos sustituidos para el tratamiento de dolor y epilepsia.

Por lo tanto, se desean nuevos moduladores alostéricos de canales iónicos regulados por voltaje (por ejemplo, canales de sodio). Los moduladores pueden afectar la cinética y/o los potenciales de voltaje de, por ejemplo, los canales $Na_V1,7$ y/o $Na_V1,8$.

Sumario de la invención

La invención se refiere a compuestos útiles en condiciones moduladas por canales de iones regulados por voltaje (por ejemplo, canales de sodio regulados por voltaje).

La invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

En un primer aspecto, la invención presenta un compuesto que tiene una estructura como se define en las reivindicaciones adjuntas.

En otro aspecto, la invención presenta una composición farmacéutica que incluye cualquiera de los compuestos de la invención y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se formula en forma de dosificación unitaria (por ejemplo, un comprimido, comprimido oblongo, cápsula, comprimido masticable, película, tira, cápsula de gel o jarabe).

En otro aspecto más, la invención presenta los compuestos de la invención para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección administrando a un sujeto que necesita dicho tratamiento una cantidad eficaz de cualquiera de los compuestos de la invención, o una composición farmacéutica de los mismos.

En ciertas realizaciones, la enfermedad o afección es dolor, epilepsia, enfermedad de Parkinson, un trastorno del estado de ánimo (por ejemplo, un trastorno depresivo mayor (por ejemplo, depresión atípica, depresión melancólica, depresión mayor psicótica, depresión catatónica, depresión posparto, trastorno afectivo estacional, distimia y trastorno depresivo no especificado (DD-NOS)), depresión breve recurrente, trastorno depresivo menor o trastorno bipolar), psicosis (por ejemplo, esquizofrenia), tinnitus, esclerosis lateral amiotrópica, glaucoma, isquemia, trastornos de espasticidad, trastorno obsesivo compulsivo, síndrome de piernas inquietas y síndrome de Tourette.

En algunas realizaciones, el sujeto es un sujeto en ayunas.

En ciertas realizaciones, el sujeto es un sujeto alimentado.

En otras realizaciones, la afección es dolor o epilepsia.

En algunas realizaciones, el dolor es dolor inflamatorio (por ejemplo, dolor inflamatorio causado por artritis reumatoide, artritis idiopática juvenil, espondilitis anquilosante, artritis psoriásica, enfermedad inflamatoria intestinal, dismenorrea primaria o endometriosis) o dolor neuropático.

En ciertas realizaciones, el dolor es dolor crónico.

En realizaciones adicionales, el dolor crónico es dolor neuropático periférico; dolor neuropático central, dolor musculoesquelético, dolor de cabeza, dolor visceral o dolor mixto.

En algunas realizaciones, el dolor neuropático periférico es neuralgia postherpética, dolor neuropático diabético, dolor neuropático por cáncer, neuropatía asociada al VIH, eritromelalgia, síndrome de cirugía de espalda fallida, neuralgia trigeminal o dolor de miembro fantasma; dicho dolor neuropático central es dolor relacionado con la esclerosis múltiple, dolor relacionado con la enfermedad de Parkinson, dolor postaccidente cerebrovascular, dolor postraumático por lesión de la médula espinal, radiculopatía lumbosacra, radiculopatía cervical, radiculopatía braquial o dolor en demencia; el dolor musculoesquelético es dolor osteoartrítico y síndrome de fibromialgia; dolor inflamatorio tal como artritis reumatoide o endometriosis; la cefalea es migraña, cefalea en racimos, síndrome de cefalea por tensión, dolor facial o cefalea causada por otras enfermedades; el dolor visceral es cistitis intersticial, síndrome del intestino irritable o síndrome de dolor pélvico crónico; o el dolor mixto es dolor lumbar, dolor de cuello y hombro, síndrome de boca ardiente o síndrome de dolor regional complejo.

En otras realizaciones, la cefalea es migraña.

En ciertas realizaciones, el dolor es dolor agudo.

En otras realizaciones, el dolor agudo es dolor nociceptivo o dolor postoperatorio.

El término "alcoxi" representa un sustituyente químico de fórmula -OR, donde R es un grupo alquilo C1-C6 opcionalmente sustituido, a menos que se especifique lo contrario. En algunas realizaciones, el grupo alquilo puede estar sustituido, por ejemplo, el grupo alcoxi puede tener 1, 2, 3, 4, 5 o 6 grupos sustituyentes como se define en la presente memoria.

El término "alcoxialquilo" representa un grupo heteroalquilo, como se define en la presente memoria, que se describe como un grupo alquilo que está sustituido con un grupo alcoxi. Los ejemplos de grupos alcoxialquilo no sustituidos incluyen entre 2 y 12 carbonos. En algunas realizaciones, el alquilo y el alcoxi pueden estar cada uno adicionalmente sustituido con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se define en la presente memoria para el grupo respectivo.

Como se usa en la presente memoria, el término "alquilo", "alquenilo" y "alquinilo" incluyen sustituyentes monovalentes de cadena lineal, cadena ramificada y cíclica, así como combinaciones de estos, que contienen solo C y H cuando no están sustituidos. Los ejemplos incluyen metilo, etilo, isobutilo, ciclohexilo, ciclopentiletilo, 2-propenilo, 3-butinilo y similares. El término "cicloalquilo", como se usa en la presente memoria, representa un grupo alquilo cíclico no aromático saturado o insaturado monovalente que tiene entre tres y nueve carbonos (por ejemplo, un cicloalquilo C3-C9), a menos que se especifique lo contrario, y se ejemplifica por ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, biciclo [2.2.1.]heptilo y similares. Cuando el grupo cicloalquilo incluye un doble enlace carbono-carbono, el grupo cicloalquilo puede denominarse como un grupo "cicloalquenilo". Los ejemplos de grupos cicloalquenilo incluyen ciclopentenilo, ciclohexenilo y similares.

Típicamente, los grupos alquilo, alquenilo y alquinilo contienen 1-12 carbonos (por ejemplo, alquilo C1-C12) o 2-12 carbonos (por ejemplo, alquenilo C2-C12 o alquinilo C2-C12). En algunas realizaciones, los grupos alquilo son grupos alquilo C1-C8, C1-C6, C1-C4, C1-C3 o C1-C2; o C2-C8, C2-C6, C2-C4 o grupos alquenilo o alquinilo C2-C3. Además, cualquier átomo de hidrógeno en uno de estos grupos puede reemplazarse con un sustituyente como se describe en la presente memoria.

Heteroalquilo, heteroalquenilo y heteroalquinilo se definen de manera similar y contienen al menos un átomo de carbono, pero también contienen uno o más heteroátomos O, S o N o combinaciones de estos dentro del residuo del esqueleto principal, por lo que cada heteroátomo en el grupo heteroalquilo, heteroalquenilo o heteroalquinilo reemplaza un átomo de carbono del grupo alquilo, alquenilo o alquinilo al que corresponde el heteroformo. En algunas realizaciones, los grupos heteroalquilo, heteroalquenilo y heteroalquinilo tienen C en cada terminal al que el grupo está unido a otros grupos, y el heteroátomo o heteroátomos presentes no están ubicados en una posición terminal. Como se entiende en la técnica, estas heteroformas no contienen más de tres heteroátomos contiguos. En algunas realizaciones, el heteroátomo es O o N. El término "heterociclilo", como se usa en la presente memoria, representa heteroalquilo o heteroalquenilo cíclico que es, por ejemplo, un anillo de 3-, 4-, 5-, 6- o 7- miembros, a menos que se especifique lo contrario, que contiene uno, dos, tres o cuatro heteroátomos seleccionados independientemente del grupo que consiste en nitrógeno, oxígeno y azufre. El anillo de 5 miembros tiene cero a dos dobles enlaces, y los anillos de 6- y 7- miembros tienen cero a tres dobles enlaces. El término "heterociclilo" también representa un compuesto heterocíclico que tiene una estructura multicíclica con puente en la que uno o más carbonos y/o heteroátomos conectan con puentes dos miembros no adyacentes de un anillo monocíclico, por ejemplo, un grupo quinuclidinilo. El término "heterociclilo" incluye grupos bicíclicos, tricíclicos y tetracíclicos en los cuales cualquiera de los anillos heterocíclicos anteriores se fusiona a uno, dos o tres anillos carbocíclicos, por ejemplo, un anillo arilo, un anillo ciclohexano, un anillo ciclohexeno, un anillo ciclopentano, un anillo ciclopenteno u otro anillo heterocíclico monocíclico, tal como indolilo, quinolilo, isoquinolilo, tetrahidroquinolilo, benzofurilo, benzotienilo y similares.

El número designado de carbonos en heteroformas de alquilo, alquenilo y alquinilo incluye el recuento de heteroátomos. Por ejemplo, si heteroalquilo se define como C1-C6, contendrá 1-6 átomos de C, N, O o S de manera que el heteroalquilo contenga al menos un átomo de C y al menos un heteroátomo, por ejemplo 1-5 carbonos y 1

átomo de N, o 1-4 carbonos y 2 átomos de N. De manera similar, cuando el heteroalquilo se define como C1-C6 o C1-C4, contendrá 1-5 carbonos o 1-3 carbonos respectivamente, es decir, al menos un C se reemplaza por O, N o S. En consecuencia, cuando heteroalquenilo o heteroalquinilo se define como C2-C6 (o C2-C4), contendría 2-6 o 2-4 átomos de C, N, O o S, ya que el heteroalquenilo o heteroalquinilo contiene al menos un átomo de carbono y al menos un heteroátomo, por ejemplo, 2-5 carbonos y 1 átomo de N, o 2-4 carbonos, y 2 átomos de O. Además, los sustituyentes heteroalquilo, heteroalquenilo o heteroalquinilo también pueden contener uno o más grupos carbonilo. Los ejemplos de grupos heteroalquilo, heteroalquenilo y heteroalquinilo incluyen CH_2OCH_3, $CH_2N(CH_3)_2$, CH_2OH, $(CH_2)_nNR_2$, OR, COOR, $CONR_2$, $(CH_2)_nOR$, $(CH_2)_n$ COR, $(CH_2)_nCOOR$, $(CH_2)_nSR$, $(CH_2)_nSOR$, $(CH_2)_nSO_2R$, $(CH_2)_nCONR_2$, NRCOR, NRCOOR, $OCONR_2$, OCOR y similares en donde el grupo R contiene al menos un C y el tamaño del sustituyente es consistente con la definición de, por ejemplo, alquilo, alquenilo y alquinilo, como se describe en la presente memoria (por ejemplo, n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12).

Como se usa en la presente memoria, los términos "alquileno", "alquenileno" y "alquinileno", o el prefijo "alqu" se refieren a grupos divalentes o trivalentes que tienen un tamaño especificado, típicamente C1-C2, C1-C3, C1-C4, C1-C6 o C1-C8 para los grupos saturados (por ejemplo, alquileno o alqu) y C2-C3, C2-C4, C2-C6 o C2-C8 para los grupos insaturados (por ejemplo, alquenileno o alquinileno). Ellos incluyen formas de cadena lineal, cadena ramificada y cíclicas, así como combinaciones de estas, que contienen solo C y H cuando no están sustituidas. Debido a que son divalentes, pueden unir dos partes de una molécula, como lo ejemplifica X en los compuestos descritos en la presente memoria. Ejemplos son metileno, etileno, propileno, ciclopropan-1,1-diilo, etilideno, 2-buteno-1,4-diilo y similares. Estos grupos pueden estar sustituidos por los grupos típicamente adecuados como sustituyentes para grupos alquilo, alquenilo y alquinilo como se establece la presente memoria. Por lo tanto, C=O es un alquileno C1 que está, por ejemplo, sustituido por =O. Por ejemplo, el término "alcarilo", como se usa en la presente memoria, representa un grupo arilo, como se define en la presente memoria, unido al grupo molecular parental a través de un grupo alquileno, como se define en la presente memoria, y el término "alqu-heteroarilo" se refiere a un grupo heteroarilo, como definido en la presente memoria, unido al grupo molecular parental a través de un grupo alquileno, como se define en la presente memoria. El alquileno y el grupo arilo o heteroarilo están cada uno opcionalmente sustituido como se describe en la presente memoria.

Heteroalquileno, heteroalquenileno y heteroalquinileno se definen de manera similar como grupos divalentes que tienen un tamaño especificado, típicamente C1-C3, C1-C4, C1-C6 o C1-C8 para los grupos saturados y C2-C3, C2-C4, C2-C6, o C2-C8 para los grupos insaturados. Ellos incluyen grupos de cadena lineal, cadena ramificada y cíclicos, así como combinaciones de estos, y además contienen al menos un átomo de carbono, pero también contienen uno o más heteroátomos O, S o N o combinaciones de estos dentro del residuo del esqueleto principal, por lo que cada heteroátomo en el grupo heteroalquileno, heteroalquenileno o heteroalquinileno reemplaza un átomo de carbono del grupo alquileno, alquenileno o alquinileno al que corresponde el heteroformo. Como se entiende en la técnica, estas heteroformas no contienen más de tres heteroátomos contiguos.

El término "alquilsulfonilo", como se usa en la presente memoria, representa un grupo heteroalquilo que se describe como un grupo alquilo opcionalmente sustituido, como se describe en la presente memoria, que incluye un grupo -$S(O)_2$-.

El término "amino", como se usa en la presente memoria, representa $-N(R^{N1})_2$, en el que cada R^{N1} es, independientemente, H, OH, NO_2, $N(R^{N2})_2$, SO_2OR^{N2}, SO_2R^{N2}, SOR^{N2}, $SO_2N(R^{N2})_2$, $SON(R^{N2})_2$, un grupo protector de N, alquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, arilo, alcarilo, cicloalquilo, alqu-cicloalquilo, heterociclilo (por ejemplo, heteroarilo), alquheterociclilo (por ejemplo, alqu-heteroarilo), o dos R^{N1} se combinan para formar un heterociclilo o un grupo protector de N, y en el que cada R^{N2} es, independientemente, H, alquilo o arilo. En una realización preferida, amino es $-NH_2$ o $-NHR^{N1}$, en el que R^{N1} es, independientemente, OH, NO_2, NH_2, $NR^{N2}{}_2$, SO_2ORN^2, SO_2R^{N2}, SOR^{N2}, $SO_2N(R^{N2})_2$, $SON(R^{N2})_2$, alquilo o arilo, y cada R^{N2} puede ser H, alquilo o arilo. El término "aminoalquilo", como se usa en la presente memoria, representa un grupo heteroalquilo, como se define en la presente memoria, que se describe como un grupo alquilo, como se define en la presente memoria, sustituido por un grupo amino, como se define en la presente memoria. El alquilo y amino pueden estar cada uno adicionalmente sustituido con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se describe en la presente memoria para el grupo respectivo. Por ejemplo, la fracción alquilo puede comprender un sustituyente oxo(=O).

La fracción "aromática" o la fracción "arilo" se refiere a cualquier sistema monocíclico o bicíclico de anillo fusionado que tiene las características de aromaticidad en términos de distribución de electrones en todo el sistema de anillo e incluye una fracción monocíclica o bicíclica fusionada tal como fenilo o naftilo; "heteroaromático" o "heteroarilo" también se refiere a tales sistemas de anillos monocíclicos o bicíclicos fusionados que contienen uno o más heteroátomos seleccionados de O, S y N. La inclusión de un heteroátomo permite que la inclusión de anillos de 5 miembros se considere aromática así como anillos de 6 miembros. Por lo tanto, los sistemas aromáticos/heteroaromáticos típicos incluyen piridilo, pirimidilo, indolilo, benzimidazolilo, benzotriazolilo, isoquinolilo, quinolilo, benzotiazolilo, benzofuranilo, tienilo, furilo, pirrolilo, tiazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, benzoxazolilo, benzoisoxazolilo, imidazolilo y similares. Debido a que los tautómeros son teóricamente posibles, el ftalimido también se considera aromático. Típicamente, los sistemas de anillo contienen 5-12 átomos del miembro del anillo o 6-10 átomos del miembro del anillo. En algunas realizaciones, la fracción aromática o heteroaromática es un sistema de anillos aromáticos de 6 miembros que contiene opcionalmente 1-2 átomos de nitrógeno. Más particularmente, la fracción es un fenilo opcionalmente sustituido, piridilo, indolilo, pirimidilo, piridazinilo, benzotiazolilo o benzimidazolilo,

pirazolilo, imidazolilo, isoxazolilo, tiazolilo, benzotiazolilo, indolilo. Aún más particularmente, tal fracción es fenilo, piridilo o pirimidilo y aún más particularmente, es fenilo.

"O-arilo" u "O-heteroarilo" se refiere a sistemas aromáticos o heteroaromáticos que están acoplados a otro residuo a través de un átomo de oxígeno. Un ejemplo típico de un O-arilo es fenoxi. De manera similar, "arilalquilo" se refiere a sistemas aromáticos y heteroaromáticos que están acoplados a otro residuo a través de una cadena de carbono, saturada o insaturada, típicamente de C1-C8, C1-C6, o más particularmente C1-C4 o C1-C3 cuando están saturados o C2-C8, C2-C6, C2-C4 o C2-C3 cuando no están saturados, incluidas sus heteroformas. Para mayor certeza, el arilalquilo incluye así un grupo arilo o heteroarilo como se definió anteriormente conectado a una fracción alquilo, heteroalquilo, alquenilo, heteroalquenilo, alquinilo o heteroalquinilo también como se definió anteriormente. Los arilalquilos típicos serían un arilo(C6-C12)alquilo(C1-C8), arilo(C6-C12)alquenilo(C2-C8) o arilo(C6-C12)alquinilo(C2-C8), más las heteroformas. Un ejemplo típico es el fenilmetilo, comúnmente denominado bencilo.

Halo puede ser cualquier átomo de halógeno, especialmente F, Cl, Br o I, y más particularmente es flúor o cloro.

El término "haloalquilo", como se usa en la presente memoria, representa un grupo alquilo, como se define en la presente memoria, sustituido por un grupo halógeno (es decir, F, Cl, Br o I). Un haloalquilo puede estar sustituido con uno, dos, tres o, en el caso de grupos alquilo de dos carbonos o más, cuatro halógenos. Los grupos haloalquilo incluyen perfluoroalquilos. En algunas realizaciones, el grupo haloalquilo puede estar adicionalmente sustituido con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se describe en la presente memoria para grupos alquilo.

El término "hidroxi", como se usa en la presente memoria, representa un grupo -OH.

El término "hidroxialquilo", como se usa en la presente memoria, representa un grupo alquilo, como se define en la presente memoria, sustituido con uno a tres grupos hidroxi, con la condición de que no se pueda unir más de un grupo hidroxi a un átomo de carbono individual del grupo alquilo, y se ejemplifica por hidroximetilo, dihidroxipropilo y similares.

El término "grupo protector de N", como se usa en la presente memoria, representa aquellos grupos destinados a proteger un grupo amino contra reacciones indeseables durante los procedimientos sintéticos. Los grupos protectores de N comúnmente utilizados se divulgan en Greene, "Protective Groups in Organic Synthesis," 3rd Edition (John Wiley & Sons, New York, 1999). Los grupos protectores de N incluyen grupos acilo, ariloilo o carbamilo tales como formilo, acetilo, propionilo, pivaloilo, t-butilacetilo, 2-cloroacetilo, 2-bromoacetilo, trifluoroacetilo, tricloroacetilo, ftalilo, o-nitrofenoxiacetilo, α-clorobutirilo, benzoilo, 4-clorobenzoilo, 4-bromobenzoilo, 4-nitrobenzoilo y auxiliares quirales tales como D, L protegidos o no protegidos, o D L-aminoácidos, tales como alanina, leucina, fenilalanina y similares; grupos que contienen sulfonilo tales como bencenosulfonilo, p-toluenosulfonilo y similares; grupos que forman carbamato tales como benciloxicarbonilo, p-clorobenciloxicarbonilo, p-metoxibenciloxicarbonilo, p-nitrobenciloxicarbonilo, 2-nitrobenciloxicarbonilo, p-bromobenciloxicarbonilo, 3,4-dimetoxibenciloxicarbonilo, 3,5-dimetoxibenciloxicarbonilo, 2,4-dimetoxibenciloxicarbonilo, 4-metoxibenciloxicarbonilo, 2-nitro-4,5-dimetoxibenciloxicarbonilo, 3,4,5-trimetoxibenciloxicarbonilo, 1-(p-bifenilil)-1-metiletoxicarbonilo, α,α-dimetil-3,5-dimetoxibenciloxicarbonilo, benzhidriloxicarbonilo, t-butiloxicarbonilo, diisopropilmetoxiproxicarbonilo, isopropiloxicarbonilo, etoxicarbonilo, metoxicarbonilo, aliloxicarbonilo, 2,2,2,-tricloroetoxicarbonilo, fenoxicarbonilo, 4-nitrofenoxicarbonilo, fluorenil-9-metoxicarbonilo, ciclopentiloxicarbonilo, adamantiloxicarbonilo, ciclohexiloxicarbonilo, feniltiocarbonilo, y similares, grupos alcarilo tales como bencilo, trifenilmetilo, benciloximetilo y similares y grupos sililo tales como trimetilsililo y similares. Los grupos protectores de N preferidos son formilo, acetilo, benzoilo, pivaloilo, t-butilacetilo, alanilo, fenilsulfonilo, bencilo, t-butiloxicarbonilo (Boc) y benciloxicarbonilo (Cbz).

En general, un grupo sustituyente (por ejemplo, alquilo, alquenilo, alquinilo o arilo (que incluye todas las heteroformas definidas anteriormente) puede estar opcionalmente sustituido por sustituyentes adicionales. La naturaleza de estos sustituyentes es similar a la mencionada con respecto a los sustituyentes en las estructuras básicas anteriores. Por lo tanto, donde una realización de un sustituyente es alquilo, este alquilo puede estar opcionalmente sustituido por los sustituyentes restantes enumerados como sustituyentes donde esto tiene sentido químico, y donde esto no socava el límite de tamaño de alquilo per se; por ejemplo, alquilo sustituido por alquilo o por alquenilo simplemente extendería el límite superior de átomos de carbono para estas realizaciones, y no está incluido. Por ejemplo, cuando un grupo está sustituido, el grupo puede estar sustituido con 1, 2, 3, 4, 5, o 6 sustituyentes. Los sustituyentes opcionales incluyen, pero no se limitan a: alquilo o heteroarilo C1-C6, alquenilo o heteroalquenilo C2-C6, alquinilo o heteroalquinilo C2-C6, halógeno; arilo, heteroarilo, azido(-N_3), nitro (-NO_2), ciano (-CN), aciloxi(-OC(=O)R'), acilo (-C(=O)R'), alcoxi (-OR'), amido(-NR'C(=O)R" o -C(=O)NRR'), amino (-NRR'), ácido carboxílico (-CO_2H), éster carboxílico (-CO_2R'), carbamoil (-OC(=O)NR'R" o -NRC(=O)OR'), hidroxi (-OH), isociano (-NC), sulfonato (-S(=O)$_2$OR), sulfonamida (-S(=O)$_2$NRR' o-NRS(=O)$_2$R'), o sulfonilo (-S(=O)$_2$R), donde cada R o R' se selecciona, independientemente, de H, alquilo o heteroarilo C1-C6, alquenilo o heteroalquenilo C2-C6, alquinilo o heteroalquinilo 2C-6C, arilo, o heteroarilo. Un grupo sustituido puede tener, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 sustituyentes.

Los sustituyentes opcionales típicos en grupos aromáticos o heteroaromáticos incluyen independientemente halo, CN, NO_2, CF_3, OCF_3, COOR', CONR'$_2$, OR', SR', SOR', SO_2R', NR'$_2$, NR'(CO)R', NR'C(O)OR', NR'C(O)NR'$_2$, NR'SO_2NR'$_2$, o NR'SO_2R', en el que cada R' es independientemente H o un grupo opcionalmente sustituido seleccionado de alquilo, alquenilo, alquinilo, heteroalquilo, heteroalquenilo, heteroalquinilo, heteroarilo y arilo (todos como se definieron

anteriormente); o el sustituyente puede ser un grupo opcionalmente sustituido seleccionado de alquilo, alquenilo, alquinilo, heteroalquilo, heteroalquenilo, heteroalquinilo, arilo, heteroarilo, O-arilo, O-heteroarilo y arilalquilo.

Los sustituyentes opcionales en un grupo no aromático (por ejemplo, grupos alquilo, alquenilo y alquinilo), se seleccionan típicamente de la misma lista de sustituyentes adecuados para grupos aromáticos o heteroaromáticos, excepto que se indique lo contrario en la presente memoria. Un grupo no aromático también puede incluir un sustituyente seleccionado de =O y =NOR' donde R' es H o un grupo opcionalmente sustituido seleccionado de alquilo, alquenilo, alquinilo, heteroalquilo, heteroalquenilo, heteralquinilo, heteroarilo y arilo (todo como se define anteriormente).

El término una "cantidad efectiva" de un agente (por ejemplo, un compuesto de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas (I)-(XIII) o cualquiera de los Compuestos (1)-(236) de la Tabla 1), como se usa en la presente memoria, es esa cantidad suficiente para lograr resultados beneficiosos o deseados, como resultados clínicos, y, como tal, una "cantidad efectiva" depende del contexto en el que se aplica. Por ejemplo, en el contexto de administrar un agente que es un modulador de un canal de iones regulado por voltaje (por ejemplo, un canal de sodio como $Na_V1,7$ o $Na_V1,8$), una cantidad efectiva de un agente es, por ejemplo, una cantidad suficiente para lograr un cambio en la actividad del canal de sodio en comparación con la respuesta obtenida sin la administración del agente.

El término "composición farmacéutica", como se usa en la presente memoria, representa una composición que contiene un compuesto descrito en la presente memoria (por ejemplo, un compuesto de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas (I)-(XIII) o cualquiera de los Compuestos (1)-(236) de la Tabla 1) formulado con un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se fabrica o vende con la aprobación de una agencia reguladora gubernamental como parte de un régimen terapéutico para el tratamiento de la enfermedad en un mamífero. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse, por ejemplo, para administración oral en forma de dosificación unitaria (por ejemplo, un comprimido, cápsula, comprimido oblongo, cápsula de gel o jarabe); para administración tópica (por ejemplo, como crema, gel, loción o pomada); para administración intravenosa (por ejemplo, como una solución estéril libre de émbolos en partículas y en un sistema disolvente adecuado para uso intravenoso); o en cualquier otra formulación descrita en la presente memoria.

Un "excipiente farmacéuticamente aceptable", como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier ingrediente distinto de los compuestos descritos en la presente memoria (por ejemplo, un vehículo capaz de suspender o disolver el compuesto activo) y que tiene las propiedades de no ser tóxico ni inflamatorio en un paciente. Los excipientes pueden incluir, por ejemplo: antiadherentes, antioxidantes, aglomerantes, recubrimientos, auxiliares de compresión, desintegrantes, pigmentos (colores), emolientes, emulsionantes, agentes de relleno (diluyentes), formadores de película o recubrimientos, sabores, fragancias, deslizantes (potenciadores de flujo), lubricantes, conservantes, tintas de impresión, sorbentes, agentes de suspensión o dispersantes, edulcorantes o aguas de hidratación. Los excipientes ejemplares incluyen, pero no se limitan a: hidroxitolueno butilado (BHT), carbonato de calcio, fosfato de calcio (dibásico), estearato de calcio, croscarmelosa, polivinilpirrolidona entrecruzada, ácido cítrico, crospovidona, cisteína, etilcelulosa, gelatina, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, lactosa, estearato de magnesio, maltitol, manitol, metionina, metilcelulosa, metil parabeno, celulosa microcristalina, polietilenglicol, polivinilpirrolidona, povidona, almidón pregelatinizado, propilparabeno, palmitato de retinilo, goma laca, dióxido de silicio, carboximetil celulosa de sodio, citrato de sodio, almidón glicolato de sodio, sorbitol, almidón (maíz), ácido esteárico, ácido esteárico, sacarosa, talco, dióxido de titanio, vitamina A, vitamina E, vitamina C y xilitol.

El término "profármacos farmacéuticamente aceptables" como se usa en la presente memoria, representa aquellos profármacos de los compuestos de la presente invención que, dentro del alcance de un criterio médico sólido, son adecuados para su uso en contacto con los tejidos de humanos y animales con toxicidad indebida, irritación, respuesta alérgica, y similares, proporcionales a una proporción beneficio/riesgo razonable, y eficaces para su uso previsto, así como las formas zwitteriónicas, donde sea posible, de los compuestos de la invención.

El término "sal farmacéuticamente aceptable", como se usa en la presente memoria, representa aquellas sales de los compuestos descritos aquí (por ejemplo, un compuesto de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas (I)-(XIII) o cualquiera de los Compuestos (1)-(236) de la Tabla 1) que están, dentro del alcance de un criterio médico sólido, adecuados para su uso en contacto con los tejidos de humanos y animales sin toxicidad indebida, irritación, respuesta alérgica y similares, y son proporcionales a una razonable proporción beneficio/riesgo. Las sales farmacéuticamente aceptables son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, las sales farmacéuticamente aceptables se describen en: Berge et al., J. Pharmaceutical Sciences 66:1-19, 1977 y en Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use, (Eds. P.H. Stahl and C.G. Wermuth), Wiley-VCH, 2008. Las sales se pueden preparar in situ durante el aislamiento final y la purificación de los compuestos descritos en la presente memoria o por separado haciendo reaccionar el grupo de base libre con un ácido orgánico adecuado.

Los compuestos de la invención pueden tener grupos ionizables para poder prepararse como sales farmacéuticamente aceptables. Estas sales pueden ser sales de adición de ácido que implican ácidos inorgánicos u orgánicos o las sales pueden, en el caso de formas ácidas de los compuestos de la invención, prepararse a partir de bases inorgánicas u orgánicas. Con frecuencia, los compuestos se preparan o usan como sales farmacéuticamente aceptables preparadas como productos de adición de ácidos o bases farmacéuticamente aceptables. Los ácidos y bases farmacéuticamente aceptables adecuados son bien conocidos en la técnica, tales como ácidos clorhídrico, sulfúrico, bromhídrico, acético,

láctico, cítrico o tartárico para formar sales de adición de ácido, e hidróxido de potasio, hidróxido de sodio, hidróxido de amonio, cafeína, diversas aminas, y similares para formar sales básicas. Los procedimientos para la preparación de las sales apropiadas están bien establecidos en la técnica.

Las sales de adición de ácido representativas incluyen acetato, adipato, alginato, ascorbato, aspartato, bencenosulfonato, benzoato, bisulfato, borato, butirato, alcanforato, alcanforsulfonato, citrato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, fumarato, glucoheptonato, hexanofosfato, glicerofosfato, hemisulfato, heptonato, hexanoato, bromhidrato, clorhidrato, yodurohidrato, 2-hidroxietanosulfonato, lactobionato, lactato, laurato, laurilsulfato, malato, maleato, malonato, metanosulfonato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, nitrato, oleato, oxalato, palmitato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, fosfato, picrato, pivalato, propionato, estearato, succinato, sulfato, tartrato, tiocianato, toluenosulfonato, undecanoato, sales de valerato y similares. Las sales de metales alcalinos o alcalinotérreos representativas incluyen sodio, litio, potasio, calcio, magnesio y similares, así como amonio no tóxico, amonio cuaternario y cationes amina, que incluyen, pero no se limitan a, amonio, tetrametilamonio, tetraetilamonio, metilamina, dimetilamina, trimetilamina, trietilamina, etilamina y similares.

El término "solvato farmacéuticamente aceptable" como se usa en la presente memoria significa un compuesto como se describe en la presente memoria donde moléculas de un disolvente adecuado se incorporan en la red cristalina. Un disolvente adecuado es fisiológicamente tolerable a la dosificación administrada. Por ejemplo, los solvatos pueden prepararse por cristalización, recristalización o precipitación a partir de una solución que incluye disolventes orgánicos, agua o una mezcla de estos. Ejemplos de disolventes adecuados son etanol, agua (por ejemplo, mono, di y trihidratos), N-metilpirrolidinona (NMP), dimetilsulfóxido (DMSO), N,N'-dimetilformamida (DMF), N,N'-dimetilacetamida (DMAC), 1,3-dimetil-2-imidazolidinona (DMEU), 1,3-dimetil-3,4,5,6-tetrahidro-2- (1H)-pirimidinona (DMPU), acetonitrilo (ACN), propilenglicol, acetato de etilo, alcohol bencílico, 2-pirrolidona, benzoato de bencilo y similares. Cuando el agua es el disolvente, la molécula se denomina "hidrato".

El término "prevenir", como se usa en la presente memoria, se refiere al tratamiento profiláctico o tratamiento que previene uno o más síntomas o afecciones de una enfermedad, trastorno o afecciones descritas en la presente memoria (por ejemplo, dolor (por ejemplo, dolor crónico o agudo), epilepsia, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad cardiovascular, diabetes, cáncer, trastornos del sueño, obesidad, psicosis como esquizofrenia, vejiga hiperactiva, enfermedad renal, neuroprotección, adicción y control masculino de la natalidad). El tratamiento preventivo puede iniciarse, por ejemplo, antes de ("profilaxis preexposición") o después ("profilaxis postexposición") un evento que precede al inicio de la enfermedad, trastorno o afecciones. El tratamiento preventivo que incluye la administración de un compuesto de la invención, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, o una composición farmacéutica del mismo, puede ser agudo, a corto plazo o crónico. Las dosis administradas pueden variar durante el curso del tratamiento preventivo.

El término "profármaco", como se usa en la presente memoria, representa compuestos que se transforman rápidamente in vivo en el compuesto parental de la fórmula anterior, por ejemplo, por hidrólisis en sangre. Los profármacos de los compuestos de la invención pueden ser ésteres convencionales. Algunos ésteres comunes que se han utilizado como profármacos son los ésteres de fenilo, ésteres alifáticos (C1-C8 o C8-C24), ésteres de colesterol, ésteres de aciloximetilo, carbamatos y ésteres de aminoácidos. Por ejemplo, un compuesto que contiene un grupo OH puede acilarse en esta posición en su forma de profármaco. Se proporciona una discusión exhaustiva en T. Higuchi and V. Stella, Pro-drugs as Novel Delivery Systems, Vol. 14 del A.C.S. Symposium Series, Edward B. Roche, ed., Bioreversible Carriers in Drug Design, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987, y Judkins et al., Synthetic Communications 26(23):4351-4367, 1996. Preferiblemente, profármacos de los compuestos de la presente invención son adecuados para su uso en contacto con los tejidos de humanos y animales con toxicidad indebida, irritación, respuesta alérgica y similares, proporcionales a una proporción beneficio/riesgo razonable y efectivos para su uso previsto.

Además, los compuestos de la invención se pueden acoplar mediante conjugación a sustancias diseñadas para alterar la farmacocinética, para el direccionamiento o por otros motivos. Por lo tanto, la invención incluye además conjugados de estos compuestos. Por ejemplo, el polietilenglicol a menudo se acopla con sustancias para mejorar la vida media; los compuestos pueden estar acoplados a liposomas de manera covalente o no covalente o a otros portadores en partículas. También se pueden acoplar a agentes de direccionamiento como anticuerpos o peptidomiméticos, a menudo a través de fracciones enlazadoras. Por lo tanto, la invención también se dirige a compuestos cuando se modifican para que se incluyan en un conjugado de este tipo.

Como se usa en la presente memoria, y como se entiende bien en la técnica, "para tratar" una afección o "tratamiento" de la afección (por ejemplo, las afecciones descritas en la presente memoria, tales como dolor (por ejemplo, dolor crónico o agudo), epilepsia, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad cardiovascular, diabetes, cáncer, trastornos del sueño, obesidad, psicosis como esquizofrenia, vejiga hiperactiva, enfermedad renal, neuroprotección, adicción y control masculino de natalidad) es un enfoque para obtener resultados beneficiosos o deseados, como resultados clínicos. Los resultados beneficiosos o deseados pueden incluir, pero no limitándose a, alivio o mejora de uno o más síntomas o afecciones; disminución de la extensión de la enfermedad, trastorno o afección; estado de enfermedad, trastorno o afección estabilizado (es decir, sin empeoramiento); prevenir la propagación de enfermedades, trastornos o afecciones; retrasar o desacelerar el progreso de la enfermedad, trastorno o afección; mejora o paliación de la enfermedad, trastorno o afección; y remisión (ya sea parcial o total), ya sea

detectable o indetectable. "Paliar" una enfermedad, trastorno o afección significa que la extensión y/o las manifestaciones clínicas indeseables de la enfermedad, trastorno o afección se reducen y/o el curso temporal de la progresión se desacelera o alarga, en comparación con la extensión o el curso de tiempo en ausencia de tratamiento.

El término "forma de dosificación unitaria" se refiere a una unidad físicamente discreta adecuada como una dosificación unitaria para sujetos humanos y otros mamíferos, cada unidad que contiene una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con cualquier excipiente o excipientes farmacéuticos adecuados. Los ejemplos, de formas de dosificación unitarias no limitantes incluyen un comprimido (por ejemplo, un comprimido masticable), comprimido oblongo, cápsula (por ejemplo, una cápsula dura o una cápsula blanda), comprimidos masticables, película, tira, cápsula de gel y jarabe.

En algunos casos, los compuestos de la invención contienen uno o más centros quirales. La invención incluye cada una de las formas estereoisómeras aisladas, así como mezclas de estereoisómeros en diversos grados de pureza quiral, incluidas mezclas racémicas. También abarca los diversos diastereómeros y tautómeros que se pueden formar.

Los compuestos útiles en la invención también pueden ser compuestos marcados isotópicamente. Los isótopos útiles incluyen hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, flúor y cloro (por ejemplo, ^{2}H, ^{3}H, ^{13}C, ^{14}C, ^{15}N, ^{18}O, ^{17}O, ^{31}P, ^{32}P, ^{35}S, ^{18}F, y ^{36}Cl). Los compuestos marcados isotópicamente pueden prepararse sintetizando un compuesto usando un reactivo marcado isotópicamente fácilmente disponible en lugar de un reactivo marcado no isotópicamente. En algunas realizaciones, el compuesto, o una composición que incluye el compuesto, tiene la abundancia natural de cada elemento presente en el compuesto.

Los compuestos de la invención también son útiles para la fabricación de un medicamento útil para tratar afecciones que requieren la modulación de la actividad del canal iónico regulado por voltaje (por ejemplo, actividad del canal de sodio) y, en particular, la actividad del canal Na_V 1,7 o Na_V 1,8.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, los dibujos y las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

Las **Figuras 1A-1B** muestran la modulación de la actividad del canal iónico por los compuestos descritos en la presente memoria.

Las **Figuras 2A-2C** y **3A-3C** muestran datos obtenidos en el ensayo de ligadura del nervio espinal (SNL) para compuestos seleccionados de la invención.

Descripción detallada de la invención

Compuestos

La invención presenta compuestos que pueden modular la actividad de los canales iónicos regulados por voltaje (por ejemplo, canales de sodio regulados por voltaje). Estos compuestos también se pueden usar para tratar trastornos como dolor, epilepsia, enfermedad de Parkinson, trastornos del estado de ánimo, psicosis (por ejemplo, esquizofrenia), tinnitus, esclerosis lateral amiotrópica, glaucoma, isquemia, trastornos de espasticidad, trastorno obsesivo compulsivo, síndrome de piernas inquietas y síndrome de Tourette.

Se describen en la presente memoria, procedimientos ejemplares para la síntesis de estos compuestos.

Utilidad y Administración

Los compuestos de la invención son útiles en los procedimientos de la invención y, aunque no están sujetos a la teoría, se cree que ejercen sus efectos deseables a través de su capacidad para modular la actividad de los canales iónicos regulados por voltaje, por ejemplo, la actividad de los canales de sodio tales como los canales Na_V 1,7 y Na_V 1,8. Los compuestos de la invención también pueden usarse para el tratamiento de ciertas afecciones tales como dolor, epilepsia, migraña, enfermedad de Parkinson, trastornos del estado de ánimo, esquizofrenia, psicosis, tinnitus, esclerosis lateral amiotrópica, glaucoma, isquemia, trastornos de espasticidad, trastorno obsesivo compulsivo, síndrome de piernas inquietas y síndrome de Tourette.

<u>Modulación de canales de sodio</u>

Hay nueve isoformas de la subunidad α de Na_V1: $Na_V1,1$-1,9 (véase, por ejemplo, Yu et al., Genome Biolog, 4:207, 2003). Además del dolor, otras afecciones asociadas con la actividad del canal de sodio dependiente del voltaje incluyen convulsiones (por ejemplo, $Na_V1,1$), epilepsia (por ejemplo, $Na_V1,2$), neurodegeneración (por ejemplo, $Na_V1,1$, $Na_V1,2$), miotonía (por ejemplo, $Na_V1,4$), arritmia (por ejemplo, $Na_V1,5$) y trastornos del movimiento (por ejemplo, $Na_V1,6$) como se describe en la Publicación PCT No. WO 2008/118758. La expresión de isoformas particulares en tejidos particulares puede influir en los efectos terapéuticos de los moduladores de los canales de sodio. Por ejemplo, las isoformas de $Na_V1,4$ y $Na_V1,5$ se encuentran principalmente en miocitos esqueléticos y cardíacos (véase, por ejemplo, Gold, Exp Neurol. 210(1):1-6, 2008).

Actividad del canal de sodio y dolor

Los canales iónicos dependientes del voltaje en las neuronas sensibles al dolor son actualmente de gran interés en el desarrollo de fármacos para tratar el dolor. Por ejemplo, el bloqueo de los canales de sodio dependientes del voltaje en las neuronas sensibles al dolor puede bloquear las señales de dolor al interrumpir el inicio y la transmisión del potencial de acción. Los estudios también indican que determinadas isoformas de los canales de sodio se expresan predominantemente en neuronas sensoriales periféricas asociadas con la sensación de dolor; por ejemplo, se cree que la actividad de $Na_V1,7$, $Na_V1,8$ y $Na_V1,9$ está involucrada en el dolor inflamatorio y posiblemente neuropático (ver, por ejemplo, Cummins et al., Pain, 131(3):243-257, 2007). La isoforma $Na_V1,3$ también se ha implicado en el dolor, por ejemplo, dolor asociado con lesión del tejido (Gold, Exp Neurol. 210(1): 1-6, 2008).

Los subtipos de canales $Na_V1,7$ y $Na_V1,8$ actúan como principales contribuyentes tanto para dolor inflamatorio como para dolor neuropático (vide infra). Recientemente, se han identificado mutaciones en el canal $Na_V1,7$ que conducen a una ganancia de la función del canal (Dib-Hajj et al., Brain 128:1847-1854, 2005) o más comúnmente a una pérdida de la función del canal (Chatelier et al., J. Neurophisiol. 99:2241-50, 2008). Estas mutaciones subyacen a los trastornos hereditarios humanos como la eritermalgia (Yang et al., J Med Genet. 41(3) 171-4, 2004), trastorno de dolor extremo paroxístico (Fertleman et al., Neuron. 52(5) 767-74, 2006), e indiferencia congénita al dolor (Cox et al., Nature 444(7121):894-8, 2006). Los estudios de comportamiento han demostrado en ratones que el dolor mecanosensorial inflamatorio y agudo se reduce cuando se elimina $Na_V1,7$ en las neuronas positivas para $Na_V1,8$ (Nassar et al., Proc Natl Acad Sci USA. 101(34):12706-11, 2004). Además, ARNsi de $Na_V1,7$ atenúa la hiperalgesia inflamatoria (Yeomans et al., Hum Gene Ther. 16(2) 271-7, 2005).

La isoforma $Na_V1,8$ se expresa selectivamente en neuronas sensoriales y se ha identificado como un objetivo para el tratamiento del dolor, por ejemplo, dolor crónico (por ejemplo, Swanwick et al., Neurosci. Lett. 486:78-83, 2010). El papel del $Na_V1,8$ en la hiperalgesia inflamatoria (Khasar et al. Neurosci Lett. 256(1):17-20, 1998), neuropática y mecánica (Joshi et al., Pain 123(1-2):75-82, 2006) también surgió utilizando técnicas moleculares para eliminar el $Na_V1,8$, que se ha demostrado que reduce el mantenimiento de estos diferentes estados de dolor.

Lacosamida es un aminoácido funcionalizado que ha demostrado efectividad como analgésico en varios modelos animales de dolor neuropático y actualmente se encuentra en etapas tardías de desarrollo clínico para epilepsia y dolor neuropático diabético. Un modo de acción que ha sido validado para lacosamida es la inhibición de la actividad del canal de sodio regulado por voltaje mediante inhibición selectiva con la conformación del canal inactivado lentamente (Sheets et al., Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 326(**1**) 89-99 (2008)). Los moduladores de los canales de sodio, incluidos los compuestos clínicamente relevantes, pueden exhibir un enlace pronunciado dependiente del estado, donde los canales de sodio que se activan e inactivan rápida y repetidamente se bloquean más fácilmente. En un esquema simplificado, los canales de sodio regulados por voltaje tienen cuatro estados distintos: abierto, cerrado, inactivado rápidamente e inactivado lentamente. Se cree que los moduladores de canales de sodio clásicos, como la lidocaína, exhiben la mayor afinidad por el estado de inactivación rápida. Sin embargo, la alteración del estado inactivado lentamente también es clínicamente relevante.

Modulación de canales de calcio

La entrada de calcio en las células a través de canales de calcio regulados por voltaje media una amplia variedad de respuestas celulares y fisiológicas, que incluyen el acoplamiento de excitación-contracción, la secreción de hormonas y la expresión génica (por ejemplo, Miller et al., Science 235:46-52 (1987); Augustine et al., Annu Rev Neurosci 10:633-693 (1987)). En las neuronas, los canales de calcio afectan directamente el potencial de membrana y contribuyen a las propiedades eléctricas, como excitabilidad, patrones repetitivos de disparo y actividad del marcapasos. La entrada de calcio afecta aún más las funciones neuronales al regular directamente los canales iónicos dependientes de calcio y modular la actividad de las enzimas dependientes de calcio como proteína quinasa C y la proteína quinasa II dependiente de calmodulina. Un aumento en la concentración de calcio en la terminal nerviosa presináptica desencadena la liberación de neurotransmisores, lo que también afecta el crecimiento de neuritas y la migración del cono de crecimiento en las neuronas en desarrollo.

Los canales de calcio median una variedad de funciones fisiológicas normales, y también están implicados en una serie de trastornos humanos como se describe aquí. Por ejemplo, también se ha demostrado que los canales de calcio median el desarrollo y mantenimiento de los procesos de sensibilización neuronal e hiperexcitabilidad asociados con dolor neuropático, y proporcionan objetivos atractivos para el desarrollo de fármacos analgésicos (revisado en Vanegas et al., Pain 85: 9-18 (2000)). Los canales de calcio nativos se han clasificado por sus propiedades electrofisiológicas y farmacológicas en los tipos T-, L-, N-, P/Q- y R- (revisados en Catterall, Annu Rev Cell Dev Biol 16: 521-555, 2000; Huguenard, Annu Rev Physiol 58: 329-348, 1996). Los canales de tipo L-, N- y P/Q- se activan a potenciales más positivos (activados por alto voltaje) y muestran diversas cinéticas y propiedades dependientes del voltaje (Id.). Los canales de tipo T se pueden distinguir por tener un intervalo más negativo de activación e inactivación, inactivación rápida, desactivación lenta y conductancias de un solo canal más pequeñas. Hay tres subtipos de canales de calcio de tipo T que se han identificado molecular, farmacológica y electrofisiológicamente: estos subtipos se han denominado α_{1G}, α_{1H} y α_{1I} (alternativamente llamados Cav 3,1, Cav 3,2 y Cav 3,3 respectivamente).

Los canales de calcio de tipo T están involucrados en diversas afecciones médicas. En ratones que carecen del gen que expresa la subunidad 3,1, se observó resistencia a convulsiones ausentes (Kim et al., Mol. Cell Neurosci. 18(2): 235-245 (2001)). Otros estudios también han implicado a la subunidad 3,2 en el desarrollo de epilepsia (Su et al., J. Neurosci. 22: 3645-3655 (2002)). También hay evidencia de que algunos fármacos anticonvulsivos existentes, como la etosuximida, funcionan a través del bloqueo de los canales de tipo T (Gomora et al., Mol. Pharmacol. 60: 1121-1132 (2001)).

Los canales de calcio activados por bajo voltaje se expresan altamente en tejidos del sistema cardiovascular. También hay una creciente evidencia que sugiere que los canales de calcio de tipo T se expresan de manera anormal en células cancerosas y que el bloqueo de estos canales puede reducir la proliferación celular además de inducir la apoptosis. Estudios recientes también muestran que la expresión de los canales de calcio de tipo T en las células de cáncer de mama depende del estado de proliferación, es decir, los canales se expresan a niveles más altos durante el período de replicación rápida, y una vez que las células están en un estado de no proliferación, la expresión de este canal es mínima. Por lo tanto, el bloqueo selectivo de la entrada del canal de calcio en las células cancerosas puede ser un enfoque valioso para prevenir el crecimiento tumoral (por ejemplo, las solicitudes de patente PCT Nos. WO 05/086971 y WO 05/77082; Taylor et al., World J. Gastroenterol. 14(32): 4984-4991 (2008); Heo et al., Biorganic & Medicinal Chemistry Letters 18: 3899-3901 (2008)).

Los canales de calcio de tipo T también pueden estar involucrados en otras condiciones. Un estudio reciente también ha demostrado que los antagonistas de los canales de calcio de tipo T inhiben el aumento de peso inducido por la dieta alta en grasas en ratones. Además, la administración de un antagonista selectivo del canal de tipo T redujo el peso corporal y la masa grasa al tiempo que aumentaba la masa muscular magra (por ejemplo, Uebele et al., The Journal of Clinical Investigation, 119(6):1659-1667 (2009)). Los canales de calcio tipo T también pueden estar implicados en dolor (ver, por ejemplo: Publicación de Patente de los Estados Unidos No. 2003/0086980; Publicaciones PCT Nos. WO 03/007953 y WO 04/000311). Además de la enfermedad cardiovascular, la epilepsia (ver también la solicitud de patente de Estados Unidos No. 2006/0025397), cáncer y dolor crónico o agudo, los canales de calcio de tipo T se han implicado en la diabetes (publicación de patente de Estados Unidos No. 2003/0125269), trastornos del sueño (publicación de patente de Estados Unidos No. 2006/0003985), enfermedad de Parkinson y psicosis tales como esquizofrenia (publicación de patente de Estados Unidos No. 2003/0087799); vejiga hiperactiva (Sui et al., British Journal of Urology International 99(2): 436-441 (2007); Publicación de Patente de los Estados Unidos No. 2004/0197825), enfermedad renal (Hayashi et al., Journal of Pharmacological Sciences 99: 221-227 (2005)), ansiedad y alcoholismo (publicación de patente de Estados Unidos No. 2009/0126031), neuroprotección y control masculino de natalidad.

La modulación de los canales iónicos por los compuestos de la invención se puede medir de acuerdo con los procedimientos conocidos en la técnica (por ejemplo, en las referencias proporcionadas en la presente memoria). Los moduladores de los canales iónicos, por ejemplo, los canales de iones de sodio y calcio regulados por voltaje, y la química medicinal o los procedimientos por los cuales se pueden identificar tales compuestos, también se describen en, por ejemplo: Birch et al., Drug Discovery Today, 9(9):410-418 (2004); Audesirk, "Chapter 6-Electrophysiological Analysis of Ion Channel Function," Neurotoxicology: Approaches and Methods, 137-156 (1995); Camerino et al., "Chapter 4: Therapeutic Approaches to Ion Channel Diseases," Advances in Genetics, 64:81-145 (2008); Petkov, "Chapter 16-Ion Channels," Pharmacology: Principles and Practice, 387-427 (2009); Standen et al., "Chapter 15-Patch Clamping Methods and Analysis of Ion Channels," Principles of Medical Biology, Vol. 7, Part 2, 355-375 (1997); Xu et al., Drug Discovery Today, 6(24):1278-1287 (2001); y Sullivan et al., Methods Mol. Biol. 114:125-133 (1999). Procedimientos experimentales ejemplares también se proporcionan en los Ejemplos.

Enfermedades y condiciones

Las condiciones ejemplares que pueden tratarse usando los compuestos descritos en el presente documento incluyen dolor (por ejemplo, dolor crónico o agudo), epilepsia, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, diabetes; cáncer; trastornos del sueño; obesidad; trastornos del estado de ánimo, psicosis como la esquizofrenia; vejiga hiperactiva; enfermedad renal, neuroprotección y adicción. Por ejemplo, la condición puede ser dolor (por ejemplo, dolor neuropático o dolor postoperatorio), epilepsia, migraña, enfermedad de Parkinson, trastornos del estado de ánimo, esquizofrenia, psicosis, tinnitus, esclerosis lateral amiotrópica, glaucoma, isquemia, trastornos de espasticidad, trastorno obsesivo compulsivo, síndrome de piernas inquietas y síndrome de Tourette.

La epilepsia como se usa en la presente memoria incluye, pero no se limita a, convulsiones parciales tales como epilepsia del lóbulo temporal, convulsiones ausentes, convulsiones generalizadas y convulsiones tónicas/clónicas.

El cáncer como se usa en la presente memoria incluye, pero no se limita a, carcinoma de mama, neuroblastoma, retinoblastoma, glioma, carcinoma de próstata, carcinoma esofágico, fibrosarcoma, carcinoma colorrectal, feocromocitoma, adrenocarcinoma, insulinoma, carcinoma de pulmón, melanoma y cáncer de ovario.

El dolor agudo como se usa en la presente memoria incluye, pero no se limita a dolor nociceptivo y dolor postoperatorio. El dolor crónico incluye pero no está limitado por: dolor neuropático periférico (por ejemplo, neuralgia posherpética, dolor neuropático diabético, dolor neuropático por cáncer, neuropatía asociada al VIH, eritromelalgia, síndrome de cirugía de espalda fallida, neuralgia trigeminal o dolor de miembro fantasma); dolor neuropático central (por ejemplo,

dolor relacionado con esclerosis múltiple, dolor relacionado con enfermedad de Parkinson, dolor post accidente cerebrovascular, dolor postraumático por lesión de la médula espinal, radiculopatía lumbosacra, radiculopatía cervical, radiculopatía braquial o dolor en demencia); dolor musculoesquelético tal como dolor osteoartrítico y síndrome de fibromialgia; dolor inflamatorio (por ejemplo, dolor inflamatorio causado por artritis reumatoide, artritis idiopática juvenil, espondilitis anquilosante, artritis psoriásica, enfermedad inflamatoria intestinal, dismenorrea primaria o endometriosis); cefalea como migraña, cefalea en racimo, síndrome de cefalea por tensión, dolor facial, cefalea causada por otras enfermedades; dolor visceral tal como cistitis intersticial, síndrome del intestino irritable y síndrome de dolor pélvico crónico; y dolor mixto, como dolor lumbar, dolor de cuello y hombro, síndrome de boca ardiente y síndrome de dolor regional complejo.

En el tratamiento del dolor osteoartrítico, la movilidad articular también puede mejorar a medida que se reduce el dolor crónico subyacente. Por lo tanto, el uso de compuestos de la presente invención para tratar el dolor osteoartrítico incluye inherentemente el uso de tales compuestos para mejorar la movilidad articular en pacientes que padecen osteoartritis.

La eficacia de los compuestos descritos en la presente memoria puede probarse en cualquier modelo animal estándar de dolor. Diversos modelos prueban la sensibilidad de animales normales a estímulos intensos o nocivos (dolor fisiológico o nociceptivo). Estas pruebas incluyen respuestas a estímulos térmicos, mecánicos o químicos. Los estímulos térmicos generalmente implican la aplicación de estímulos calientes (que generalmente varían entre 42-55 ºC) que incluyen, por ejemplo: calor radiante en la cola (prueba de la retirada de la cola), calor radiante en la superficie plantar de la pata trasera (prueba de Hargreaves), la prueba de placa caliente y la inmersión de la pata trasera o la cola en agua caliente. Las pruebas de inmersión en agua fría, evaporación de acetona o placa fría también se pueden usar para probar la capacidad de respuesta al dolor por frío. Las pruebas que involucran estímulos mecánicos generalmente miden el umbral para provocar un reflejo de retirada de la pata trasera en monofilamento de fuerza graduada de pelos von Frey o un estímulo de presión sostenida en una pata (por ejemplo, el analgesiómetro Ugo Basile). También se puede medir la duración de una respuesta a un pinchazo estándar. Cuando se usa un estímulo químico, se mide la respuesta a la aplicación o inyección de un irritante químico (por ejemplo, capsaicina, aceite de mostaza, bradiquinina, ATP, formalina, ácido acético) a la piel, articulaciones musculares u órganos internos (por ejemplo, vejiga o peritoneo).

Además, diversas pruebas evalúan la sensibilización al dolor midiendo los cambios en la excitabilidad de los componentes periféricos o centrales de la vía neural del dolor. En este sentido, la sensibilización periférica (es decir, cambios en el umbral y la capacidad de respuesta de los nociceptores de umbral alto) puede ser inducida por estímulos térmicos repetidos, así como por la aplicación o inyección de químicos sensibilizantes (por ejemplo, prostaglandinas, bradiquinina, histamina, serotonina, capsaicina, o aceite de mostaza). La sensibilización central (es decir, cambios en la excitabilidad de neuronas en el sistema nervioso central inducida por actividad en las fibras periféricas del dolor) puede ser inducida por estímulos nocivos (por ejemplo, calor), estímulos químicos (por ejemplo, inyección o aplicación de irritantes químicos), o activación eléctrica de fibras sensoriales.

Diversas pruebas de dolor desarrolladas para medir el efecto de la inflamación periférica en la sensibilidad al dolor también se pueden usar para estudiar la eficacia de los compuestos (Stein et al., Pharmacol. Biochem. Behav. (1988) 31: 445-451; Woolf et al., Neurosci. (1994) 62: 327-331). Además, diversas pruebas evalúan el dolor neuropático periférico utilizando lesiones del sistema nervioso periférico. Un ejemplo de ello es el "modelo de dolor de axotomía" (Watson, J. Physiol. (1973) 231:41). Otras pruebas similares incluyen la prueba SNL que involucra la ligadura de un nervio segmentario espinal (Kim y Chung Pain (1992) 50: 355), el modelo Seltzer que involucra una lesión nerviosa parcial (Seltzer, Pain (1990) 43: 205-18), el modelo de lesión nerviosa conservada (SNI) (Decosterd y Woolf, Pain (2000) 87:149), modelo de lesión por constricción crónica (CCI) (Bennett (1993) Muscle Nerve 16: 1040), pruebas que involucran neuropatías tóxicas como la diabetes (modelo de estreptozocina), neuropatía por piridoxina, taxol, vincristina y otras neuropatías inducidas por agentes antineoplásicos, pruebas que involucran isquemia a un nervio, modelos de neuritis periférica (por ejemplo, CFA aplicado perineuralmente), modelos de neuralgia postherpética usando infección por HSV y modelos de compresión.

En todas las pruebas anteriores, se pueden evaluar las medidas de resultado, por ejemplo, de acuerdo con el comportamiento, electrofisiología, neuroquímica o técnicas de imagen para detectar cambios en la actividad neural.

Los modelos ejemplares de dolor también se describen en los ejemplos proporcionados en la presente memoria.

Además de poder modular un canal particular de iones regulado por voltaje, por ejemplo, un canal de sodio, puede ser deseable que el compuesto tenga una actividad muy baja con respecto al canal hERG K^+, que se expresa en el corazón: compuestos que bloquean este canal con alta potencia pueden causar reacciones que son fatales. Ver, por ejemplo, Bowlby et al., "HERG (KCNH2 o KV11.1 K+ Channels: Screening for Cardiac Arrhythmia Risk," Curr. Drug Metab. 9(9):965-70 (2008)). Por lo tanto, para un compuesto que modula la actividad del canal de sodio, también se puede demostrar que el canal hERG K^+ no se inhibe o solo se inhibe mínimamente en comparación con la inhibición del canal primario objetivizado. De manera similar, puede ser deseable que el compuesto no inhiba el citocromo p450, una enzima que se requiere para la desintoxicación del fármaco. Tales compuestos pueden ser particularmente útiles en los procedimientos descritos en la presente memoria.

Composiciones Farmacéuticas

Para su uso como tratamiento de sujetos humanos y animales, los compuestos de la invención pueden formularse como composiciones farmacéuticas o veterinarias. Dependiendo del sujeto a tratar, el modo de administración y el tipo de tratamiento deseado, por ejemplo, prevención, profilaxis o terapia, los compuestos se formulan de manera acorde con estos parámetros. Un sumario de tales técnicas se encuentra en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, Lippincott Williams & Wilkins, (2005); y Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, eds. J. Swarbrick and J. C. Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, New York.

Los compuestos de la invención pueden estar presentes en cantidades hasta un total de 1-95 % en peso del peso total de la composición. La composición se puede proporcionar en una forma de dosificación adecuada para administración intraarticular, oral, parenteral (por ejemplo, intravenosa, intramuscular), rectal, cutánea, subcutánea, tópica, transdérmica, sublingual, nasal, vaginal, intravesicular, intrauretral, intratecal, epidural, auditiva u ocular, o por inyección, inhalación o contacto directo con la mucosa nasal, genitourinaria, gastrointesitnal, reproductiva u oral. Por lo tanto, la composición farmacéutica puede estar en forma de, por ejemplo, comprimidos, cápsulas, píldoras, polvos, granulados, suspensiones, emulsiones, soluciones, geles que incluyen hidrogeles, pastas, pomadas, cremas, apósitos, enjuagues, dispositivos de administración osmótica, supositorios, enemas, inyectables, implantes, aerosoles, preparaciones adecuadas para administración iontoforética o aerosoles. Las composiciones pueden formularse de acuerdo con la práctica farmacéutica convencional.

En general, para su uso en el tratamiento, los compuestos de la invención pueden usarse solos, como mezclas de dos o más compuestos o en combinación con otros productos farmacéuticos. Un ejemplo de otros productos farmacéuticos para combinar con los compuestos de la invención incluiría productos farmacéuticos para el tratamiento de la misma indicación. Por ejemplo, en el tratamiento del dolor, un compuesto puede combinarse con otro tratamiento para aliviar el dolor, como un NSAID, o un compuesto que inhibe selectivamente la COX-2, o un opioide, o un analgésico adyuvante como un antidepresivo. Otro ejemplo de un posible producto farmacéutico para combinar con los compuestos de la invención incluiría productos farmacéuticos para el tratamiento de síntomas o indicaciones diferentes pero asociados o relacionados. Dependiendo del modo de administración, los compuestos se formularán en composiciones adecuadas para permitir la administración fácil. Cada compuesto de una terapia combinada puede formularse de una variedad de formas conocidas en la técnica. Por ejemplo, los agentes primero y segundo de la terapia de combinación pueden formularse juntos o por separado. Deseablemente, el primer y segundo agentes se formulan juntos para la administración simultánea o casi simultánea de los agentes.

Los compuestos de la invención pueden prepararse y usarse como composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad eficaz de un compuesto de la invención y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable, como es bien conocido en la técnica. En algunas realizaciones, la composición incluye al menos dos excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables diferentes.

Las formulaciones pueden prepararse de una manera adecuada para administración sistémica o administración tópica o local. Las formulaciones sistémicas incluyen aquellas diseñadas para inyección (por ejemplo, inyección intramuscular, intravenosa o subcutánea) o pueden prepararse para administración transdérmica, transmucosa u oral. La formulación generalmente incluirá un diluyente, así como, en algunos casos, adyuvantes, tampones, conservantes y similares. Los compuestos pueden administrarse también en composiciones liposomales o como microemulsiones.

Para la inyección, las formulaciones pueden prepararse en formas convencionales como soluciones o suspensiones líquidas o como formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en líquido antes de la inyección o como emulsiones. Los excipientes adecuados incluyen, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol y similares. Dichas composiciones también pueden contener cantidades de sustancias auxiliares no tóxicas tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponadores de pH y similares, tales como, por ejemplo, acetato de sodio, monolaurato de sorbitán, etc.

También se han diseñado diversos sistemas de liberación sostenida de fármacos. Ver, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos No. 5,624,677.

La administración sistémica también puede incluir procedimientos relativamente no invasivos, como el uso de supositorios, parches transdérmicos, administración transmucosa y administración intranasal. La administración oral también es adecuada para compuestos de la invención. Las formas adecuadas incluyen jarabes, cápsulas y comprimidos, como se entiende en la técnica.

Para la administración a sujetos animales o humanos, la dosificación de los compuestos de la invención puede ser, por ejemplo, 0,01-50 mg/kg (por ejemplo, 0,01-15 mg/kg o 0,1-10 mg/kg). Por ejemplo, la dosificación puede ser de 10-30 mg/kg.

Cada compuesto de una terapia de combinación, como se describe en la presente memoria, puede formularse en una variedad de formas que se conocen en la técnica. Por ejemplo, los agentes primero y segundo de la terapia de combinación pueden formularse juntos o por separado.

Los agentes formulados individualmente o por separado se pueden empaquetar juntos como un kit. Los ejemplos no limitativos incluyen, pero no limitándose a, kits que contienen, por ejemplo, dos píldoras, una píldora y un polvo, un supositorio y un líquido en un vial, dos cremas tópicas, etc. El kit puede incluir componentes opcionales que ayudan en la administración de la dosis unitaria a los pacientes, como viales para reconstituir formas en polvo, jeringas para inyección, sistemas de administración IV personalizados, inhaladores, etc. Además, el kit de dosis unitaria puede contener instrucciones para la preparación y administración de las composiciones. El kit puede fabricarse como una dosis unitaria de uso único para un paciente, usos múltiples para un paciente particular (a una dosis constante o en la que los compuestos individuales pueden variar en potencia a medida que avanza la terapia); o el kit puede contener múltiples dosis adecuadas para la administración a múltiples pacientes ("empaque a granel"). Los componentes del kit pueden ensamblarse en cajas de cartón, blísters, botellas, tubos y similares.

Las formulaciones para uso oral incluyen comprimidos que contienen el ingrediente o ingredientes activos en una mezcla con excipientes no tóxicos farmacéuticamente aceptables. Estos excipientes pueden ser, por ejemplo, diluyentes o agentes de relleno inertes (por ejemplo, sacarosa, sorbitol, azúcar, manitol, celulosa microcristalina, almidones que incluyen almidón de patata, carbonato de calcio, cloruro de sodio, lactosa, fosfato de calcio, sulfato de calcio o fosfato de sodio); agentes de granulación y desintegración (por ejemplo, derivados de celulosa que incluyen celulosa microcristalina, almidones que incluyen almidón de patata, croscarmelosa de sodio, alginatos o ácido algínico); agentes aglomerantes (por ejemplo, sacarosa, glucosa, sorbitol, acacia, ácido algínico, alginato de sodio, gelatina, almidón, almidón pregelatinizado, celulosa microcristalina, silicato de aluminio y magnesio, carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, etilcelulosa, polivinilpirrolidona o polietilenglicol); y agentes lubricantes, deslizantes y antiadhesivos (por ejemplo, estearato de magnesio, estearato de zinc, ácido esteárico, sílicas, aceites vegetales hidrogenados o talco). Otros excipientes farmacéuticamente aceptables pueden ser colorantes, agentes saborizantes, plastificantes, humectantes, agentes tamponantes y similares.

Se pueden mezclar dos o más compuestos en un comprimido, cápsula u otro vehículo, o se pueden dividir. En un ejemplo, el primer compuesto está contenido en el interior del comprimido, y el segundo compuesto está en el exterior, de modo que una porción sustancial del segundo compuesto se libera antes de la liberación del primer compuesto.

Las formulaciones para uso oral también se pueden proporcionar como comprimidos masticables, o como cápsulas de gelatina dura en las que el ingrediente activo se mezcla con un diluyente sólido inerte (por ejemplo, almidón de patata, lactosa, celulosa microcristalina, carbonato de calcio, fosfato de calcio o caolín), o como cápsulas de gelatina blanda en las que el ingrediente activo se mezcla con agua o un medio oleoso, por ejemplo, aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva. Los polvos, granulados y pellas pueden prepararse usando los ingredientes mencionados anteriormente en comprimidos y cápsulas de manera convencional usando, por ejemplo, un mezclador, un aparato de lecho fluido o un equipo de secado por aspersión.

La liberación controlada de disolución o difusión se puede lograr mediante el recubrimiento apropiado de un comprimido, cápsula, pella o formulación granulada de compuestos, o incorporando el compuesto en una matriz apropiada. Un recubrimiento de liberación controlada puede incluir una o más de las sustancias de recubrimiento mencionadas anteriormente y/o, por ejemplo, goma laca, cera de abejas, cera glicólica, cera de ricino, cera de carnauba, alcohol estearílico, monoestearato de glicerilo, diestearato de glicerilo, palmitostearato de glicerol, etilcelulosa, resinas acrílicas, ácido dl-poliláctico, butirato de acetato de celulosa, cloruro de polivinilo, acetato de polivinilo, vinilpirrolidona, polietileno, polimetacrilato, metilmetacrilato, 2-hidroximetacrilato, hidrogeles de metacrilato, 1,3 butilenglicol, metacrilato de etilenglicol y/o polietilenglicoles. En una formulación de matriz de liberación controlada, el material de matriz también puede incluir, por ejemplo, metilcelulosa hidratada, cera de carnauba y alcohol estearílico, carbopol 934, silicona, triestearato de glicerilo, acrilato de metilo-metacrilato de metilo, cloruro de polivinilo, polietileno y/o fluorocarbono halogenado.

Las formas líquidas en las que los compuestos y composiciones de la presente invención pueden incorporarse para administración oral incluyen soluciones acuosas, jarabes con sabor adecuado, suspensiones acuosas o aceitosas y emulsiones saborizadas con aceites comestibles tales como aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de coco o aceite de cacahuete, así como elixires y vehículos farmacéuticos similares.

Generalmente, cuando se administra a un ser humano, la dosificación oral de cualquiera de los compuestos de la combinación de la invención dependerá de la naturaleza del compuesto, y una persona experimentada en la técnica puede determinarla fácilmente. Típicamente, dicha dosificación es normalmente de aproximadamente 0,001 mg a 2.000 mg por día, deseablemente de aproximadamente 1 mg a 1.000 mg por día, y más deseablemente de aproximadamente 5 mg a 500 mg por día. Pueden ser necesarias dosificaciones de hasta 200 mg por día.

La administración de cada fármaco en una terapia combinada, como se describe en la presente memoria, puede, independientemente, ser de una a cuatro veces al día durante un día a un año, e incluso puede ser para la vida del paciente. Se puede indicar la administración crónica a largo plazo.

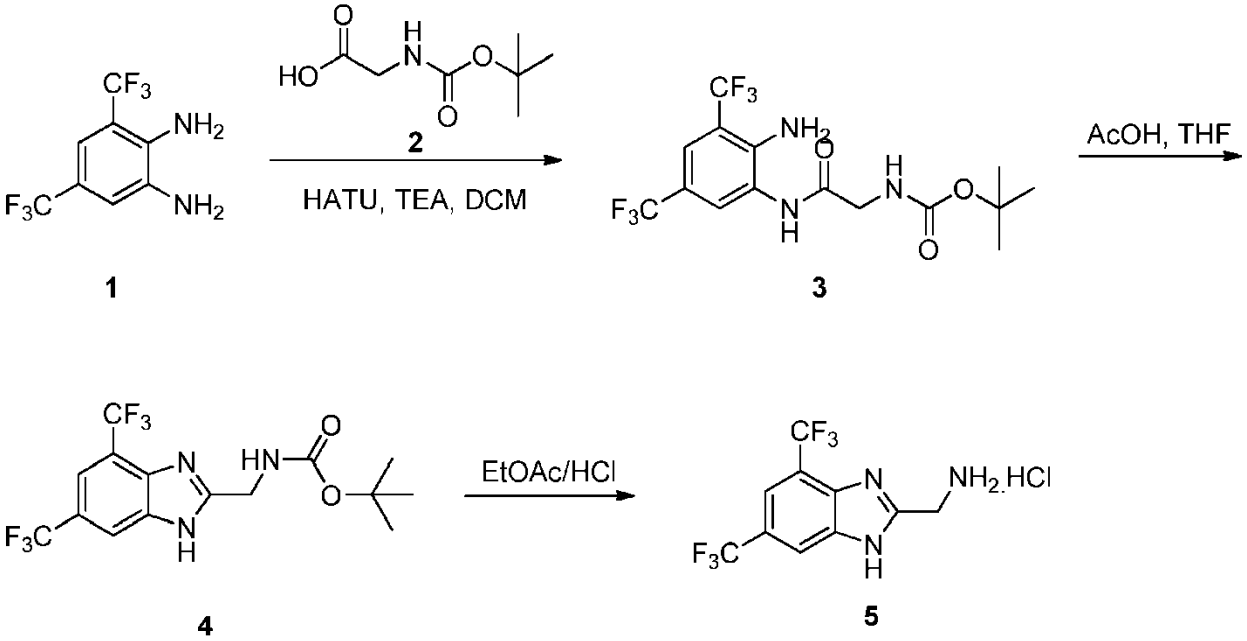
Síntesis

El esquema de reacción y los Ejemplos están destinados a ilustrar la síntesis de un número representativo de compuestos. Por consiguiente, los Ejemplos pretenden ilustrar, pero no limitar la invención. Los compuestos

adicionales no ejemplificados específicamente pueden sintetizarse usando procedimientos convencionales en combinación con los procedimientos descritos en la presente memoria. Los ejemplos que no entran dentro del alcance de las reivindicaciones son solo para fines ilustrativos.

Ejemplos

Ejemplo de referencia 1. Síntesis de (4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metanamina (5)



Síntesis de tert-butil (2-((2-amino-3,5-bis(trifluorometil)fenil)amino)-2-oxoetil)carbamato (**3**)

Ácido 3,5-bis(trifluorometil)benceno-1,2-diamina (**1**) (3,0 g, 12,3 mol), ácido 2-((tert-butoxicarbonil)amino)acético (**2**) (2,1 g, 12,3 mmol), HATU (6,4 g, 17,2 mmol) y trietilamina (TEA; 3,5 ml, 25 mmol) se agitaron en diclorometano (DCM; 50 ml) a temperatura ambiente durante 17 horas. La reacción se diluyó con DCM (100 ml), se lavó secuencialmente con NH_4Cl (solución saturada), $NaHCO_3$ (solución saturada) y salmuera. Los orgánicos se separaron, se secaron (Na_2SO_4) y se concentraron in vacuo. El residuo se purificó por cromatografía en columna automatizada (EtOAc/éter de petróleo, 35/65) para dar tert-butil (2-((2-amino-3,5-bis(trifluorometil)fenil)amino)-2-oxoetil)carbamato (**3**) (3,07 g, 61,7 %); Confirmado por LCMS (modo de iones positivos).

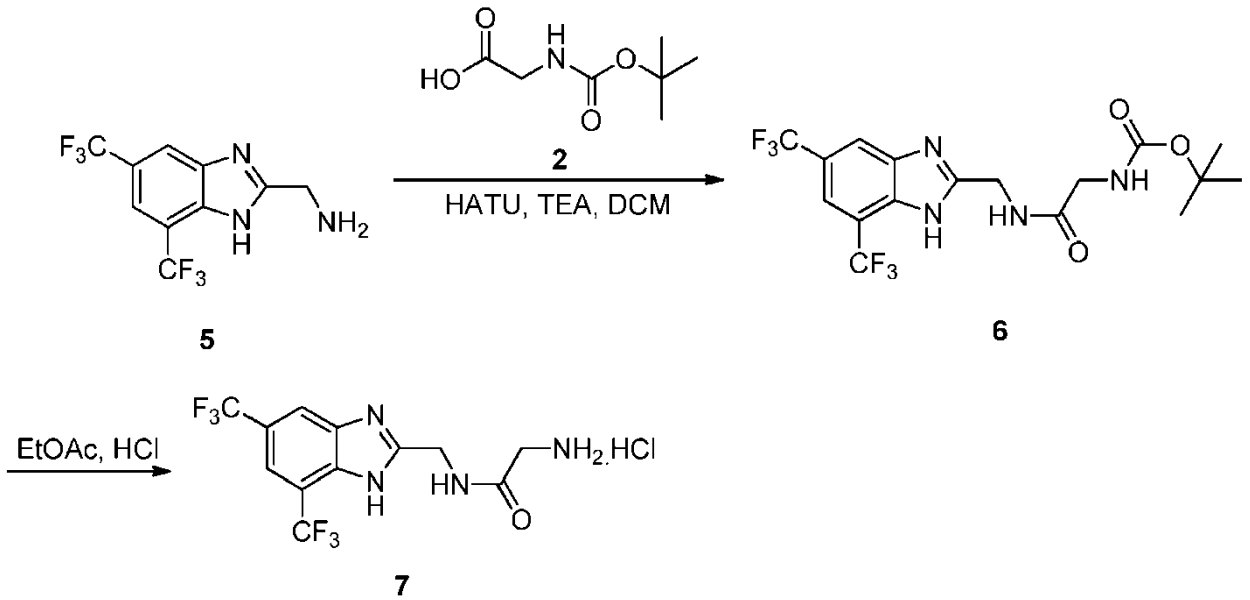
Síntesis de tert-butil ((4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)carbamato (**4**)

El tert-butil (2-((2-amino-3,5-bis(trifluorometil)fenil)amino)-2-oxoetil)carbamato (**3**) (1,4 g, 3,5 mmol) se calentó en THF/AcOH (95/5 , 20 ml) usando un microondas a 140 ºC durante 2,5 horas. La reacción se concentró in vacuo, se recogió en EtOAc y se lavó con $NaHCO_3$ (solución saturada) para neutralizar. La capa orgánica se separó, se secó (Na_2SO_4) y se concentró in vacuo. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna automatizada (EtOAc/PE, 50:50) para dar tert-butil ((4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)carbamato (**4**), (730 mg, 54 %); confirmado por LCMS (modo de iones positivos)).

Síntesis de clorhidrato de (4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metanamina (**5**)

El tert-butil ((4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)carbamato (**4**) (730 mg, 1,9 mmol) se recogió en EtOAc y la solución se enjuagó con HCl (g) durante 5 minutos. La suspensión resultante se agitó bajo temperatura ambiente durante 25 minutos y luego se concentró in vacuo. El sólido resultante se secó bajo alto vacío durante 14 horas para dar clorhidrato de (4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metanamina (**5**), de manera cuantitativa; ^1H RMN (300 mHz, CD_3OD) δ 4,57 (s, 2 H), 7,81 (s, 1 H), 8,21 (s, 1 H).

Ejemplo de referencia 2. Síntesis de clorhidrato de 2-amino-N-((5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il) metil)acetamida (7)



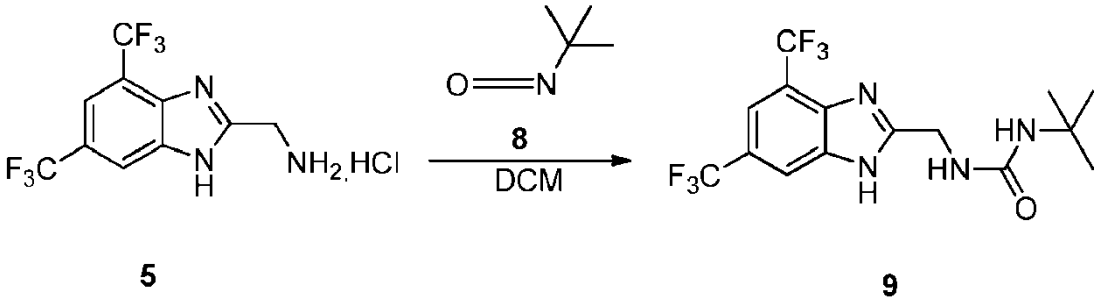
Síntesis de tert-butil (2-(((5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)amino)-2-oxoetil)carbamato (**6**)

Clorhidrato de (4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metanamina (**5**) (1 g, 2,6 mmol), BOC-gly (**2**) (4,55 mg, 2,6 mmol), Se agitaron HATU (1,35 g, 3,64 mmol) y TEA (0,73 ml, 5,2 mmOl) en DCM a temperatura ambiente durante 14 horas. La reacción se diluyó con DCM (100 ml) y se lavó secuencialmente con NH_4Cl (solución saturada), $NaHCO_3$ (solución saturada) y salmuera. Los orgánicos se separaron, se secaron (Na_2SO_4) y se concentraron in vacuo. El residuo se purificó por cromatografía en columna automatizada (EtOAc/PE, 50/50) para dar tert-butil (2-(((5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metilo)amino)-2-oxoetil)carbamato (**6**) (732 mg, 64 %; confirmado por LCMS (modo de iones positivos)).

Síntesis de clorhidrato de 2-amino-N-((5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)acetamida (**7**)

tert-butil (2-(((5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)amino)-2-oxoetil)carbamato (**6**) (732 mg, 1,66 mmol) se recogió en EtOAc y la solución se enjuagó con HCl (g) durante 5 minutos. La suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 20 minutos, se concentró in vacuo y el residuo se purificó por HPLC de fase inversa para dar clorhidrato de 2-amino-N-((5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)acetamida (**7**); ^1H RMN (300 mHz, CD_3OD) δ 3,45 (s, 2 H), 5,04 (s, 2 H), 8,18 (s, 1 H), (8,49, S, 1 H).

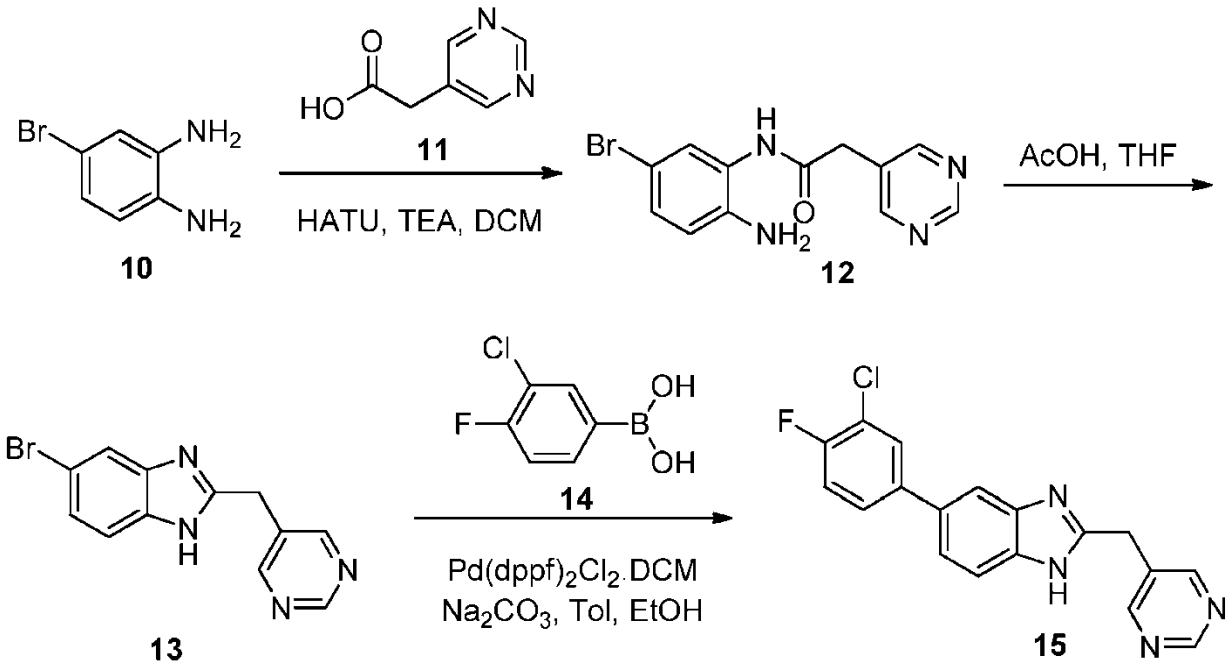
Ejemplo de referencia 3. Síntesis de 1-((4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)-3-(tert-butil)urea (9)



Síntesis de 1-((4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)-3-(tert-butil)urea (**9**)

Clorhidrato de (4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metanamina (**5**) (250 mg, 0,88 mmol) y TEA (0,25 ml, 1,8 mmol) se agitaron en DCM. Se añadió isocianato de tert-butil (**8**) (105 µl, 0,9 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se concentró in vacuo y el residuo se purificó por HPLC de fase inversa para dar 1-((4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)-3-(tert-butilo)urea (**9**). Confirmado por LCMS (modo de iones positivos).

Ejemplo de referencia 4. Síntesis de 5-(3-cloro-4-fluorofenil)-2-(pirimidin-5-ilmetil)-1H-benzo[d]imidazol (15).



Preparación de N-(2-amino-5-bromofenil)-2-(pirimidin-5-il)acetamida (**12**)

A una solución de 4-bromobenceno-1,2-diamina (**10**) (0,281g, 1,5 mmol), ácido 2-(pirimidin-5-il)acético (**11**) (0,207g, 1,5 mmol) y HATU (0,741 g, 1,95 mmol) en DCM (50 ml) se añadió trietilamina (0,63 ml, 4,5 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La solución se lavó con bicarbonato de sodio saturado (50 ml) y salmuera (50 ml). La solución de DCM se secó sobre sulfato de sodio y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía en columna automatizada en columnas usando DCM y metanol como eluyentes. Rendimiento 0,4 g, 87 %. MS: m/z 306,9 ($M+H^+$).

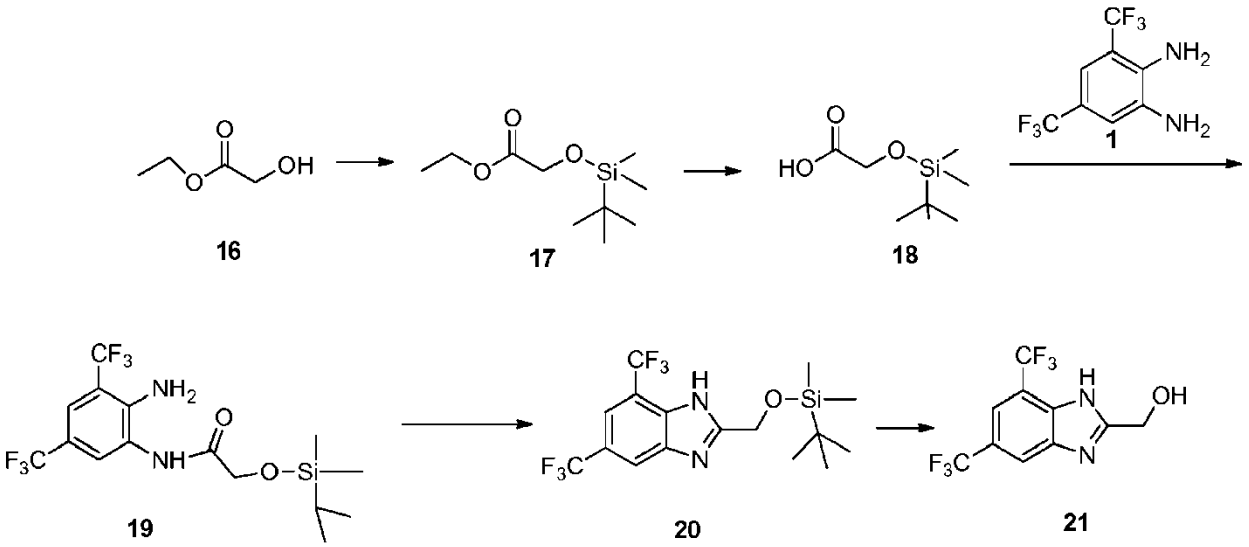
Preparación de 5-bromo-2-(pirimidin-5-ilmetil)-1H-benzo[d]imidazol (**13**)

Se hizo reaccionar una solución de N-(2-amino-5-bromofenil)-2-(pirimidin-5-il)acetamida (**12**) (0,4 g, 1,3 mmol) en THF (12 ml) y ácido acético (7 ml) en el microondas a 145 ºC durante 3 horas. Los disolventes fueron eliminados. El residuo se disolvió en acetato de etilo (50 ml) y se lavó con bicarbonato de sodio saturado (30 ml) y salmuera (30 ml). La solución de acetato de etilo se secó sobre sulfato de sodio y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía en columna automatizada usando DCM y metanol como eluyentes. Rendimiento 0,345 g, 91%. MS: m/z 288,9 ($M+H^+$).

Preparación de 5-(3-cloro-4-fluorofenil)-2-(pirimidin-5-ilmetil)-1H-benzo[d]imidazol (**15**)

Se añadió $Pd(dppf)_2Cl_2 \cdot DCM$ (0,274 g, 0,336 mmol) a una suspensión de 5-bromo-2-(pirimidin-5-ilmetil)-1H-benzo[d]imidazol (**13**) (0,345 g, 1,12 mmol), ácido 3-cloro-4-fluorobenceno borónico (**14**) (0,234 g, 1,34 mmol) y carbonato de sodio (0,594 g, 5,6 mmol) en etanol (7 ml) y tolueno (7 ml). La mezcla de reacción se agitó a 130 º C durante la noche. La solución marrón profunda se filtró a través de celita y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía en columna automatizada usando DCM y metanol como eluyentes. Rendimiento 0,15 g, 40 %. MS: m/z 338,9 ($M+H^+$).

Ejemplo de referencia 5. Síntesis de (5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metanol (21).



Preparación de 2-((tert-butildimetilsilil)oxi)acetato de etilo (**17**)

Se añadió una solución de 2-hidroxiacetato de etilo (**16**) (3,12 g, 30 mmol) e imidazol (2,45 g, 36 mmol) en DCM (100 ml) tert-butilclorodimetilsilano (5,43 g, 36 mmol) a 0 º C y la mezcla de reacción se agitó a 0 ºC durante 1 hora. La mezcla de reacción se lavó con bicarbonato de sodio saturado (50 ml) y salmuera (50 ml). La solución de DCM se secó sobre sulfato de sodio y se concentró. El residual (**17**) (6,68 g, 100 % de rendimiento) se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

Preparación de ácido 2-((tert-butildimetilsilil)oxi)acético (**18**)

Una solución de 2-((tert-butildimetilsilil)oxi)acetato de etilo (**17**) (6,68 g, 30 mmol) en metanol (30 ml) se añadió a una solución de NaOH 2 N (30 ml). La mezcla se agitó entonces a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se concentró, se diluyó con agua y se acidificó con HCl 2 N a pH 4-5. La solución acuosa se extrajo con acetato de etilo 3 veces. La solución combinada de acetato de etilo se lavó con salmuera y se secó sobre sulfato de sodio y se concentró. El residuo (**18**) se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. Rendimiento 2,19 g, 38 %. MS, m/z 189,1 ($M-H^+$).

Preparación de N-(2-amino-3,5-bis(trifluorometil)fenit)-2-((isopropildimetilsilil)oxi)acetamida (**19**)

Una solución de 3,5-bis(trifluorometil)benceno-1,2-diamina (**1**) (1,28 g, 5,26 mmol), ácido 2-((tert-butildimetilsilil) oxi)acético (**18**) (1 g, 5,26 mmol) y HATU (2,6 g, 6,84 mmol) en DMF (15 ml) se hizo reaccionar en el microondas a 80 ºC durante 2 horas. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo. La solución se lavó con bicarbonato de sodio saturado y salmuera. La solución de acetato de etilo se secó sobre sulfato de sodio y se concentró. El residuo (**19**) se purificó por cromatografía en columna automatizada usando éter de petróleo y acetato de etilo como eluyentes. Rendimiento 0,84 g, 40 %. MS, m/z 403,0 ($M+H^+$).

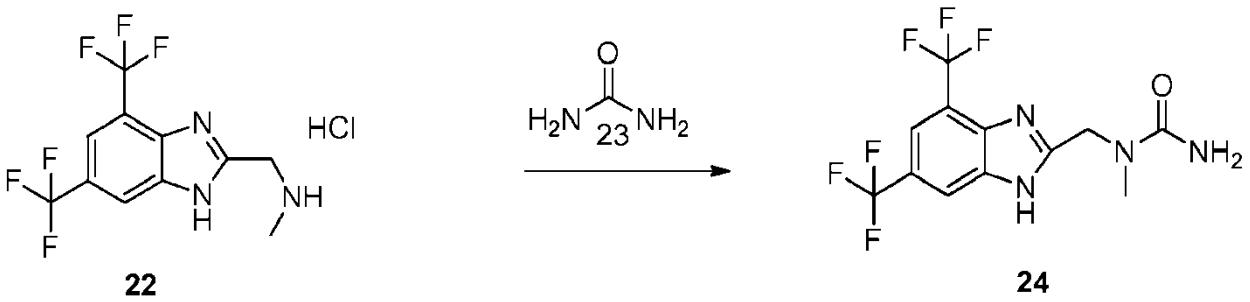
Preparación de 2-(((tert-butildimetilsilil)oxi)metil)-5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol (**20**)

Una solución de N-(2-amino-3,5-bis(trifluorometil)fenil)-2-((isopropil dimetilsilil)oxi)acetamida (**19**) (0,84 g, 2,09 mmol) en THF (14 ml) y ácido acético (7 ml) se hizo reaccionar en el microondas a 145 ºC durante 3 horas. Los disolventes fueron eliminados. El residuo se disolvió en acetato de etilo (50 ml) y se lavó con bicarbonato de sodio saturado (30 ml) y salmuera (30 ml). La solución de acetato de etilo se secó sobre sulfato de sodio y se concentró. El residuo (**20**) se purificó por cromatografía en columna automatizada usando PET éter y acetato de etilo como eluyentes. Rendimiento 0,5 g, 60 %. MS, m/z 399,0 ($M+H^+$).

Preparación de (5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metanol (**21**)

A una solución de 2-((((tert-butildimetilsilil)oxi)metil)-5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol (**20**) (0,5 g, 1,26 mmol) en THF (15 ml) solución de TBAF 1 M añadida en THF (1,7 ml, 1,7 mmol) a 0 ºC. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El disolvente fue eliminado. El residuo se disolvió en acetato de etilo (50 ml) y se lavó con salmuera (30 ml). La solución de acetato de etilo se secó sobre sulfato de sodio y se concentró. El residuo de (**34**) se purificó por cromatografía en columna automatizada usando éter de petróleo y acetato de etilo como eluyentes. Rendimiento 0,22 g, 61 %. MS, m/z 284,9 ($M+H^+$).

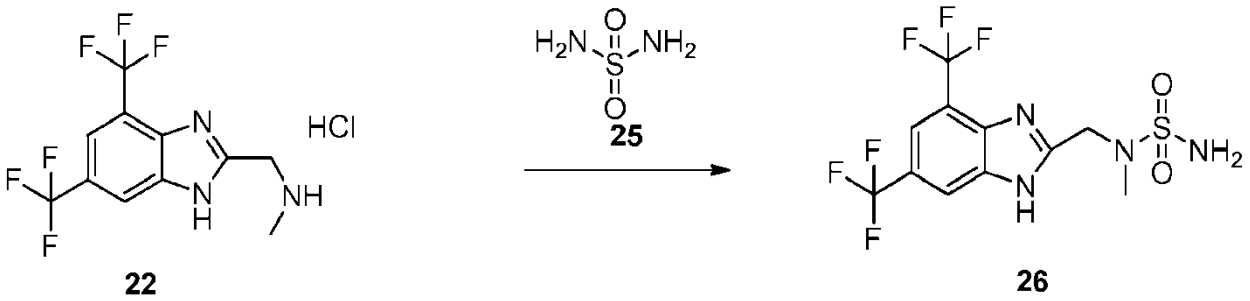
Ejemplo de referencia 6. Síntesis de (1-((4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)-1-metilurea (24).



Preparación de (1-((4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)-1-metilurea (**24**)

Una solución de clorhidrato de 1-(4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)-N-metilmetanamina (**22**) (0,4 g, 1,19 mmol) y urea (**23**) (0,11 g, 1,83 mmol) en agua (10 ml) se sometió a reflujo durante una noche. En este momento, los cristales se separaron del líquido y luego se recolectaron por filtración. El producto precipitado (**24**) se lavó con agua y se secó. Rendimiento 0,3 g, 72 %. MS, m/z 340,22 ($M+H^+$).

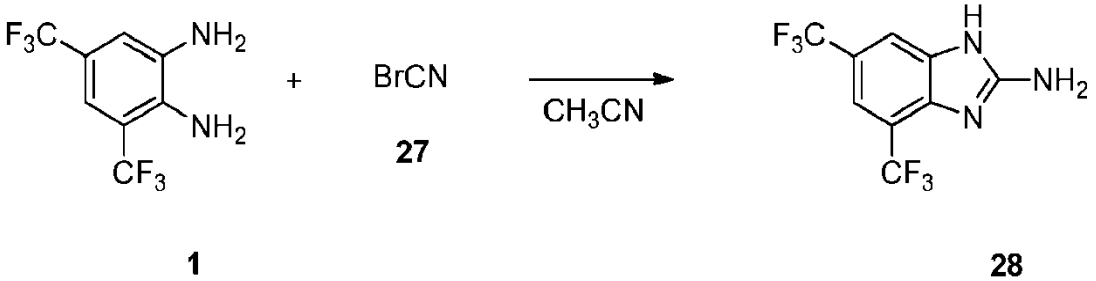
Ejemplo de referencia 7. Síntesis de diamida (1-((4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)-1-N-metilsulfúrica (26).



Preparación de diamida (1-((4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)-1-N-metilsulfúrica (**26**)

Una solución de clorhidrato de 1-(4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)-N-metilmetanamina (**22**) (0,2 g, 0,6 mmol), sulfamida (**25**) (0,16 g, 1,68 mmol) en dioxano (15 ml) se calentó a reflujo durante 6 horas. Luego se enfrió la mezcla de reacción y se evaporó el disolvente. El residuo se disolvió en agua (10 ml) y el acuoso se extrajo con acetato de etilo tres veces. Las capas combinadas de acetato de etilo se combinaron, se secaron y se evaporaron. El residuo (**26**) se purificó por cromatografía en columna automatizada usando éter de petróleo y acetato de etilo como eluyentes. Rendimiento del 70 %. MS, m/z 376,28 ($M+H^+$).

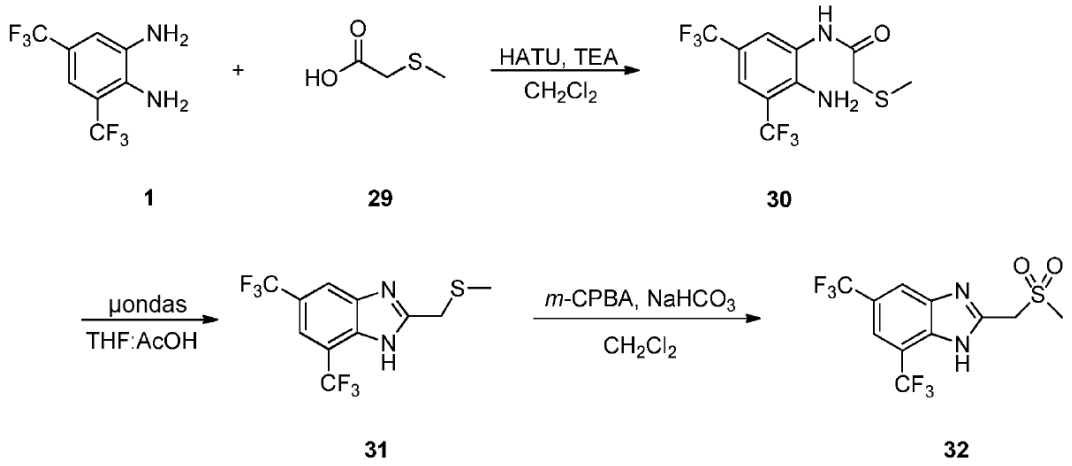
Ejemplo de referencia 8. Síntesis de 4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-amina (28)



Preparación de 4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-amina (**28**)

A una solución de 3,5-bis (trifluorometil)benceno-1,2-diamina (**1**) (0,40 g, 1,6 mmol) en acetonitrilo (15 ml) se le añadió una solución de bromuro de cianógeno en acetonitrilo (**27**) (5 M, 0,66 ml, 3,3 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 23 horas. En este momento, la reacción se concentró in vacuo, y el producto crudo se purificó por cromatografía instantánea automatizada para proporcionar (**28**); confirmado por LCMS (modo de iones positivos)).

Ejemplo de referencia 9. Síntesis de 2-((metilsulfonil)metil)-4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol (32)



Preparación de N-(2-amino-3,5-bis(trifluorometil)fenil)-2-(metiltio)acetamida (**30**)

A una mezcla de 3,5-bis(trifluorometil)benceno-1,2-diamina (**1**) (0,50 g, 2,1 mmol), ácido 2-(metiltio)acético (**29**) (0,22 g, 2,1 mmol) y HATU (1,01 g, 2,67 mmol) en diclorometano (15 ml) se añadió trietilamina (0,9 ml, 6 mmol). La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. La reacción se lavó luego con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (2 x 30 ml). La fase orgánica se secó luego sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró in vacuo. El producto crudo se purificó por cromatografía instantánea automatizada (2:1 hexano:acetato de etilo) para proporcionar el compuesto del título (**30**) (0,40 g, 59 %; confirmado por LCMS (modo de iones positivos)) como un aceite amarillo pálido, que se cristalizó en reposo. El otro regioisómero no se observó durante el curso de la purificación.

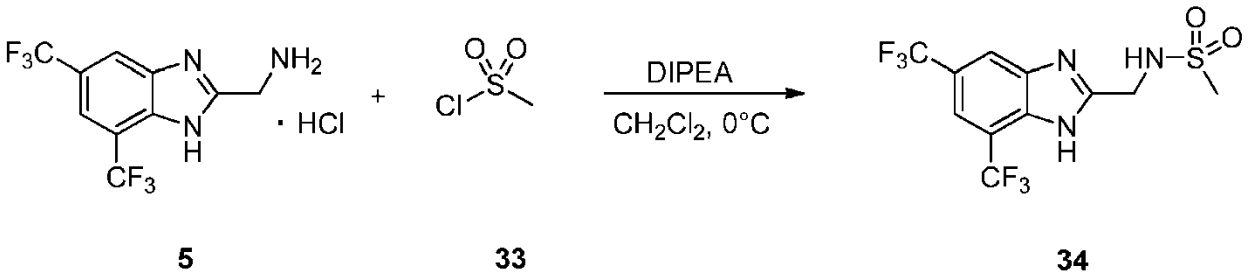
Preparación de 2-((metiltio)metil)-4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol (**31**)

A una solución de N-(2-amino-3,5-bis(trifluorometil)fenil)-2-(metiltio)acetamida (**30**) (0,40 g, 1,2 mmol) en tetrahidrofurano (3 ml) se añadió ácido acético glacial (2 ml). La reacción se selló en un vial de reacción de microondas y se calentó a 130 ºC durante 30 minutos. La solución resultante se concentró in vacuo, se recogió en acetato de etilo (40 ml) y se lavó con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (2 x 10 ml). La fase orgánica se secó luego sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró in vacuo. El producto crudo se purificó por cromatografía instantánea automatizada (2:1 hexano:acetato de etilo) para proporcionar el compuesto del título (**31**) (0,34 g, 89 %; confirmado por LCMS (modo de iones positivos)) como un sólido amarillo.

Preparación de 2-((metilsulfonil)metil)-4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol (**32**)

A una solución de 2-((metiltio)metil)-4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol (**31**) (0,34 g, 1,1 mmol) en diclorometano (20 ml) se añadió m-CPBA (77 %, 0,73 g, 3,2 mmol) y bicarbonato de sodio (0,45 g, 5,4 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 17 horas, momento en el que se añadió diclorometano (30 ml). A la solución resultante se le añadió una solución acuosa de hidróxido de sodio (2 M, 10 ml) y una solución acuosa saturada de tiosulfato de sodio (10 ml). La mezcla se dejó agitar durante 1 hora. La capa acuosa se separó posteriormente, se acidificó con ácido clorhídrico (2 M, 12 ml), se extrajo con acetato de etilo (3 x 30 ml) y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El aceite resultante se recogió en una mezcla de acetato de etilo:metanol (1:1) y se filtró. Luego, el filtrado se concentró in vacuo, y el producto se purificó por cromatografía instantánea automatizada para proporcionar el compuesto del título (**32**) (confirmado por LCMS (modo de iones positivos)).

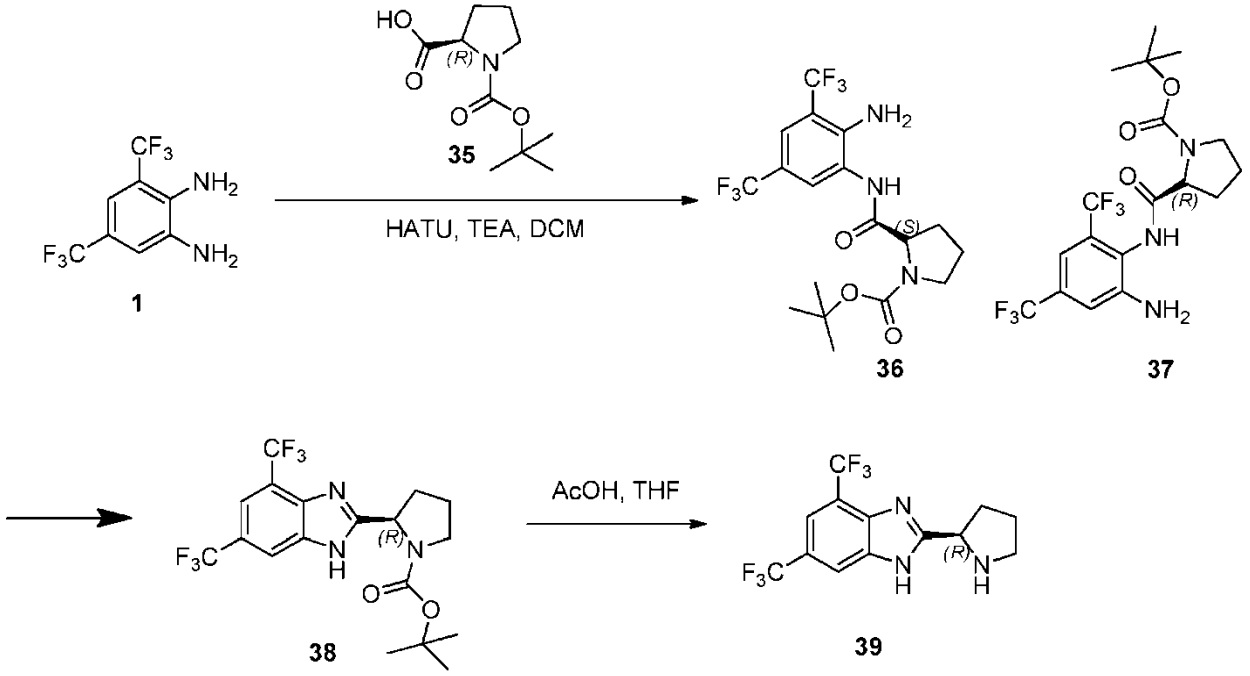
Ejemplo de referencia 10. Síntesis de N-((5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil) metanosulfonamida (34)



Preparación de N-((5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)metanosulfonamida (**34**)

A una solución de (5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metanamina cloruro de hidrógeno (**5**) (0,30 g, 0,94 mmol) y DIPEA (0,3 ml, 2 mmol) en diclorometano (25 ml) a 0 º C se añadió cloruro de metanosulfonilo (**33**) (0,07 ml, 0,94 mmol) gota a gota mediante una jeringa. La solución resultante se calentó a temperatura ambiente, se agitó durante 72 horas y luego se concentró in vacuo. El aceite resultante se recogió en diclorometano (30 ml) y se lavó con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (20 ml) y salmuera (20 ml). La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró in vacuo. El producto crudo se purificó por cromatografía instantánea automatizada (acetato de etilo) para proporcionar el compuesto del título (**34**) (confirmado por LCMS (modo de iones positivos).

Ejemplo de referencia 11. Síntesis de (R)-2-(pirrolidin-2-il)-4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol (39)

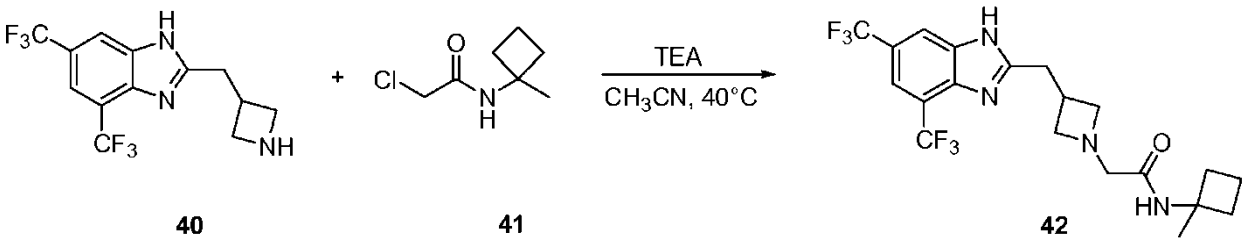


Preparación de (R)-2-(pirrolidin-2-il)-4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol (**39**)

Ácido 3,5-bis(trifluorometil)benceno-1,2-diamina (**1**) (1,5 g, 6,14 mmol), (R)-1-(tert-butoxicarbonil)pirrolidina-2-carboxílico (**35**) (1,30 g, 6,04 mmol), TEA (1,1 ml, 7,98 mmol) y HATU (3,2 g, 8,42 mmol) se disolvieron en DCM (15 ml). Esta solución se agitó durante la noche a temperatura ambiente y luego se concentró in vacuo. El residuo se recogió en acetato de etilo (50 ml) y luego se lavó secuencialmente con cloruro de amonio acuoso saturado (20 ml), bicarbonato de sodio saturado (20 ml) y salmuera (20 ml). La fracción orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró in vacuo. El residuo se purificó por cromatografía en columna automatizada (gradiente suave 20→70 % acetato de etilo:éter de petróleo) para proporcionar una mezcla de los isómeros deseados (**36**) y (**37**), confirmado por LCMS (modo de iones positivos).

La mezcla de isómeros se recogió en THF/AcOH (95/5) y se calentó usando un microondas a 140 ºC durante 2 horas. La reacción se concentró in vacuo, se recogió en EtOAc y luego se lavó con agua (30 ml), bicarbonato de sodio acuoso saturado (30 ml) y salmuera (30 ml). La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y luego se concentró in vacuo. El residuo se purificó por cromatografía en columna automatizada (gradiente suave 20→70 % acetato de etilo:éter de petróleo), y esta purificación inicial fue seguida por una segunda ronda de cromatografía en columna automatizada (gradiente suave 0→50 % acetato de etilo:diclorometano) para proporcionar el producto protegido con N-Boc (**38**) como goma transparente incolora. El producto se recogió en acetato de etilo saturado con HCl y se agitó durante dos horas a temperatura ambiente. La mezcla transparente se volvió lechosa con el tiempo y se condensó in vacuo para dar la sal de HCl del producto (**39**) como un sólido blanco (1,00 g, 51 % en dos etapas). ^{1}H RMN (300 MHz, CD_3OD) δ 2,24-2,40 (m, 3 H), 2,67-2,75 (m, 1 H), 3,52-3,59 (m, 1 H), 3,63-3,70 (m, 1 H), 5,17 (t, J = 6Hz, 1 H), 7,86 (s, 1 H), 8,25 (s, 1 H).

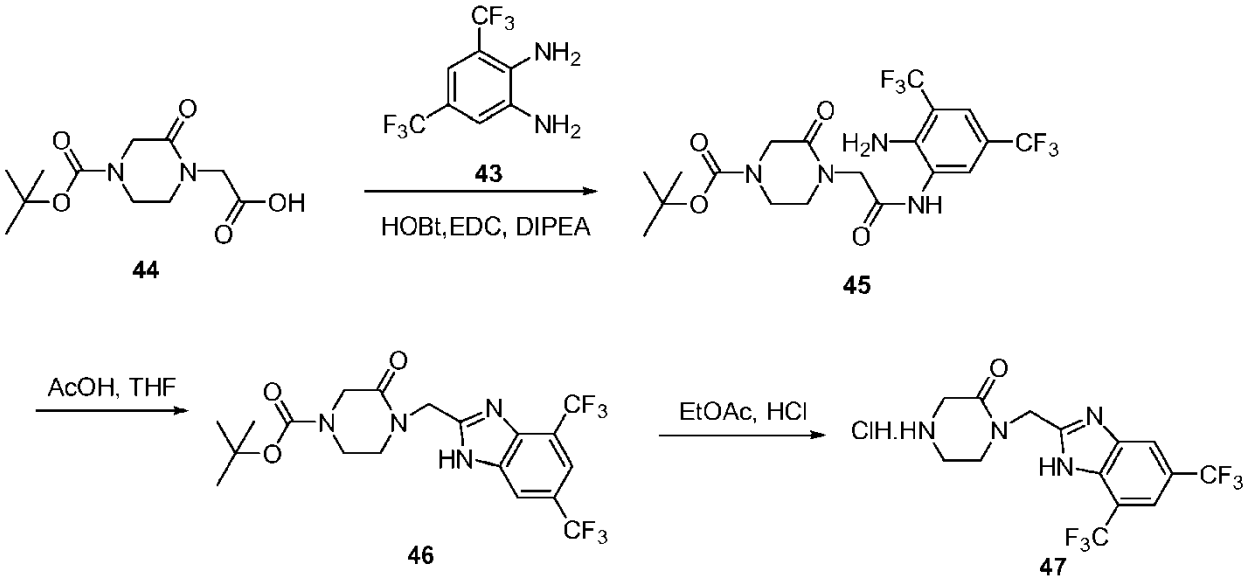
Ejemplo de referencia 12. Síntesis de 2-(3-((4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)azetidin-1-il)-N- (1-metilciclobutilo)acetamida (42)



Preparación de 2-(3-((4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)azetidin-1-il)-N-(1-metilciclobutil)acetamida (**42**)

A una solución de 2-(azetidin-3-ilmetil)-4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol (**40**) (0,81 g, 2,5 mmol) y trietilamina (1,8 ml, 13 mmol) en acetonitrilo (50 ml) se añadió 2-cloro-N-(1-metilciclobutil)acetamida (**41**) (0,41 g, 2,5 mmol). La solución resultante se agitó a 40 º C durante 17 horas y se concentró in vacuo. El producto crudo se purificó por cromatografía instantánea automatizada para proporcionar el compuesto del título (**42**). El producto fue confirmado por LCMS (modo de iones positivos).

Ejemplo de referencia 13. Síntesis de clorhidrato de 1-((5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil) piperazin-2-ona (47)



Síntesis de tert-butil 4-(2-((2-amino-3,5-bis(trifluorometil)fenil)amino)-2-oxoetil)-3-oxopiperazina-1-carboxilato (**45**)

Ácido 2-(4-(tert-butoxicarbonil)-2-oxopiperazin-1-il)acético (**2**) (2,0 g, 7,77 mmol), 3,5 bis(trifluorometil)-O-fenilenodiamina (**44**) (2,15 g, 8,81 mmol), HOBt (1,36 g, 10,1 mmol), EDC (1,93 g, 10,1 mmol) y diisopropiletilamina (2,3 ml, 13,2 mmol) se agitaron en DMF (15 ml) a temperatura ambiente durante 14 horas. El residuo se concentró in vacuo y se recogió en EtOAc (200 ml). La mezcla de reacción se lavó secuencialmente con NH_4Cl (solución saturada), $NaHCO_3$ (solución saturada) y salmuera. Los orgánicos se separaron, se secaron (Na_2SO_4) y se concentraron in vacuo. El residuo se purificó por cromatografía en columna automatizada (EtOAc/PE) para dar tert-butilo 4-(2-((2-amino-3,5-bis(trifluorometil)fenil)amino)-2-oxoetil)-3-oxopiperazina-1-carboxilato (**45**) (3,5 g, 93 %; confirmado por LCMS (modo de iones positivos)).

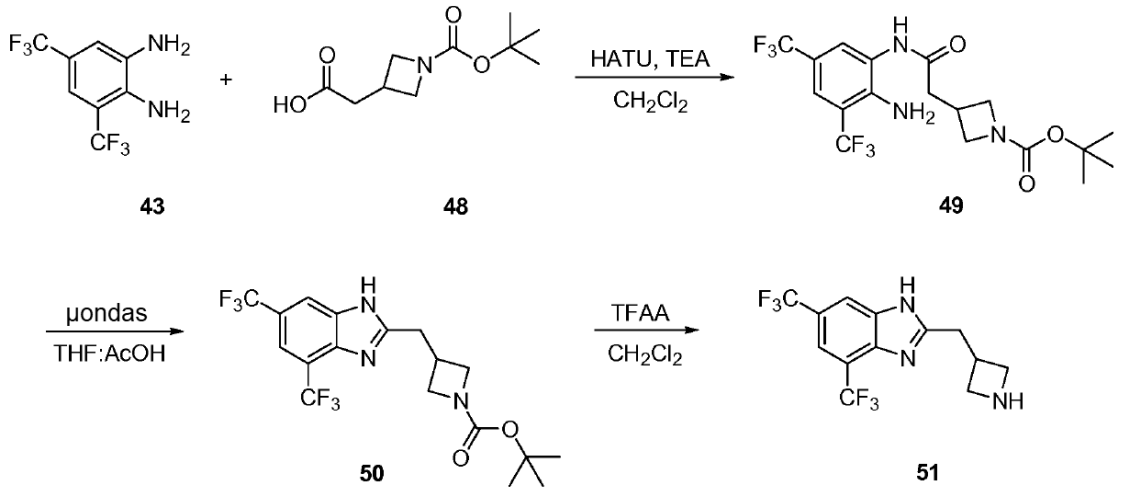
Síntesis de tert-butil 4-((4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)-3-oxopiperazina-1-carboxilato (**46**)

Se utilizó tert-butilo 4-(2-((2-amino-3,5-bis(trifluorometil)fenil)amino)-2-oxoetil)-3-oxopiperazina-1-carboxilato (**45**) (3,5 g, 7,23 mmol) se calentó en THF/AcOH (1:1, 20 ml) usando un microondas a 140 ºC durante 45 minutos. El residuo se concentró in vacuo y el residuo se recogió en EtOAc (150 ml). La mezcla de reacción se lavó secuencialmente con $NaHCO_3$ (solución saturada) y salmuera. Los orgánicos se separaron, se secaron (Na_2SO_4) y se concentraron in vacuo. El residuo se purificó por cromatografía en columna automatizada (EtOAc) para dar tert-butil 4-((4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)-3-oxopiperazina-1-carboxilato (**46**) (3,1 g, 92 %; confirmado por LCMS (modo de iones positivos))

Síntesis de clorhidrato de 1-((5,7-bis (trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)piperazin-2-ona (**47**)

Se recogió tert-butilo 4-((4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)-3-oxopiperazina-1-carboxilato (**46**) (3,1 g, 6,65 mmol) en EtOAc, y la solución se enjuagó con HCl (g) durante 5 minutos. La suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos y luego se concentró in vacuo. El sólido resultante se secó bajo alto vacío durante 14 horas para dar clorhidrato de 1-((5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)piperazin-2-ona (**47**) de manera cuantitativa ^{1}H RMN (300 mHz, CD_3OD) δ 3,70-3,75 (m, 2 H), 4,00-4,10 (m, 4 H), 5,10 (s, 1 H), 8,15 (s, 1 H), 8,2 (s, 1 H), 7,86 (s, 1 H).

Ejemplo de referencia 14. Síntesis de 2-(azetidin-3-ilmetil)-4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol (51)



Preparación de tert-butilo 3-(2-((2-amino-3,5-bis(trifluorometil)fenil)amino)-2-oxoetil)azetidina-1-carboxilato (**49**)

A una mezcla de ácido 3,5-bis(trifluorometil)benceno-1,2-diamina (**43**) (3,00 g, 12,3 mmol), ácido 2-(1-(tert-butoxicarbonil)azetidin-3-il)acético (**48**) (2,64 g, 12,3 mmol) y HATU (6,08 g, 16,0 mmol) en diclorometano (60 ml) se añadió trietilamina (5,1 ml, 36,9 mmol). La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 23 horas y luego se lavó con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (2 x 70 ml). La fase orgánica se secó luego sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró in vacuo. El producto crudo se purificó por cromatografía instantánea automatizada (1:1 hexano:acetato de etilo) para proporcionar el compuesto del título (**49**) (3,46 g, 64 %) como una espuma blanca. El otro regioisómero no se observó durante el curso de la purificación. El producto fue confirmado por LCMS (modo de iones positivos).

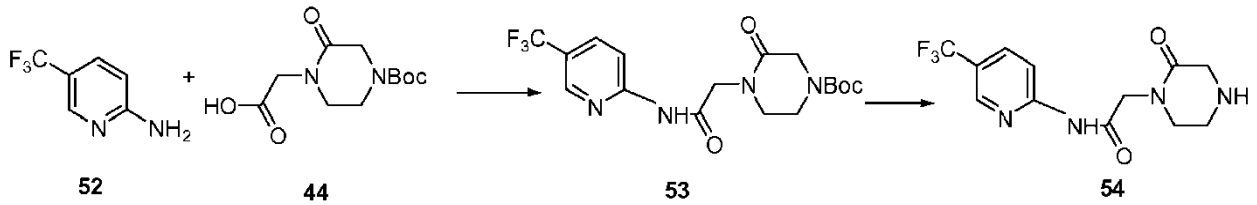
Preparación de tert-butil 3-((4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)azetidina-1-carboxilato (**50**)

A una solución de tert-butilo 3-(2-((2-amino-3,5-bis(trifluorometil)fenil)amino)-2-oxoetil)azetidina-1-carboxilato (**49**) (2,54 g, 5,75 mmol) en tetrahidrofurano (15 ml) se añadió ácido acético glacial (3 ml). La reacción se selló en un vial de reacción de microondas y se hizo reaccionar a 130 ºC durante 45 minutos. La solución resultante se concentró in vacuo, se recogió en acetato de etilo (80 ml) y se lavó con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (20 ml). La fase orgánica se secó luego sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró in vacuo. El producto bruto se purificó por cromatografía instantánea automatizada (1:1 hexano:acetato de etilo) para proporcionar el compuesto del título (**50**) (2,12 g, 87 %) como un sólido blanco. El producto fue confirmado por LCMS (modo de iones positivos).

Preparación de 2-(azetidin-3-ilmetil)-4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol (**51**)

A una solución de tert-butilo 3-((4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)azetidina-1-carboxilato (**50**) (1,06 g, 2,50 mmol) en diclorometano (40 ml) se añadió ácido trifluoroacético (2,4 ml, 31 mmol). La solución resultante se dejó agitar a temperatura ambiente durante 2,5 horas y luego se concentró in vacuo. El aceite resultante se recogió en tolueno (30 ml) y luego se concentró in vacuo. El producto crudo se purificó por cromatografía instantánea automatizada (80:20:1 diclorometano:metanol:hidróxido de amonio) para proporcionar el compuesto del título (**51**) como una espuma de color crema; ^{1}H RMN (400 MHz, CD_3OD) δ 3,22 (quinteto, 1H), 3,28 (d, 2H), 3,47 (septeto, 1H), 3,99 (m, 2H), 4,16 (m, 2H), 7,64 (s, 1H), 8,00 (s, 1H). El producto fue confirmado por LCMS (modo de iones positivos).

Ejemplo de referencia 15. Síntesis de 2-(2-oxopiperazin-1-il)-N-(5-(trifluorometil)piridin-2-il)acetamida (54)



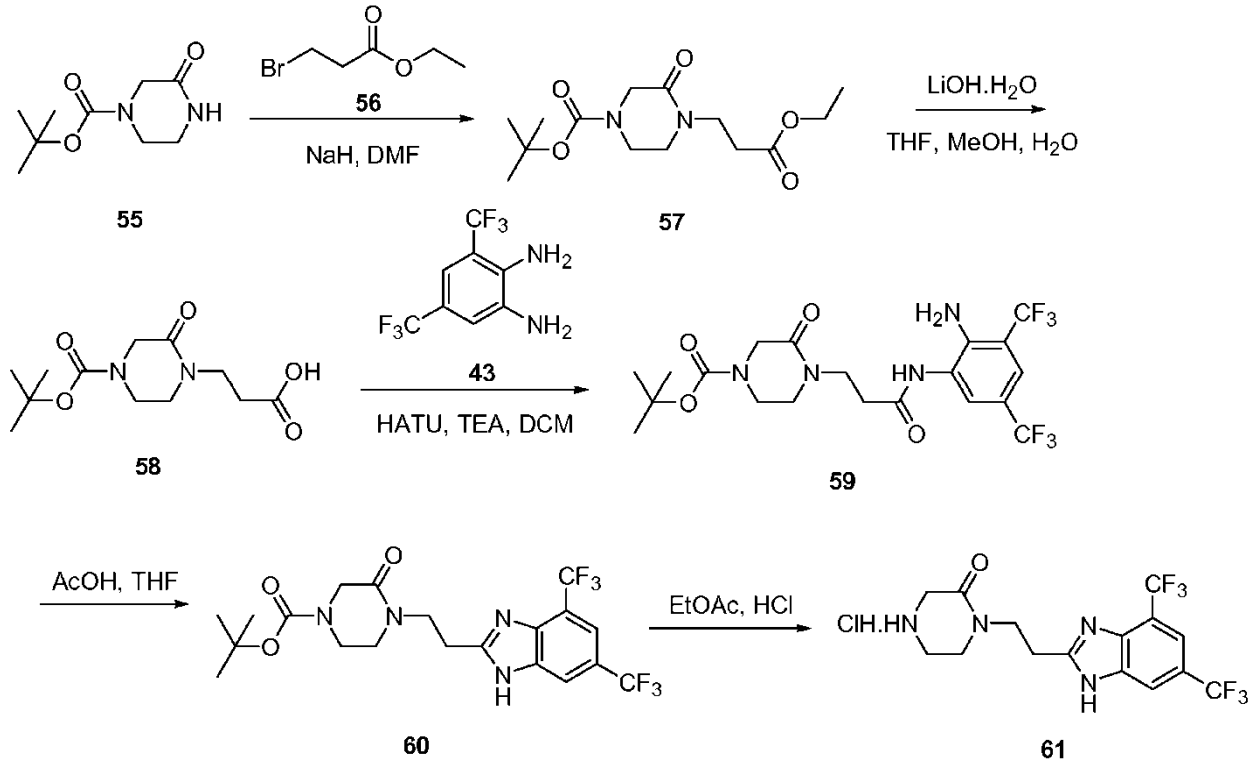
Síntesis de tert-butil 3-oxo-4-(2-oxo-2-((5-(trifluorometil)piridin-2-il)amino)etil)piperazina-1-carboxilato (**53**)

A una solución de ácido 5-(trifluorometil)piridin-2-amina (**52**) (0,162 g, 1 mmol), ácido 2-(4-(tert-butoxicarbonil)-2-oxopiperazin-1-il)acético (**44**) (0,257 g, 1 mmol) y HATU (0,46 g, 1,3 mmol) en 3 ml de DMF se añadió trietilamina (0,3 ml, 3 mmol). La mezcla se calentó en un microondas a 75 ºC durante 2 horas. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo y se lavó con solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio y salmuera. La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía instantánea automatizada usando PET éter y acetato de etilo como eluyentes. Rendimiento 0,15 g, 50 %. LCMS m/z 401,9 ($M+H^+$).

Síntesis de 2-(2-oxopiperazin-1-il)-N-(5-(trifluorometil)piridin-2-il)acetamida (**54**)

A una solución de tert-butilo 3-oxo-4-(2-oxo-2-((5-(trifluorometil)piridin-2-il)amino)etil)piperazina-1-carboxilato (**53**) (0,15 g, 0,5 mmol) en acetato de etilo (3 ml) se añadió solución saturada de HCl en acetato de etilo (2 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La mezcla de reacción luego se concentró y se secó in vacuo para dar 2-(2-oxopiperazin-1-il)-N-(5-(trifluorometil)piridin-2-il)acetamida (**54**) como sal de HCl. Rendimiento 0,165 g, 98 %. LCMS m/z 301,9 ($M+H^+$).

Ejemplo de referencia 16. Síntesis de 1-(2-(4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)etil)piperazin-2-ona (61)



Síntesis de tert-butil 4-(3-etoxi-3-oxopropil)-3-oxopiperazina-1-carboxilato (**57**)

Se agitó tert-butilo 3-oxopiperazina-1-carboxilato (55 g) (4,0 g, 20 mmol) en DMF seco a temperatura ambiente bajo Ar. Se añadió NaH (dispersión al 60 % en aceite mineral) (960 mg, 24 mmol) y la reacción se agitó durante 30 minutos. Se añadió bromopropionato de etilo (**56**) (2,55 ml, 20 mmol) en una porción, y la agitación continuó durante 14 horas. La reacción se dividió entre EtOAc y H_2O. Los orgánicos se separaron, se secaron (Na_2SO_4) y se concentraron in vacuo para dar tert-butilo 4-(3-etoxi-3-oxopropil)-3-oxopiperazina-1-carboxilato como un residuo crudo, que se usó en la reacción posterior sin purificación adicional. El producto se confirmó con LCMS (modo de iones positivos).

Síntesis de ácido 3-(4-(tert-butoxicarbonil)-2-oxopiperazin-1-il)propanoico (**58**)

Se agitaron tert-butilo 4-(3-etoxi-3-oxopropil)-3-oxopiperazina-1-carboxilato (**57**); como el residuo crudo de la etapa anterior) y LiOH·H_2O (1,26 g, 30 mmol) en THF/H_2O/MeOH (40/40/15 ml) a temperatura ambiente durante 16 horas. La solución resultante se filtró para eliminar la precipitación sólida. El disolvente orgánico se eliminó in vacuo, y la solución se acidificó con HCl 1M. La reacción se extrajo con EtOAc (3 x 75 ml), y los orgánicos se secaron (Na_2SO_4) y se concentraron in vacuo para dar ácido 3-(4-(tert-butoxicarbonil)-2-oxopiperazin-1-il) propanoico (**58**) (4,4 g, 81 % a partir de tert-butilo 3-oxopiperazina-1-carboxilato (**55**). El producto se confirmó por LCMS (modo de iones negativos).

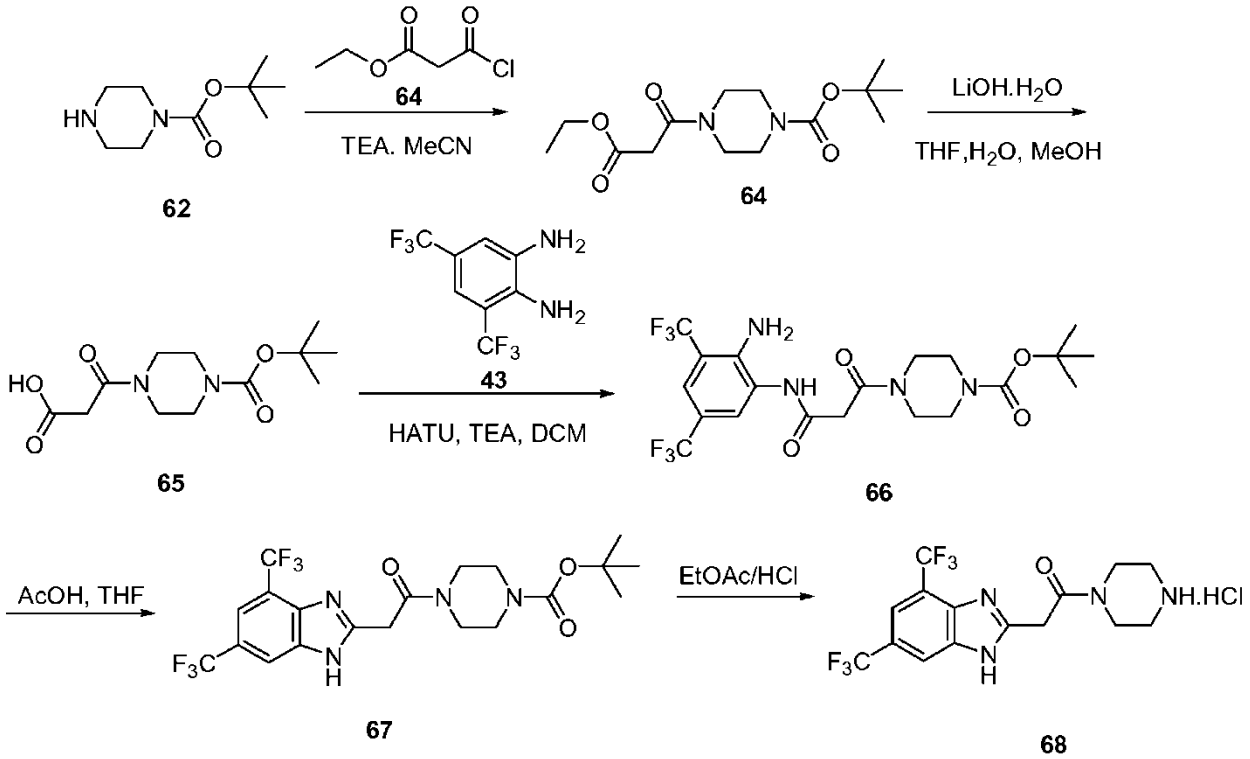
Síntesis de tert-butil 4-(3-((2-amino-3,5-bis(trifluorometil)fenil)amino)-3-oxopropil)-3-oxopiperazina-1-carboxilato (**59**)

Se agitaron ácido 3-(4-(tert-butoxicarbonil)-2-oxopiperazin-1-il)propanoico (**58**) (1,52 g, 5,6 mmol), 3,5 bis(trifluorometil)-O-fenilenodiamina (**1**) (1,36 g, 5,6 mmol), HATU (2,91 g, 7,84 mmol) y TEA (1,56 ml, 11,8 mmol) en DCM (50 ml) a temperatura ambiente durante 14 horas. La reacción se diluyó con DCM (100 ml), se lavó secuencialmente con NH_4Cl (solución saturada), $NaHCO_3$ (solución saturada) y salmuera, los orgánicos se separaron, se secaron (Na_2SO_4) y se concentraron in vacuo. El residuo se purificó por cromatografía en columna automatizada (100 % EtOAc/PE) para dar tert-butilo 4-(3-((2-amino-3,5-bis(trifluorometil)fenil)amino)-3-oxopropil)-3-oxopiperazina-1-carboxilato (**59**) (2,64 g, 95 %; confirmado por LCMS (modo de iones positivos)).

Síntesis de clorhidrato de 1-(2-(4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)etil)piperazin-2-ona (**61**)

Se calentó tert-butilo 4-(3-((2-amino-3,5-bis(trifluorometil)fenil)amino)-3-oxopropil)-3-oxopiperazina-1-carboxilato (**59**) (500 mg, 1,0 mmol) en THF/AcOH (95: 5, 2 ml) usando un microondas a 140 ºC durante 2,5 horas. El residuo se concentró in vacuo para dar tert-butilo 4-(2-(4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo [d]imidazol-2-il)etil)-3-oxopiperazina-1-carboxilato crudo (**60**). El material crudo se recogió en EtOAc y la solución se enjuagó con HCl (g) durante 5 minutos. La suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 20 minutos y se concentró in vacuo. El residuo se purificó por HPLC de fase inversa para dar clorhidrato de 1-(2-(4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)etil)piperazin-2-ona (**61**).

Ejemplo de referencia 17. Síntesis de 2-(4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)-1-(piperazin-1-il)etanona (68)



Síntesis de tert-butil 4-(3-etoxi-3-oxopropanoil)piperazina-1-carboxilato (**64**)

Se agitaron tert-butilo piperazina-1-carboxilato (**62**) (1 g, 5,4 mmol) y TEA (837 µL, 6,0 mmol) en DCM a temperatura ambiente. Se añadió cloruro de etil malonilo (**63**) (810 µl, 5,4 mmol) en una porción, y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se diluyó con DCM y se lavó secuencialmente con NH_4Cl (solución saturada) y $NaHCO_3$ (solución saturada). Los orgánicos se separaron, se secaron (Na_2SO_4) y se concentraron in vacuo. El residuo se purificó por cromatografía en columna automatizada (100 % EtOAc) para dar tert-butilo 4-(3-etoxi-3-oxopropanoil)piperazina-1-carboxilato (**64**) (1,24 g, 77 %). El producto fue confirmado por LCMS (modo de iones positivos).

Síntesis de ácido 3-(4-(tert-butoxicarbonil)piperazin-1-il)-3-oxopropanoico (**65**)

Se agitó tert-butilo 4-(3-etoxi-3-oxopropanoil)piperazina-1-carboxilato (**64**) (1,24 g, 2,8 mmol) y LiOH.H_2O (176 mg, 4,2 mmol) en THF/H_2O/MeOH (30/30/10 ml) a temperatura ambiente durante 14 horas. Los disolventes orgánicos se eliminaron in vacuo, y la solución se acidificó con HCl 1 M y se extrajo con EtOAc. Los orgánicos se separaron, se secaron (Na_2SO_4) y se concentraron in vacuo para dar ácido 3-(4-(tert-butoxicarbonil)piperazin-1-il)-3-oxopropanoico (**65**) de forma cuantitativa. El producto se confirmó por LCMS (modo de iones negativos) y se usó en la reacción posterior sin purificación adicional.

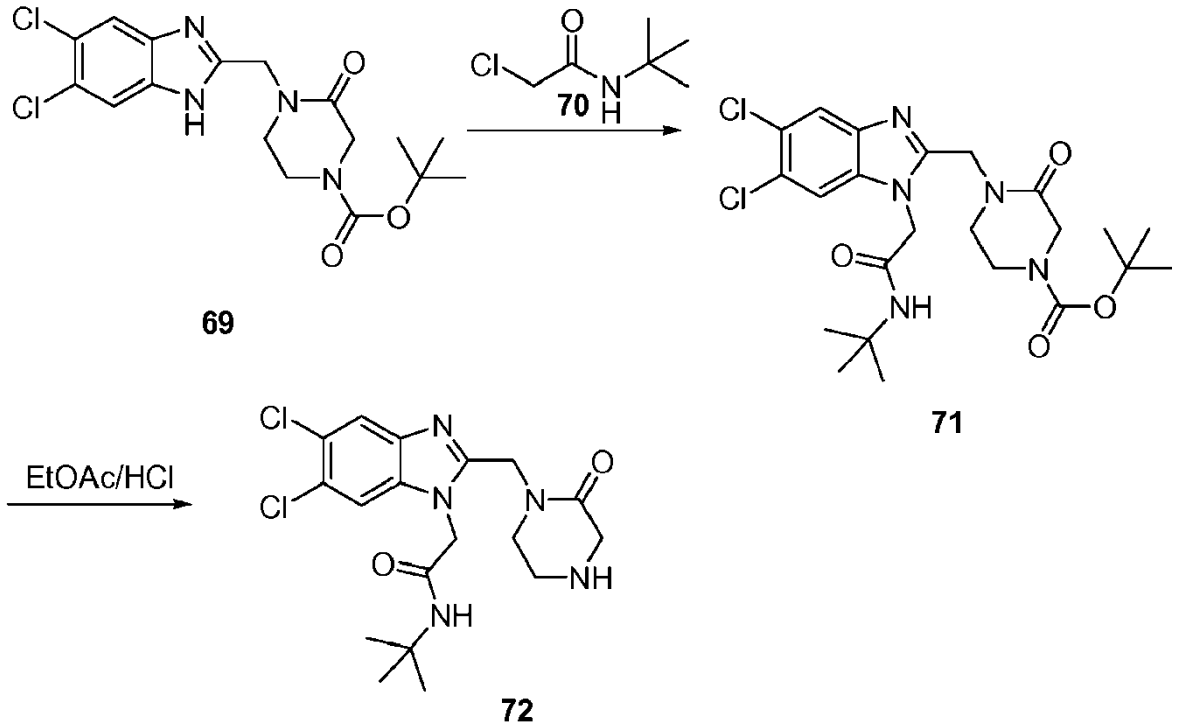
Síntesis de tert-butil 4-(3-((2-amino-3,5-bis(trifluorometil)fenil)amino)-3-oxopropanoil)piperazina-1-carboxilato (**66**)

Se agitaron ácido 3-(4-(tert-butoxicarbonil)piperazin-1-il)-3-oxopropanoico (**65**) (761 mg, 2,8 mmol), 3,5-bis(trifluorometil)benceno-1,2-diamina (**43**) (744 mg, 3,05 mmol), HATU (1,6 g, 4,27 mmol) y TEA (906 µl, 6,5 mmol) en DCM a temperatura ambiente durante 14 horas. El precipitado se eliminó por filtración. El filtrado se diluyó con DCM y se lavó secuencialmente con NH_4Cl (solución saturada) y $NaHCO_3$ (solución saturada). Los orgánicos se separaron, se secaron (Na_2SO_4) y se concentraron in vacuo. El residuo se purificó por cromatografía en columna automatizada (EtOAc/PE, 50/50) para dar tert-butilo 4-(3-((2-amino-3,5-bis(trifluorometil)fenil)amino)-3-oxopropanoil)piperazina-1-carboxilato (**66**) (650 mg, 42 %). El producto fue confirmado por LCMS (modo de iones positivos).

Síntesis de clorhidrato de 2-(4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)-]-(piperazin-1-il)etanona (**68**)

Se calentó tert-butilo 4-(3-((2-amino-3,5-bis(trifluorometil)fenil)amino)-3-oxopropanoil)piperazina-1-carboxilato (**66**) (650 mg, 1,31 mmol) en THF/AcOH (95:5, 2 ml) usando un microondas a 140 ºC durante 2,5 horas. El residuo se concentró in vacuo para dar tert-butilo 4-(2-(4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)acetil)piperazina-1-carboxilato bruto (**67**). El crudo se recogió en EtOAc y la solución se enjuagó con HCl (g) durante 5 minutos. La suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 20 minutos y se concentró in vacuo. El residuo se purificó por HPLC de fase inversa para dar clorhidrato de 2-(4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)-1-(piperazin-1-il)etanona (**68**).

Ejemplo de referencia 18. Síntesis de 1-((1-(2-hidroxi-2-metilpropil)-4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)piperazin-2-ona (30)

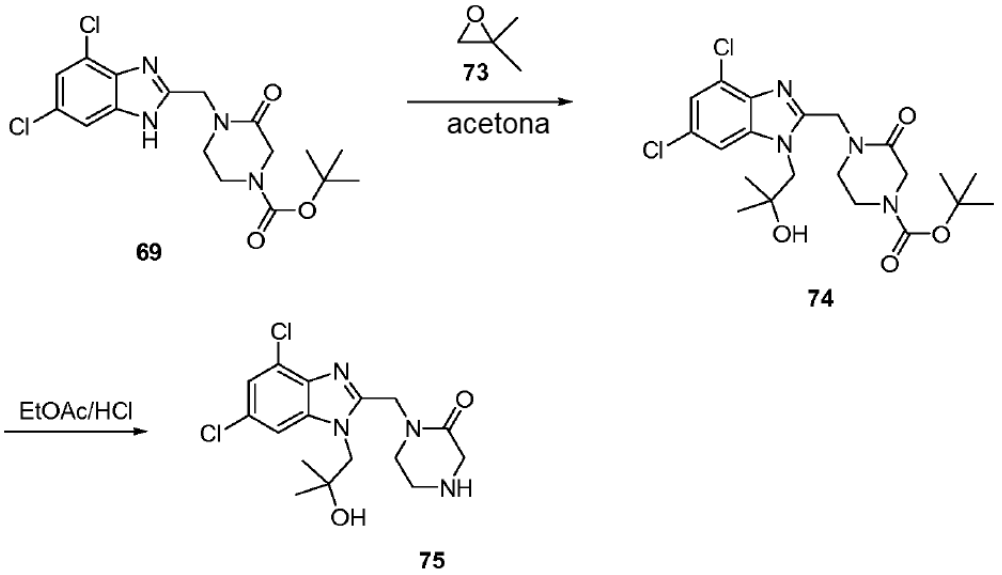


Preparación de 1-((1-(2-hidroxi-2-metilpropil)-4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)piperazin-2-ona (**72**)

Se disolvieron tert-butil-4-((5,6-dicloro-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)-3-oxopiperazina-1-carboxilato (**69**) (0,50 g, 1,25 mmol) y N-(tert-butil)-2-cloroacetamida (**70**) (0,20 g, 1,3 mmol) en acetona (10 ml). La solución resultante se agitó a reflujo durante 48 horas, se enfrió a temperatura ambiente y se vertió en agua (60 ml). La mezcla acuosa se extrajo con acetato de etilo (3 x 50 ml). Las fracciones orgánicas combinadas se secaron con sulfato de sodio anhidro, se filtraron, luego se condensaron in vacuo para dar el producto protegido con Boc (**71**) (0,60 g, 93 %), que se confirmó

por LCMS (modo de iones positivos). Una porción de este material (100 mg, 0,20 mmol) se recogió en acetato de etilo (20 ml). Se burbujeó gas HCl a través de esta solución durante un minuto. La reacción se agitó entonces a temperatura ambiente durante 30 minutos y se concentró in vacuo. El residuo resultante se purificó por cromatografía instantánea automatizada para proporcionar la amina libre deseada (**72**). El producto fue confirmado por LCMS (modo de iones positivos).

Ejemplo de referencia 19. Síntesis de 1-((4,6-dicloro-1-(2-hidroxi-2-metilpropil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil) piperazin-2-ona (33)

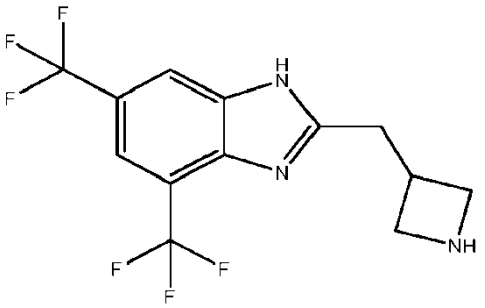
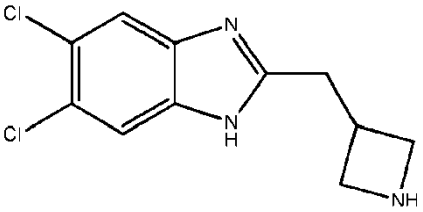
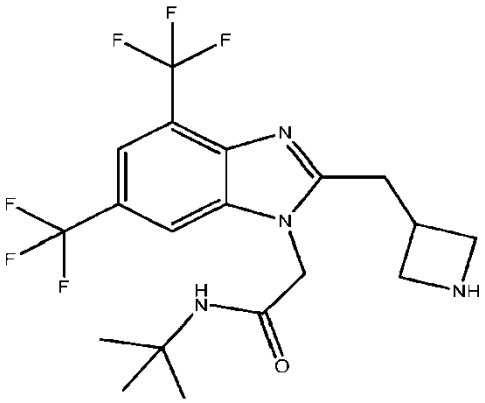
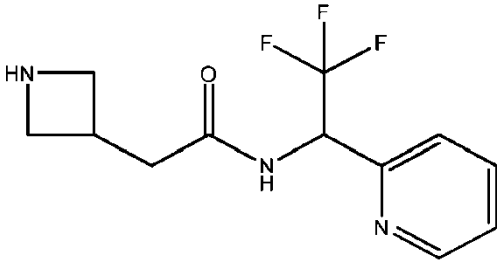
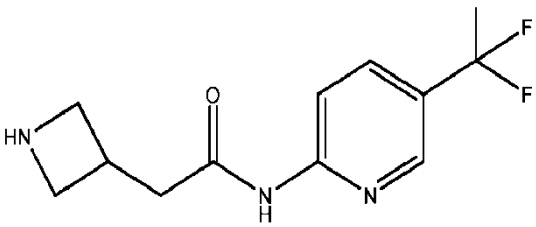


Preparación de 1-((4,6-dicloro-1-(2-hidroxi-2-metilpropil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)piperazin-2-ona (**75**)

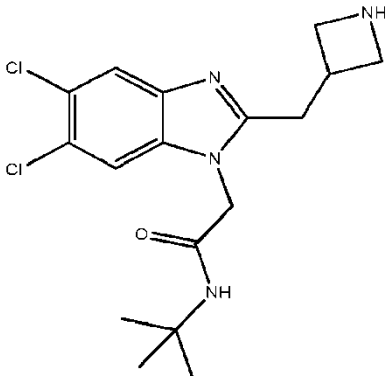
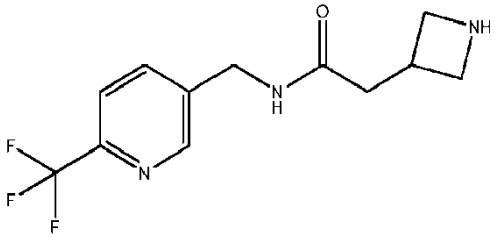
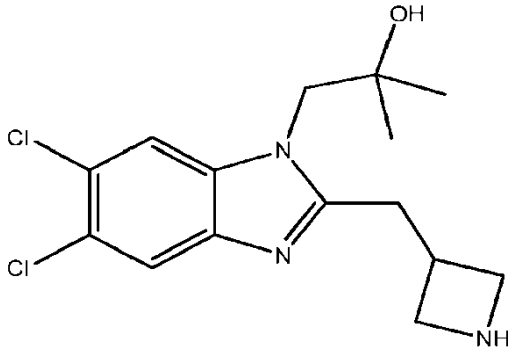
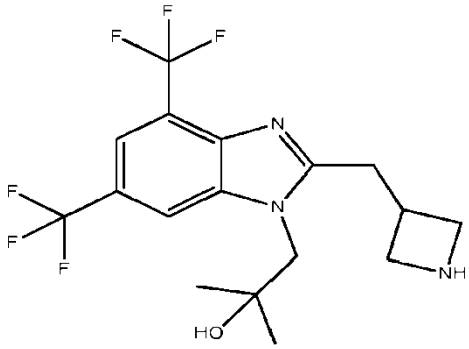
Se recogieron tert-butil-4-((4,6-dicloro-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)-3-oxopiperazina-1-carboxilato (300 mg, 0,75 mmol) (**69**), 2,2-dimetiloxirano (**73**) (0,67 ml, 542 mg, 7,5 mmol) y carbonato de potasio (1,04 g, 7,5 mmol) en acetona (5 ml). La reacción se calentó a 110 º C por irradiación de microondas durante 1 hora. La solución se concentró in vacuo, y el residuo que contenía el producto protegido con Boc (**74**) se recogió en acetato de etilo. Se burbujeó gas HCl a través de esta solución durante 1 minuto. La solución se agitó luego durante 30 minutos a temperatura ambiente y se concentró in vacuo. El residuo resultante se purificó por cromatografía instantánea automatizada para proporcionar la amina libre deseada (**75**). El producto fue confirmado por LCMS (modo de iones positivos).

Siguiendo los procedimientos generales establecidos en los procedimientos sintéticos ejemplares anteriores, se prepararon los siguientes compuestos enumerados en la Tabla 1. La espectrometría de masas se empleó con compuestos finales y en diversas etapas a lo largo de la síntesis como una confirmación de la identidad del producto obtenido (M+1). Para el análisis espectrométrico de masas, se prepararon muestras a una concentración aproximada de 1 µg/ml en acetonitrilo con ácido fórmico al 0,1 %. Las muestras se infundieron manualmente en un espectrómetro de masas triple cuadrupolo API3000 de Applies Biosystems y se escanearon en Q1 en el intervalo de 50 a 700 m/z.

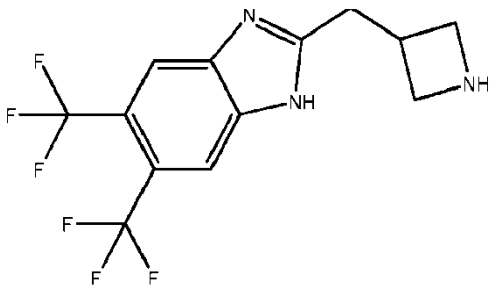
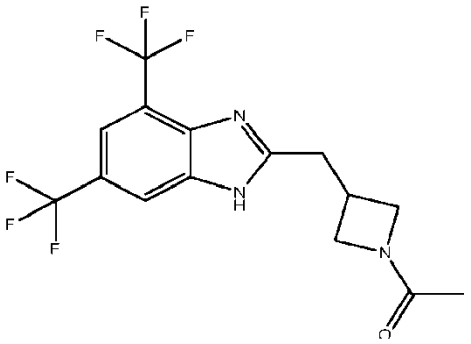
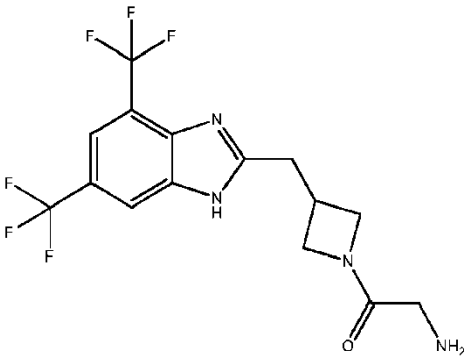
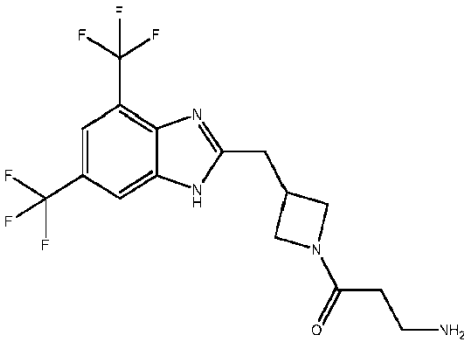
Tabla 1

No.	Estructura	Peso mol.	Nombre químico
1		323,237	2-(azetidin-3-ilmetil)-4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol
2		256,131	2-(azetidin-3-ilmetil)-5,6-dicloro-1H-benzo[d]imidazol
3		436,395	2-(2-(azetidin-3-ilmetil)-4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)-N-(tert-butil) acetamida
4		273,254	2-(azetidin-3-il)-N-(2,2,2-trifluoro-1-(42iridina-2-il)etil)acetamida
5		259,228	2-(azetidin-3-il)-N-(5-(trifluorometil)42iridina-2-il)acetamida

(continuación)

No.	Estructura	Peso mol.	Nombre químico
6		369,289	2-(2-(azetidin-3-ilmetil)-5,6-dicloro-1H-benzo[d]imidazol-1-il)-N-(tert-butil)acetamida
7		273,254	2-(azetidin-3-il)-N-((6-(trifluorometil)43iridina-3-il)metil)acetamida
8		328,237	1-(2-(azetidin-3-ilmetil)-5,6-dicloro-1H-benzo[d]imidazol-1-il)-2-metilpropan-2-ol
9		395,343	1-(2-(azetidin-3-ilmetil)-4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)-2-metilpropan-2-ol

(continuación)

No.	Estructura	Peso mol.	Nombre químico
10		323,237	2-(azetidin-3-ilmetil)-5,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol
11		365,274	1-(3-((4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)azetidin-1-il)etanona
12		380,288	2-amino-1-(3-((4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)azetidin-1-il)etanona
13		394,315	3-amino-1-(3-((4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)azetidin-1-il)propan-1-ona

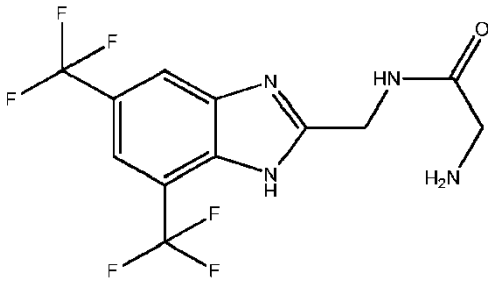
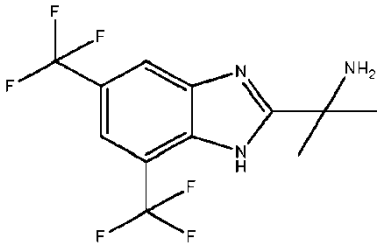
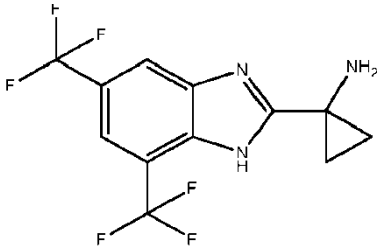
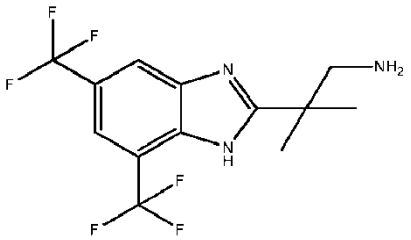
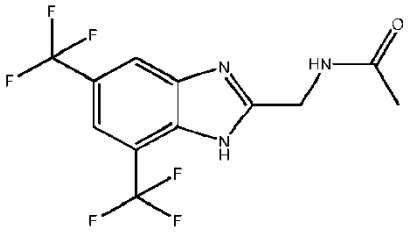
(continuación)

No.	Estructura	Peso mol.	Nombre químico
14		422,368	3-amino-1-(3-((4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)azetidin-1-il)-3-metilbutan-1-ona
15		408,341	4-amino-1-(3-((4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)azetidin-1-il)butan-1-ona
16		326,238	N-(3,5-bis(trifluorometil)bencil)azeti dina-3-carboxamida
17		340,264	(S)-N-(3,5-bis(trifluorometil)bencil)pirr olidina-2-carboxamida
18		340,264	®-N-(3,5-bis(trifluorometil)bencil)pirr olidina-2-carboxamida

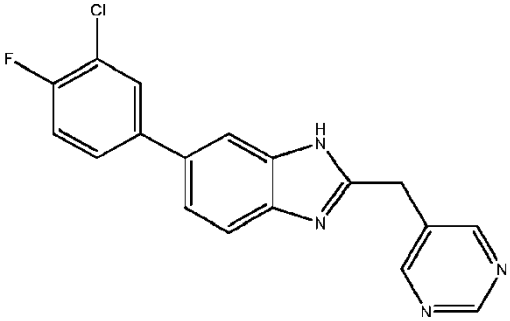
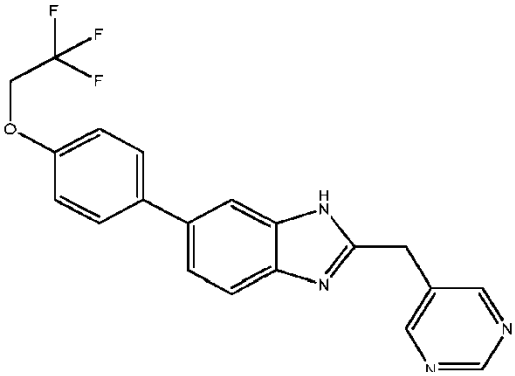
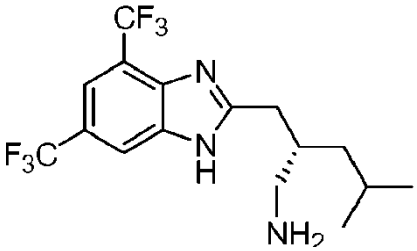
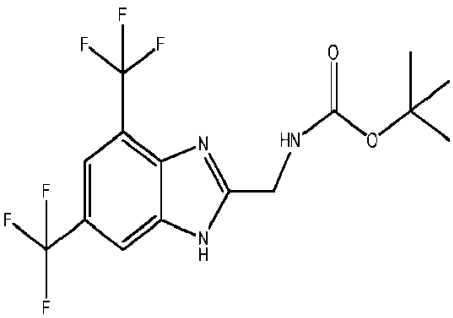
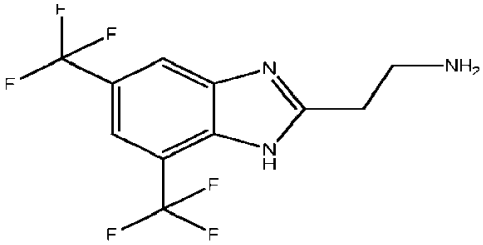
(continuación)

No.	Estructura	Peso mol.	Nombre químico
19		436,395	2-(3-((4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)azetidin-1-il)-N-(tert-butil)acetamida
20		448,405	2-(3-((4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)azetidin-1-il)-N-(1-metilciclobutil)acetamida
21		216,067	(5,6-dicloro-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metanamina
22		273,119	2-amino-N-((5,6-dicloro-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)acetamida
23		283,173	(5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metanamina

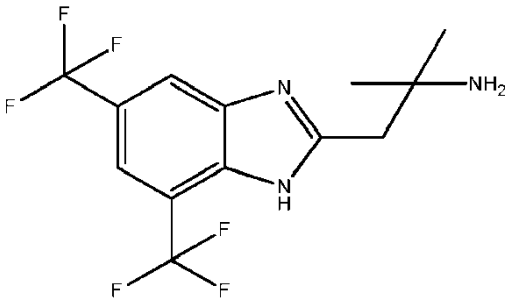
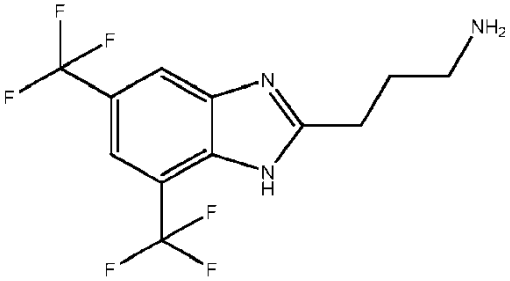
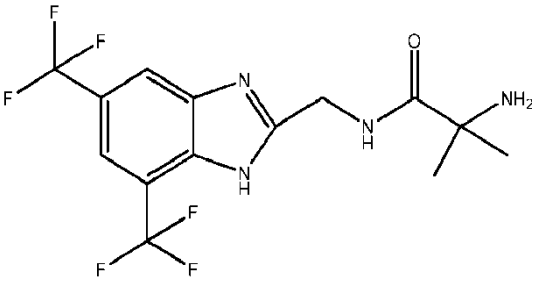
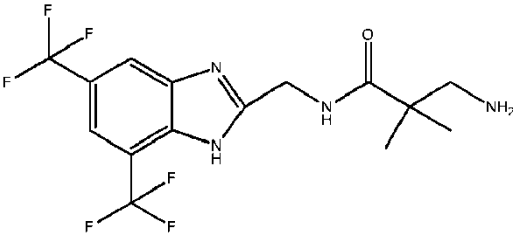
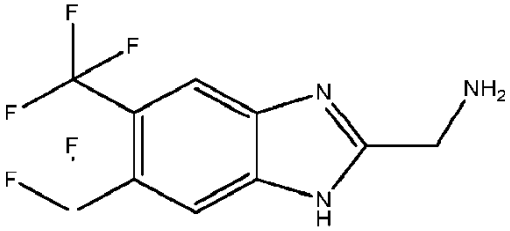
(continuación)

No.	Estructura	Peso mol.	Nombre químico
24		340,224	2-amino-N-((5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)acetamida
25		311,226	2-(5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)propan-2-amina
26		309,21	1-(5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)ciclopropanamina
27		325,253	2-(5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)-2-metilpropan-1-amina
28		325,21	N-((5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)acetamida

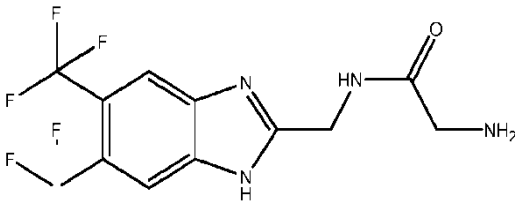
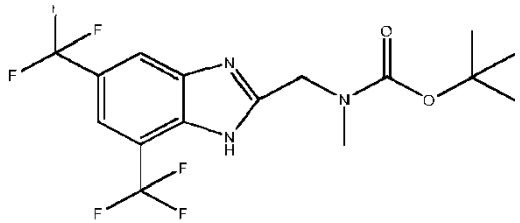
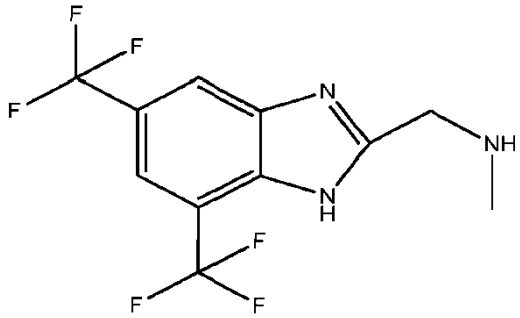
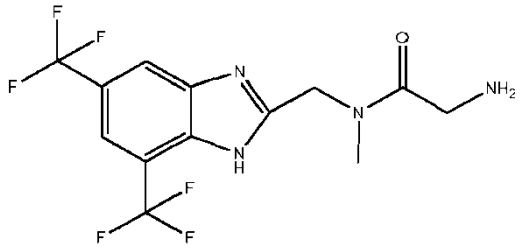
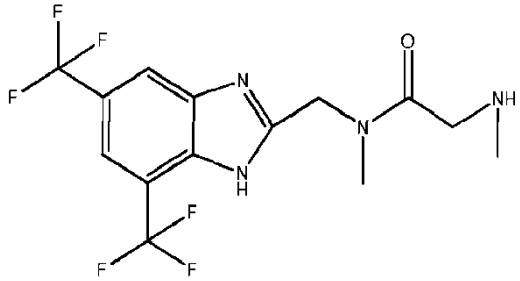
(continuación)

No.	Estructura	Peso mol.	Nombre químico
29		338,766	6-(3-cloro-4-fluorofenil)-2-(pirimidin-5-ilmetil)-1H-benzo[d]imidazol
30		384,355	2-(pirimidin-5-ilmetil)-6-(4-(2,2,2-trifluoroetoxi)fenil)-1H-benzo[d]imidazol
31		367,333	(S)-2-((4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)-4-metilpentan-1-amina
32		383,289	tert-butil ((4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)carbamato
33		297,2	2-(5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)etanamina

(continuación)

No.	Estructura	Peso mol.	Nombre químico
34		325,253	1-(5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)-2-metilpropan-2-amina
35		311,226	3-(5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)propan-1-amina
36		368,278	2-amino-N-((5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)-2-metilpropanamida
37		382,304	3-amino-N-((5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)-2,2-dimetilpropanamida
38		283,173	(5,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metanamina

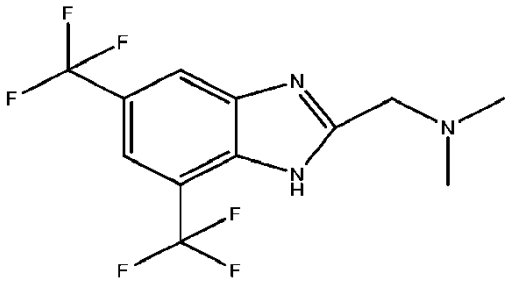
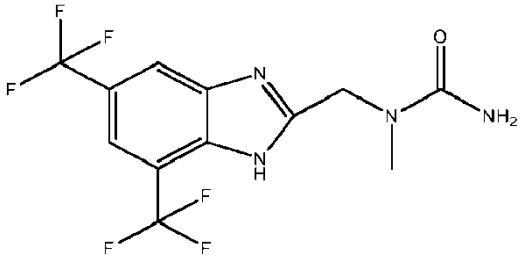
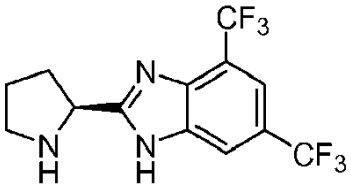
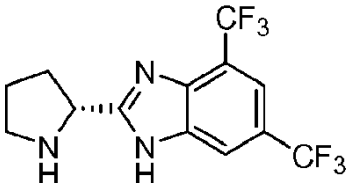
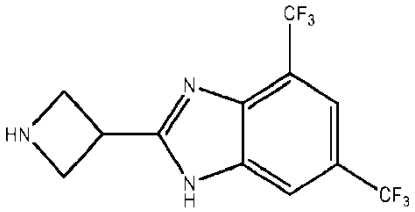
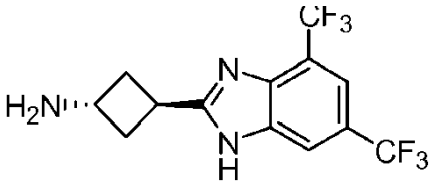
(continuación)

No.	Estructura	Peso mol.	Nombre químico
39		340,224	2-amino-N-((5,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)acetamida
40		397,315	tert-butil ((5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)(metil)carbamato
41		297,2	1-(5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)-N-metilmetanamina
42		354,251	2-amino-N-((5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)-N-metil acetamida
43		368,278	N-((5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)-N-metil-2-(metilamino)acetamida

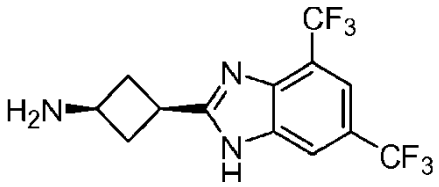
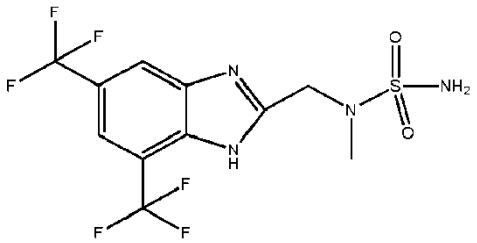
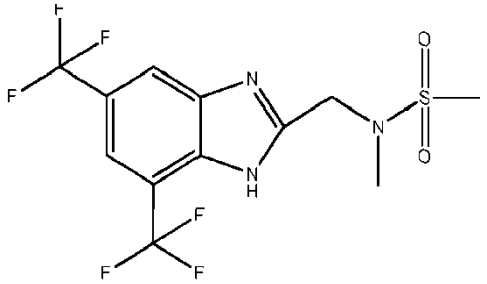
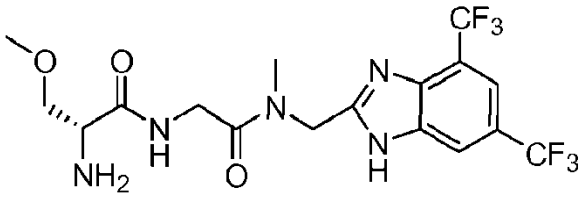
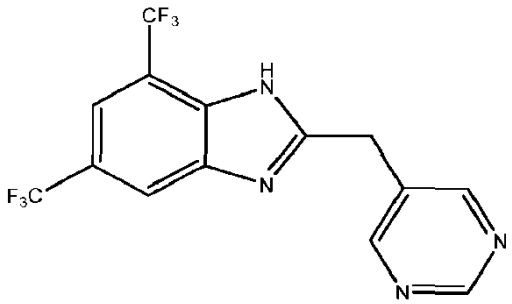
(continuación)

No.	Estructura	Peso mol.	Nombre químico
44		382,304	2-amino-N-((5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)-N,2-dimetilpropanamida
45		325,253	N-((5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)-N-metiletanamina
46		339,236	N-((5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)-N-metilacetamida
47		327,226	(S)-1-(4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)-2-metoxietanamina
48		410,357	N-((5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)-2-(tert-butilamino)-N-metilacetamida

(continuación)

No.	Estructura	Peso mol.	Nombre químico
49		311,226	1-(5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)-N,N-dimetilmetanamina
50		340,224	1-((5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)-1-metilurea
51		323,237	(S)-2-(pirrolidin-2-il)-4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol
52		323,237	(R)-2-(pirrolidin-2-il)-4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol
53		309,21	2-(azetidin-3-il)-4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol
54		323,237	(1r,3r)-3-(4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)ciclobutanamina

(continuación)

No.	Estructura	Peso mol.	Nombre químico
55		323,237	(1s,3s)-3-(4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)ciclobutanamina
56		376,278	N-{[4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzimidazol-2-il]metil}-N- diamida metilsulfúrica
57		375,29	N-((5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)-N-metilmetanosulfonamida
58		455,355	(R)-2-amino-N-(2-(((4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)(metil)amino)-2-oxoetil)-3-metoxipropanamida
59		346,231	2-(pirimidin-5-ilmetil)-5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol

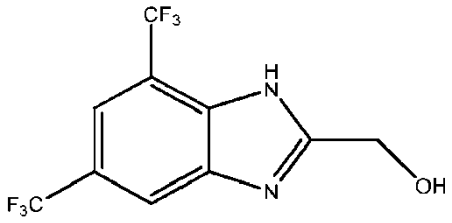
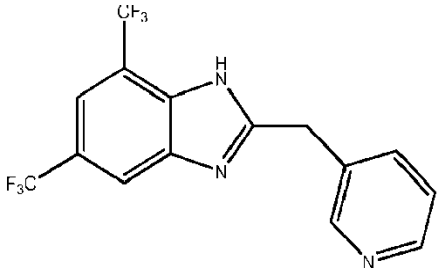
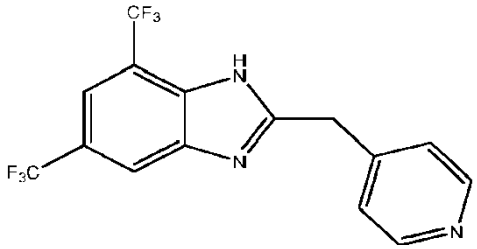
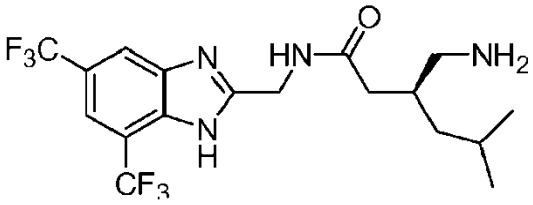
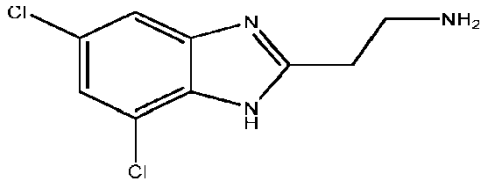
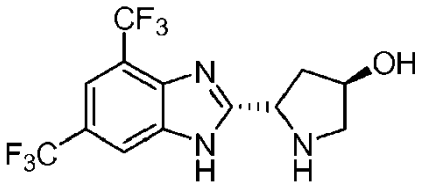
(continuación)

No.	Estructura	Peso mol.	Nombre químico
60		367,29	N-((5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)pivalamida
61		381,316	N-((5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)-3,3-dimetilbutanamida
62		382,304	1-((5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)-3-(tert-butil)urea
63		298,184	2-(metoximetil)-4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol
64		312,211	2-(2-metoxietil)-4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol

(continuación)

No.	Estructura	Peso mol.	Nombre químico
65		336,156	2-(2,2,2-trifluoroetil)-4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol
66		346,249	2-((metilsulfonil)metil)-4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol
67		332,204	2-(pirazin-2-il)-4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol
68		346,231	2-(pirazin-2-ilmetil)-4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol
69		269,147	4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-amina

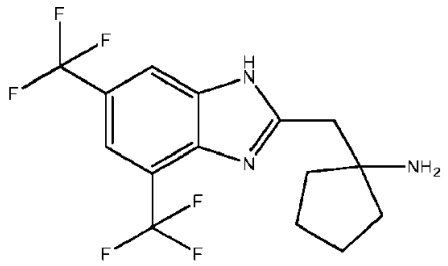
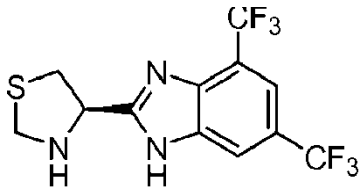
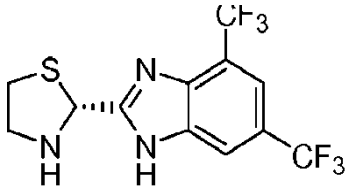
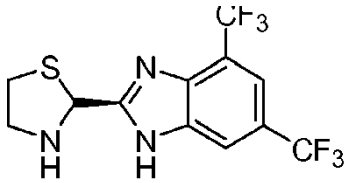
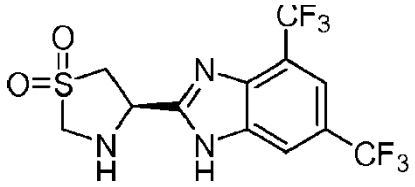
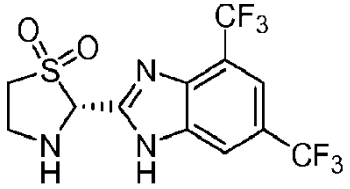
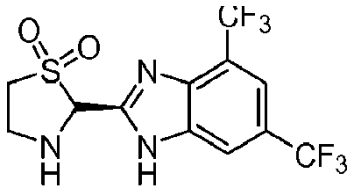
(continuación)

No.	Estructura	Peso mol.	Nombre químico
70		284,158	(5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metanol
71		345,242	2-(piridin-3-ilmetil)-5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol
72		345,242	2-(piridin-4-ilmetil)-5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol
73		424,384	(S)-3-(aminometil)-N-((5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)-5-metilhexanamida
74		230,094	2-(5,7-dicloro-1H-benzo[d]imidazol-2-il)etanamina
75		339,236	(3R,5S)-5-(5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)pirrolidin-3-ol

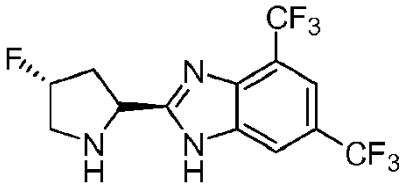
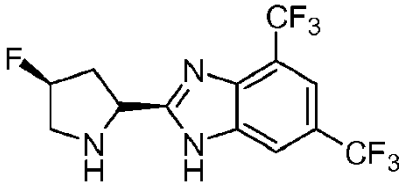
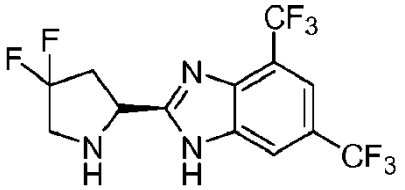
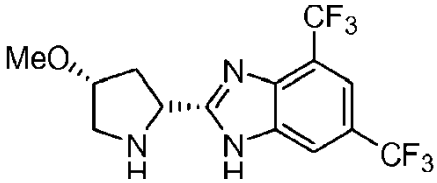
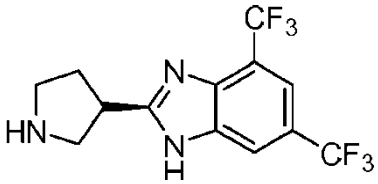
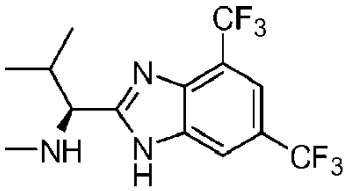
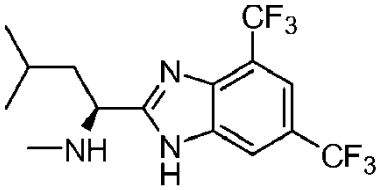
(continuación)

No.	Estructura	Peso mol.	Nombre químico
76		311,226	2-(5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)-N-metiletanamina
77		383,289	(5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil tert-butilcarbamato
78		391,289	(5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil dimetilsulfamato
79		321,297	(5-(4-(2,2,2-trifluoroetoxi)fenil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metanamina
80		275,709	(5-(3-cloro-4-fluorofenil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metanamina
81		361,263	N-((4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)metanosulfonamida

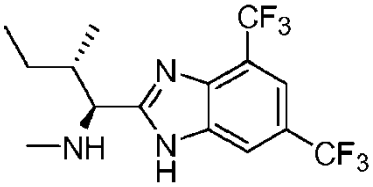
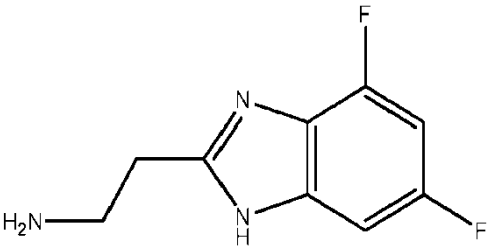
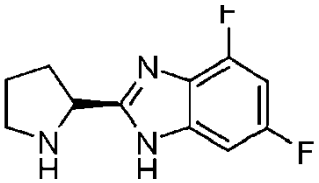
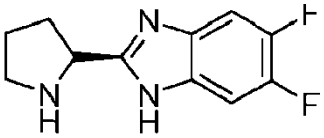
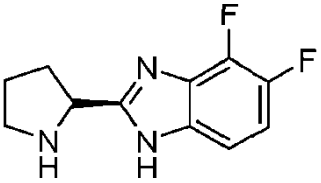
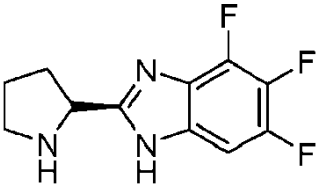
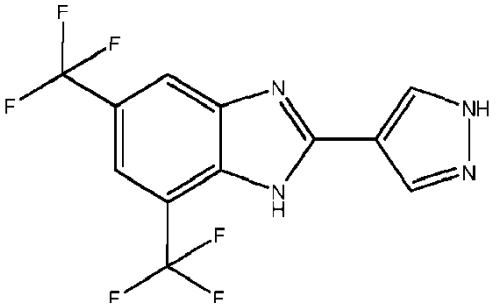
(continuación)

No.	Estructura	Peso mol.	Nombre químico
82		351,29	1-((4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)ciclopentanamina
83		341,275	(R)-4-(4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)tiazolidina
84		341,275	(R)-2-(4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)tiazolidina
85		341,275	(S)-2-(4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)tiazolidina
86		373,274	(R)-4-(4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)tiazolidina 1,1-dioxido
87		373,274	(R)-2-(4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)tiazolidine 1,1-dioxido
88		373,274	(S)-2-(4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)tiazolidina 1,1-dioxido

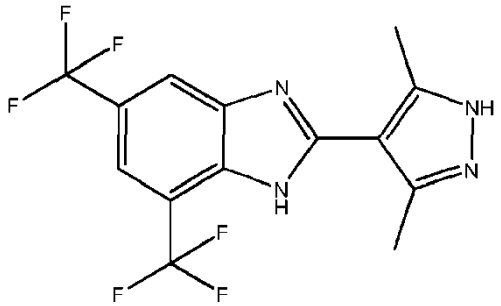
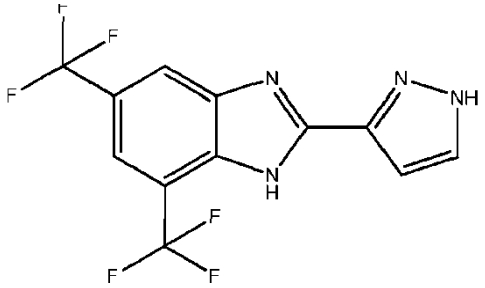
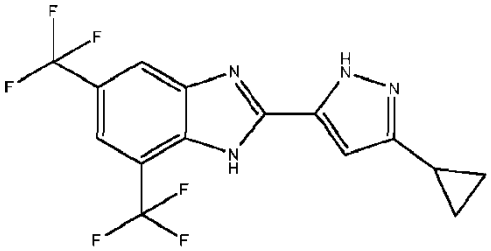
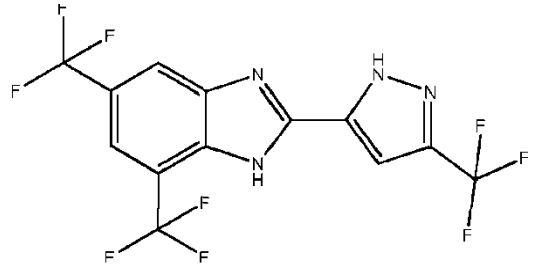
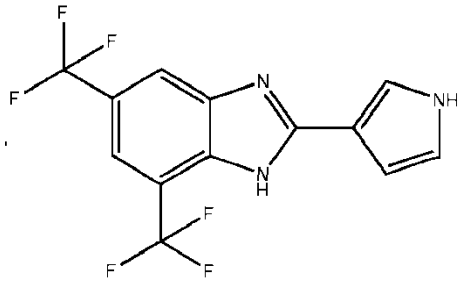
(continuación)

No.	Estructura	Peso mol.	Nombre químico
89		341,227	2-((2S,4R)-4-fluoropirrolidin-2-il)-4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol
90		341,227	2-((2S,4S)-4-fluoropirrolidin-2-il)-4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol
91		359,218	(S)-2-(4,4-difluoropirrolidin-2-il)-4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol
92		353,263	2-((2R,4R)-4-metoxipirrolidin-2-il)-4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol
93		323,237	(R)-2-(pirrolidin-3-il)-4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol
94		339,279	(S)-1-(4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)-N,2-dimetilpropan-1-amina
95		353,306	(S)-1-(4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)-N,3-dimetilbutan-1-amina

(continuación)

No.	Estructura	Peso mol.	Nombre químico
96		353,306	(1S,2S)-1-(4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)-N,2-dimetilbutan-1-amina
97		197,185	2-(4,6-difluoro-1H-benzo[d]imidazol-2-il)etanamina
98		223,222	(S)-4,6-difluoro-2-(pirrolidin-2-il)-1H-benzo[d]imidazol
99		223,222	(S)-5,6-difluoro-2-(pirrolidin-2-il)-1H-benzo[d]imidazol
100		223,222	(S)-4,5-difluoro-2-(pirrolidin-2-il)-1H-benzo[d]imidazol
101		241,212	(S)-4,5,6-trifluoro-2-(pirrolidin-2-il)-1H-benzo[d]imidazol
102		320,19	2-(1H-pirazol-4-il)-5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol

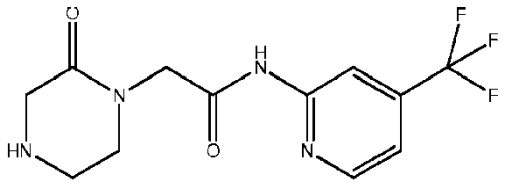
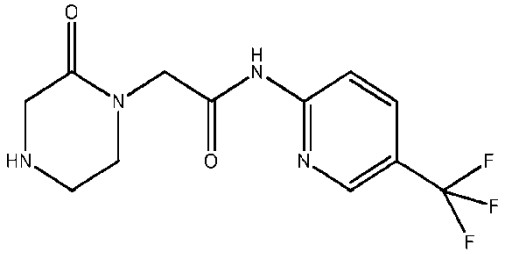
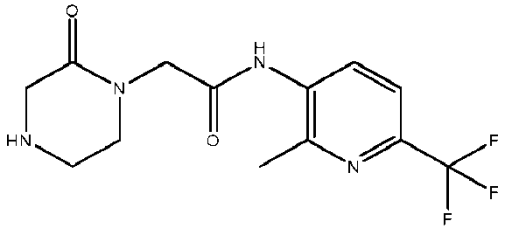
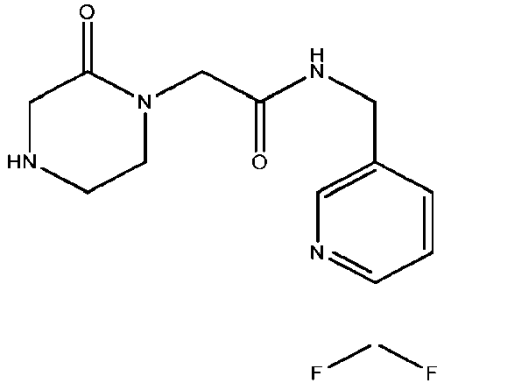
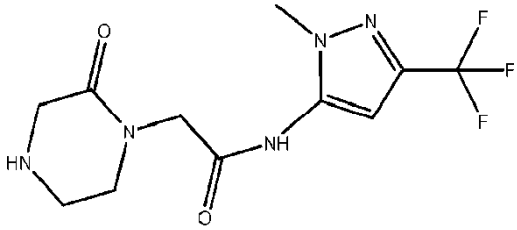
(continuación)

No.	Estructura	Peso mol.	Nombre químico
103		348,25	2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-4-il)-5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol
104		320,19	2-(1H-pirazol-3-il)-5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol
105		360,26	2-(3-ciclopropil-1H-pirazol-5-il)-5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol
106		388,19	5,7-bis(trifluorometil)-2-(3-(trifluorometil)-1H-pirazol-5-il)-1H-benzo[d]imidazol
107		319,21	2-(1H-pirrol-3-il)-5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol

(continuación)

No.	Estructura	Peso mol.	Nombre químico
108		299,156	1-((5,6-dicloro-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)piperazin-2-ona
109		298,264	1-((5-(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)piperazin-2-ona
110		366,262	1-((5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)piperazin-2-ona
111		394,315	1-((4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)-3,3-dimetilpiperazin-2-ona
112		299,156	1-((4,6-dicloro-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)piperazin-2-ona

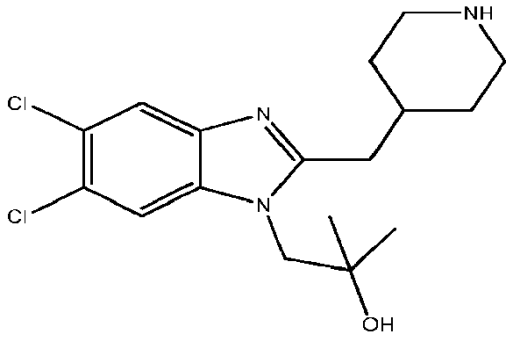
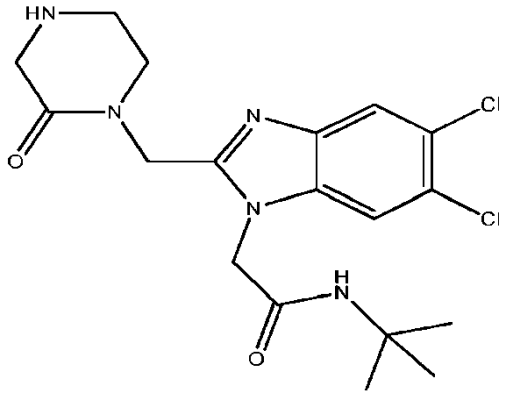
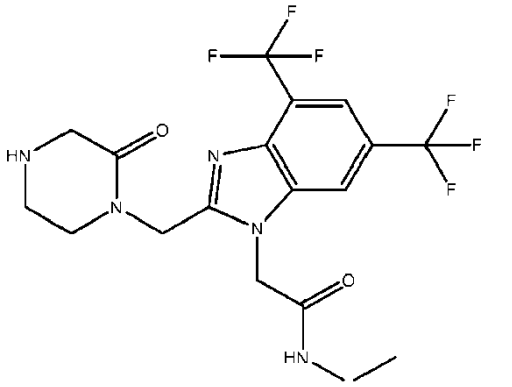
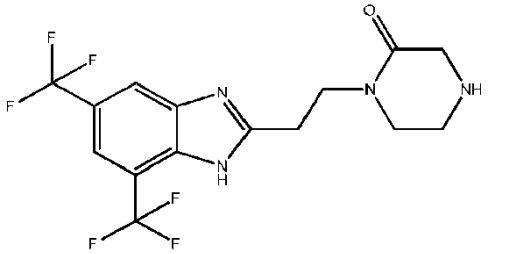
(continuación)

No.	Estructura	Peso mol.	Nombre químico
113		302,252	2-(2-oxopiperazin-1-il)-N-(4-(trifluorometil)57iridina-2-il)acetamida
114		302,252	2-(2-oxopiperazin-1-il)-N-(5-(trifluorometil)57iridina-2-il)acetamida
115		316,279	N-(2-metil-6-(trifluorometil)57iridina-3-il)-2-(2-oxopiperazin-1-il)acetamida
116		316,279	2-(2-oxopiperazin-1-il)-N-((6-(trifluorometil)57iridina-3-il)metil)acetamida
117		305,256	N-(1-metil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-5-il)-2-(2-oxopiperazin-1-il)acetamida

(continuación)

No.	Estructura	Peso mol.	Nombre químico
118		287,281	2-(piperidin-4-il)-N-(5-(trifluorometil)57iridina-2-il)acetamida
119		299,156	4-((5,6-dicloro-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)piperazin-2-ona
120		300,141	4-((5,6-dicloro-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)morfolin-3-ona
121		313,182	1-(2-(5,6-dicloro-1H-benzo[d]imidazol-2-il)etil)piperazin-2-ona
122		397,342	N-(tert-butil)-2-(5,6-dicloro-2-(piperidin-4-ilmetil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)acetamida

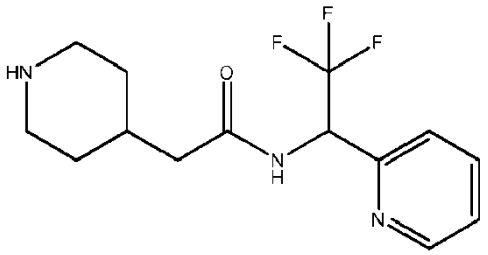
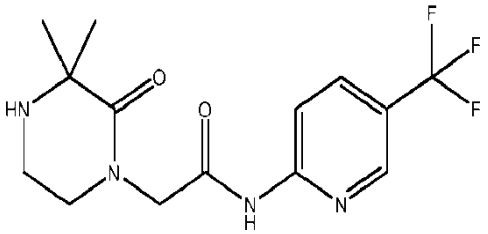
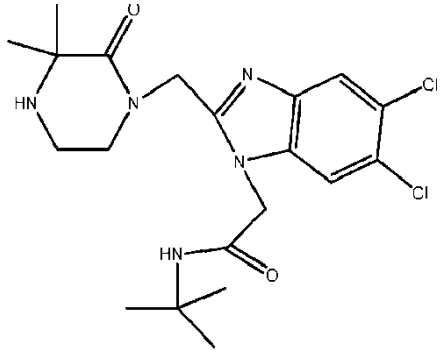
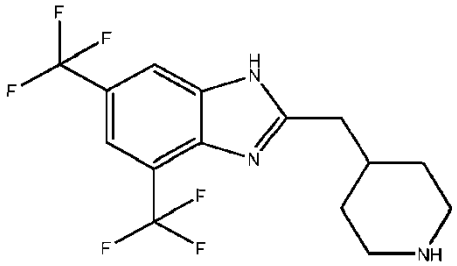
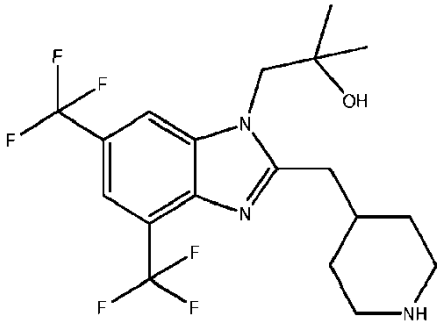
(continuación)

No.	Estructura	Peso mol.	Nombre químico
123		356,29	1-(5,6-dicloro-2-(piperidin-4-ilmetil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)-2-metilpropan-2-ol
124		412,314	N-(tert-butil)-2-(5,6-dicloro-2-((2-oxopiperazin-1-il)metil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)acetamida
125		479,419	N-(tert-butil)-2-(2-((2-oxopiperazin-1-il)metil)-4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)acetamida
126		380,288	1-(2-(5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)etil)piperazin-2-ona

(continuación)

No.	Estructura	Peso mol.	Nombre químico
127		367,246	4-((5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)morfolin-3-ona
128		367,246	4-((5,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)morfolin-3-ona
129		438,367	1-((1-(2-hidroxi-2-metilpropil)-4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)piperazin-2-ona
130		344,332	2-(3,3-dimetil-2-oxopiperazin-1-il)-N-(2,2,2-trifluoro-1-(59iridina-2-il)etil)acetamida
131		316,279	2-(2-oxopiperazin-1-il)-N-(2,2,2-trifluoro-1-(59iridina-2-il)etil)acetamida

(continuación)

No.	Estructura	Peso mol.	Nombre químico
132		301,307	2-(piperidin-4-il)-N-(2,2,2-trifluoro-1-(59iridina-2-il)etil)acetamida
133		330,306	2-(3,3-dimetil-2-oxopiperazin-1-il)-N-(5-(trifluorometil)59iridina-2-il)acetamida
134		440,367	N-(tert-butil)-2-(5,6-dicloro-2-((3,3-dimetil-2-oxopiperazin-1-il)metil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)acetamida
135		351,29	2-(piperidin-4-ilmetil)-4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol
136		423,396	2-metil-1-(2-(piperidin-4-ilmetil)-4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)propan-2-ol

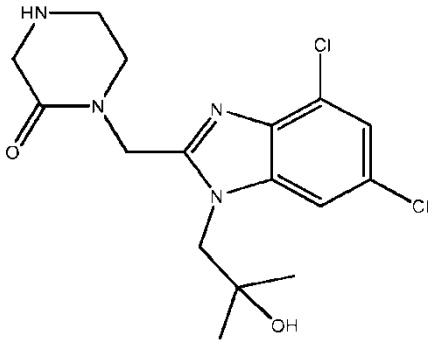
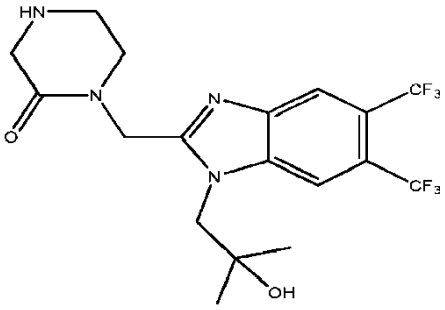
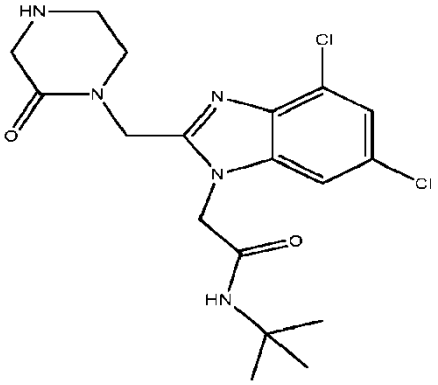
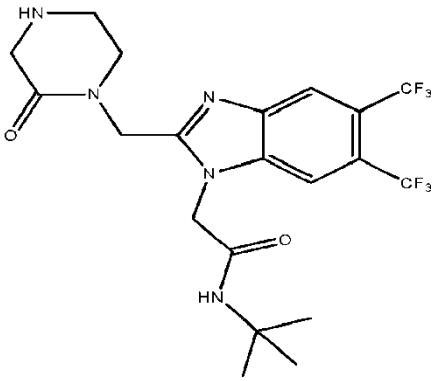
(continuación)

No.	Estructura	Peso mol.	Nombre químico
137		464,448	N-(tert-butil)-2-(2-(piperidin-4-ilmetil)-4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)acetamida
138		507,472	N-(tert-butil)-2-(2-((3,3-dimetil-2-oxopiperazin-1-il)metil)-4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)acetamida
139		466,421	1-((1-(2-hidroxi-2-metilpropil)-4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)-3,3-dimetilpiperazin-2-ona
140		301,307	2-(piperidin-4-il)-N-((6-(trifluorometil)61iridina-3-il)metil)acetamida

(continuación)

No.	Estructura	Peso mol.	Nombre químico
141		344,332	2-(3,3-dimetil-2-oxopiperazin-1-il)-N-((6-(trifluorometil)61iridina-3-il)metil)acetamida
142		351,29	2-(piperidin-4-ilmetil)-5,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol
143		399,315	1-((5,6-dicloro-1-(2-hidroxi-2-metilpropil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)-3,3-dimetilpiperazin-2-ona
144		371,262	1-((5,6-dicloro-1-(2-hidroxi-2-metilpropil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)piperazin-2-ona

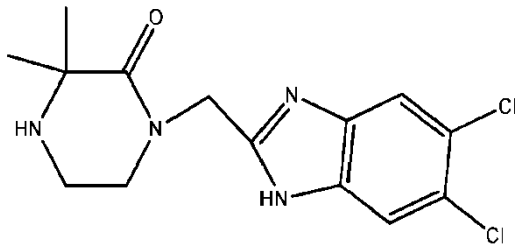
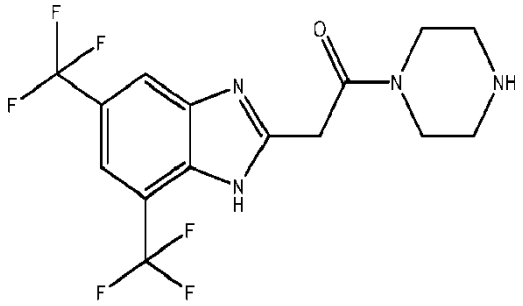
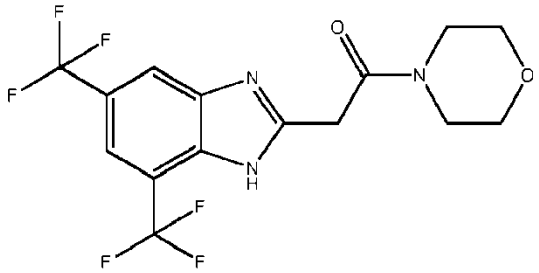
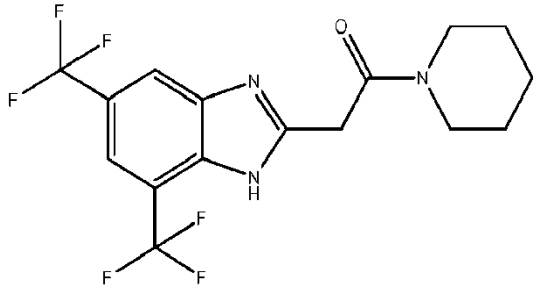
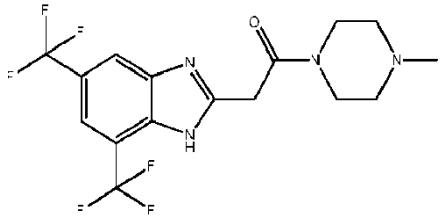
(continuación)

No.	Estructura	Peso mol.	Nombre químico
145		371,262	1-((4,6-dicloro-1-(2-hidroxi-2-metilpropil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)piperazin-2-ona
146		438,367	1-((1-(2-hidroxi-2-metilpropil)-5,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)piperazin-2-ona
147		412,314	N-(tert-butil)-2-(4,6-dicloro-2-((2-oxopiperazin-1-il)metil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)acetamida
148		479,419	N-(tert-butil)-2-(2-((2-oxopiperazin-1-il)metil)-5,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)acetamida

(continuación)

No.	Estructura	Peso mol.	Nombre químico
149		366,262	1-((5,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)piperazin-2-ona
150		394,315	1-((5,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)-3,3-dimetilpiperazin-2-ona
151		466,421	1-((1-(2-hidroxi-2-metilpropil)-5,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)-3,3-dimetilpiperazin-2-ona
152		507,472	N-(tert-butil)-2-(2-((3,3-dimetil-2-oxopiperazin-1-il)metil)-5,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)acetamida
153		366,262	4-((5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)piperazin-2-ona

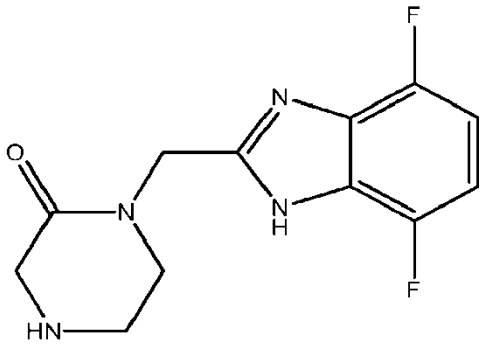
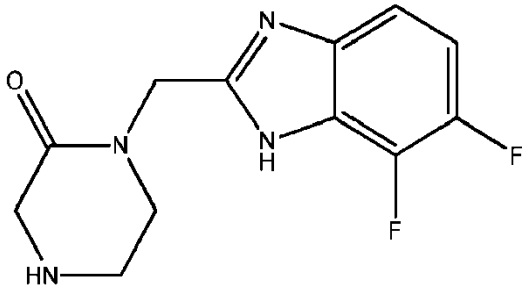
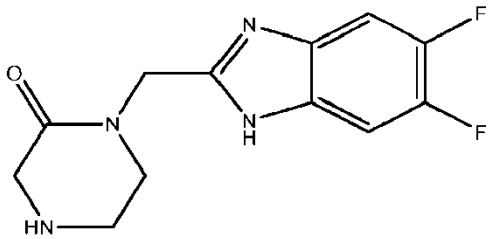
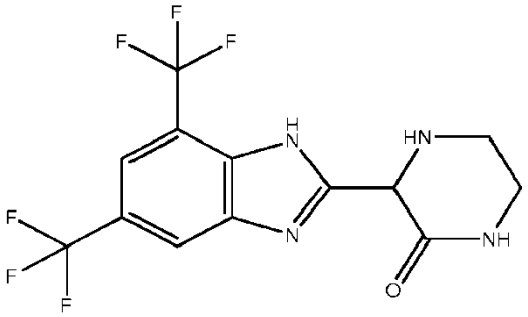
(continuación)

No.	Estructura	Peso mol.	Nombre químico
154		327,209	1-((5,6-dicloro-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)-3,3-dimetilpiperazin-2-ona
155		380,288	2-(5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[-(piperazin-1-il)etanona
156		381,273	2-(5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)-1-morfolinoetanona
157		379,3	2-(5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[-(piperidin-1-il)etanona
158		394,315	2-(5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)-1-(4-metilpiperazin-1-il)etanona

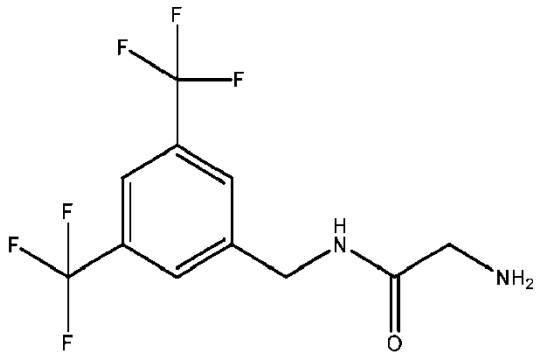
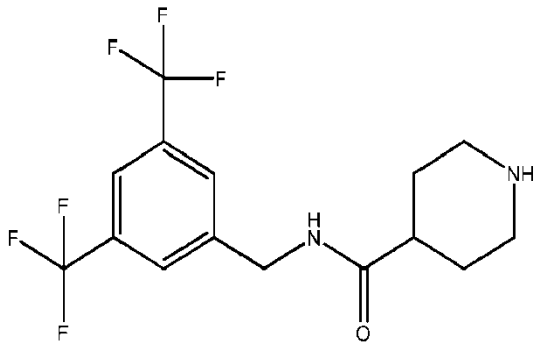
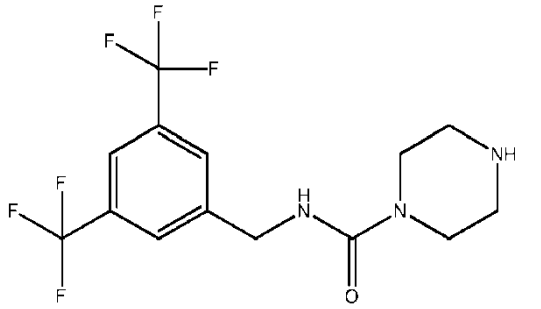
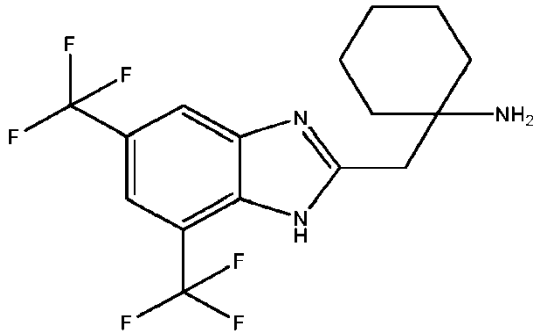
(continuación)

No.	Estructura	Peso mol.	Nombre químico
159		369,262	N-(3,5-bis(trifluorometil)bencil)-2-oxopiperazina-1-carboxamida
160		302,228	1-((4,5,6,7-tetrafluoro-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)piperazin-2-ona
161		284,237	1-((5,6,7-trifluoro-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)piperazin-2-ona
162		284,237	1-((4,5,7-trifluoro-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)piperazin-2-ona
163		266,247	1-((5,7-difluoro-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)piperazin-2-ona

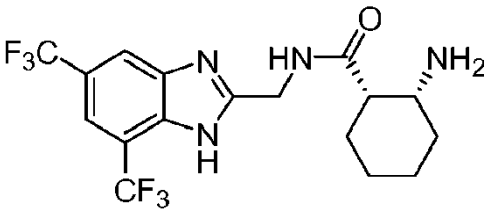
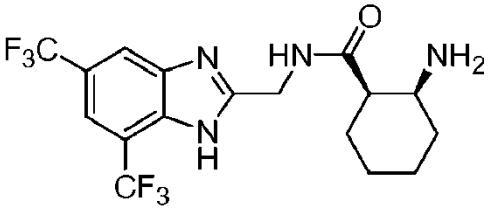
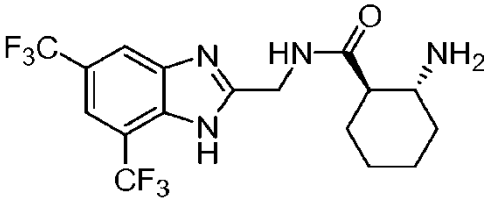
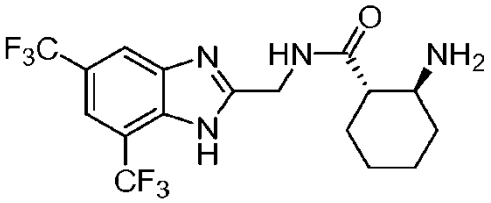
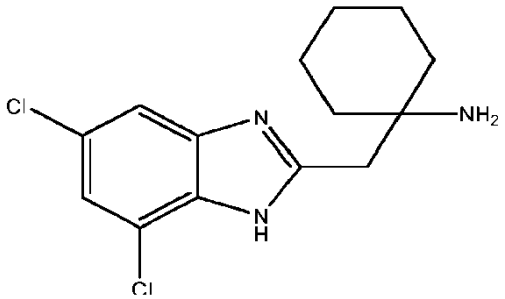
(continuación)

No.	Estructura	Peso mol.	Nombre químico
164		266,247	1-((4,7-difluoro-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)piperazin-2-ona
165		266,247	1-((6,7-difluoro-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)piperazin-2-ona
166		266,247	1-((5,6-difluoro-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)piperazin-2-ona
167		352,235	3-(5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)piperazin-2-ona

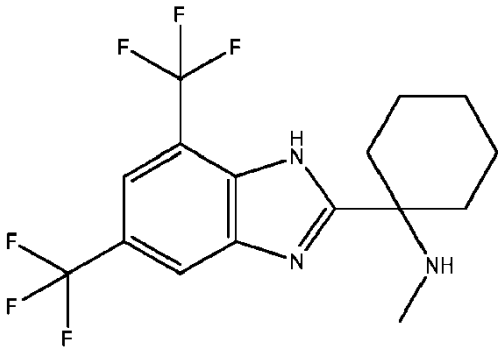
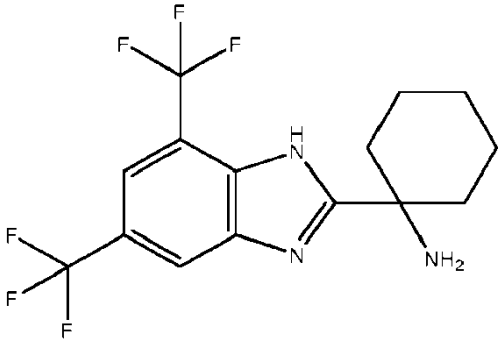
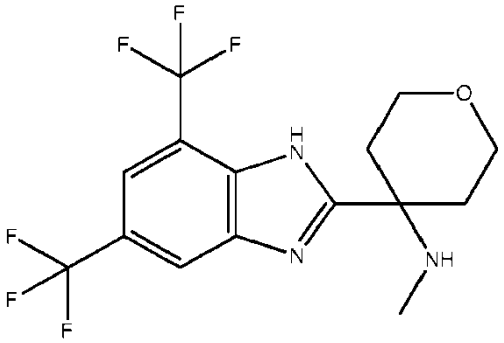
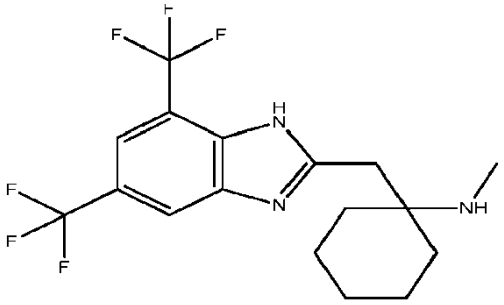
(continuación)

No.	Estructura	Peso mol.	Nombre químico
168		300,2	2-amino-N-(3,5-bis(trifluorometil)bencil)aceta mida
169		354,291	N-(3,5-bis(trifluorometil)bencil)piper idina-4-carboxamida
170		355,279	N-(3,5-bis(trifluorometil)bencil)piper azina-1-carboxamida
171		365,317	1-((5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)ciclohexanoamina

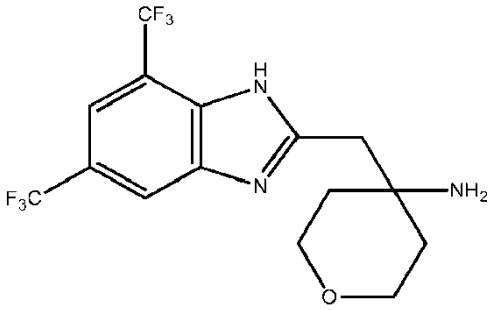
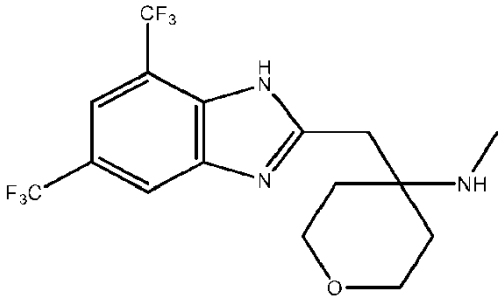
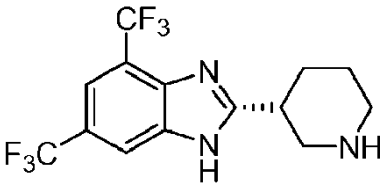
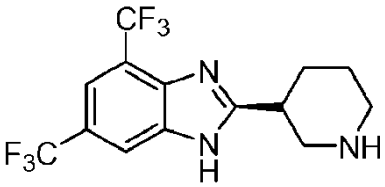
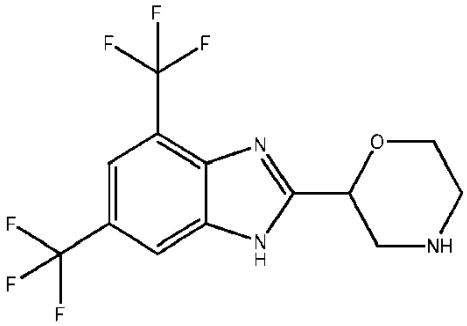
(continuación)

No.	Estructura	Peso mol.	Nombre químico
172		408,341	(1S,2R)-2-amino-N-((5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)ciclohexanocarboxa mida
173		408,341	(1R,2S)-2-amino-N-((5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)ciclohexanocarboxa mida
174		408,341	(1R,2R)-2-amino-N-((5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)ciclohexanocarboxa mida
175		408,341	(1S,2S)-2-amino-N-((5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)ciclohexanocarboxa mida
176		298,211	1-((5,7-dicloro-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)ciclohexanoamina

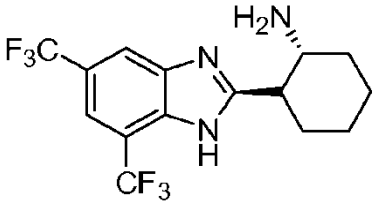
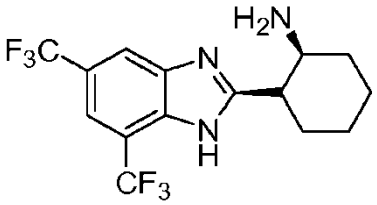
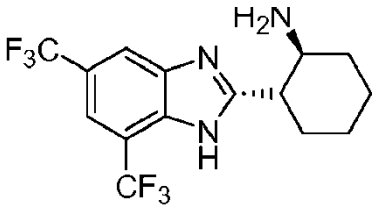
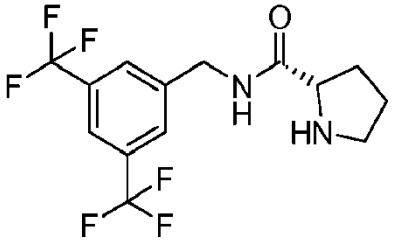
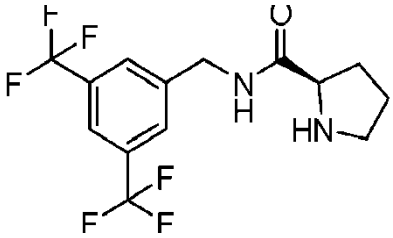
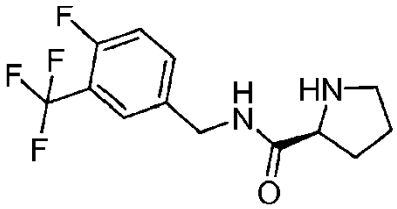
(continuación)

No.	Estructura	Peso mol.	Nombre químico
177		365,317	1-(5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)-N-metilciclohexanoamina
178		351,29	1-(5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)ciclohexanoamina
179		367,29	4-(5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)-N-metiltetrahidro-2H-piran-4-amina
180		379,343	1-((5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)-N-metilciclohexanoamina

(continuación)

No.	Estructura	Peso mol.	Nombre químico
181		367,29	4-((5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)tetrahidro-2H-piran-4-amina
182		381,316	4-((5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)-N-metiltetrahidro-2H-piran-4-amina
183		337,264	(R)-2-(piperidin-3-il)-4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol
184		337,264	(S)-2-(piperidin-3-il)-4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol
185		339,236	2-(4,6-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)morfolina

(continuación)

No.	Estructura	Peso mol.	Nombre químico
186		351,29	(1R,2R)-2-(5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)ciclohexanoamina
187		351,29	(1S,2R)-2-(5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)ciclohexanoamina
188		351,29	(1S,2S)-2-(5,7-bis(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)ciclohexanoamina
189		340,264	(S)-N-(3,5-bis(trifluorometil)bencil)pirrolidina-2-carboxamida
190		340,264	(R)-N-(3,5-bis(trifluorometil)bencil)pirrolidina-2-carboxamida
191		290,257	(S)-N-(4-fluoro-3-(trifluorometil) bencil)pirrolidina-2-carboxamida

(continuación)

No.	Estructura	Peso mol.	Nombre químico
192		256,704	(S)-N-(3-cloro-4-fluorobencil)pirrolidina-2-carboxamida
193		333,281	N-(4-fluoro-3-(trifluorometil) bencil)- 2-(2-oxopiperazin-1-il)acetamida
194		340,264	(R)-N-(pirrolidin-2-ilmetil)-3,5-bis(trifluorometil)benzamida
195		340,264	(S)-N-(pirrolidin-2-ilmetil)-3,5-bis(trifluorometil)benzamida
196		356,307	(S)-2-amino-N-(3,5-bis(trifluorometil)bencil)-4-metilpentanamida
197		370,333	(S)-N-(3,5-bis(trifluorometil)bencil)-4-metil-2-(metilamino)pentanamida

(continuación)

No.	Estructura	Peso mol.	Nombre químico
198		383,289	N-(3,5-bis(trifluorometil)bencil)-2-(2-oxopiperazin-1-il)acetamida
199		382,344	2-(1-aminociclohexil)-N-(3,5-bis(trifluorometil)bencil)aceta mida
200		416,36	(2R,5S)-N-(3,5-bis(trifluorometil)bencil)-5-fenilpirrolidina-2-carboxamida
201		314,227	3-amino-N-(3,5-bis(trifluorometil)bencil)prop anamida
202		328,253	N-(3,5-bis(trifluorometil)bencil)-3-(metilamino)propanamida

(continuación)

No.	Estructura	Peso mol.	Nombre químico
203		416,36	(2S,4R)-N-(3,5-bis(trifluorometil)bencil)-4-fenilpirrolidina-2-carboxamida
204		416,36	(2S,4S)-N-(3,5-bis(trifluorometil)bencil)-4-fenilpirrolidina-2-carboxamida
205		358,255	(2S,4S)-N-(3,5-bis(trifluorometil)bencil)-4-fluoropirrolidina-2-carboxamida
206		376,245	(S)-N-(3,5-bis(trifluorometil)bencil)-4,4-difluoropirrolidina-2-carboxamida
207		368,317	(R)-N-(2-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)propan-2-il)pirrolidina-2-carboxamida

(continuación)

No.	Estructura	Peso mol.	Nombre químico
208		368,317	(S)-N-(2-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)propan-2-il)pirrolidina-2-carboxamida
209		447,396	(S)-N-(2-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)propan-2-il)-1-sulfamoilpirrolidina-2-carboxamida
210		354,291	(R)-N-(3,5-bis(trifluorometil)bencil)-1-metilpirrolidina-2-carboxamida
211		354,291	(S)-N-(3,5-bis(trifluorometil)bencil)-1-metilpirrolidina-2-carboxamida
212		382,344	(S)-N-(2-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)propan-2-il)piperidina-2-carboxamida
213		384,317	(R)-N-(2-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)propan-2-il)morfolina-3-carboxamida

(continuación)

No.	Estructura	Peso mol.	Nombre químico
214		384,317	(S)-N-(2-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)propan-2-il)morfolina-3-carboxamida
215		433,272	N-(2-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)propan-2-il)-3-(trifluorometil)-1H-pyrazole-5-carboxamide
216		396,37	(1S,2R)-2-amino-N-(2-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)propan-2-il)ciclohexanocarboxamida
217		396,37	(1S,2S)-2-amino-N-(2-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)propan-2-il)ciclohexanocarboxamida
218		396,37	(1S,2S)-2-amino-N-(2-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)propan-2-il)ciclohexanocarboxamida
219		396,37	(S)-N-(1-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)ciclopropil)-4-metil-2-(metilamino)pentanamida

(continuación)

No.	Estructura	Peso mol.	Nombre químico
220		366,301	(S)-N-(1-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)ciclopropil)pirrolidina-2-carboxamida
221		366,301	(R)-N-(1-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)ciclopropil)pirrolidina-2-carboxamida
222		384,292	(2R,4R)-N-(1-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)ciclopropil)-4-fluoropirrolidina-2-carboxamida
223		384,292	(2R,4S)-N-(1-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)ciclopropil)-4-fluoropirrolidina-2-carboxamida
224		300,2	2-amino-3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)propanamida

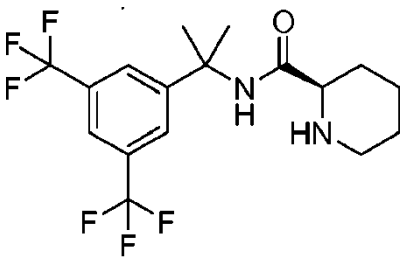
(continuación)

No.	Estructura	Peso mol.	Nombre químico
225		431,256	N-(1-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)ciclopropil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-5-carboxamida
226		370,333	(R)-2-amino-N-(2-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)propan-2-il)-3-metilbutanamida
227		384,36	(R)-2-amino-N-(2-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)propan-2-il)-4-metilpentanamida
228		386,333	(2R,3S)-2-amino-N-(2-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)propan-2-il)-3-metoxibutanamida
229		398,386	(R)-N-(2-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)propan-2-il)-4-metil-2-(metilamino)pentanamida
230		426,44	(R)-N-(2-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)propan-2-il)-2-(isopropilamino)-4-metilpentanamida

(continuación)

No.	Estructura	Peso mol.	Nombre químico
231		427,341	(R)-2-amino-N-(2-((1-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)cicl opropil)amino)-2-oxoetil)-3-metoxipropanamida
232		429,357	(R)-2-amino-N-(2-((2-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)propan-2-il)amino)-2-oxoetil)-3-metoxipropanamida
233		370,333	(R)-N-(3,5-bis(trifluorometil)bencil)-4-metil-2-(metilamino)pentanamida
234		396,37	(R)-N-(1-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)cicl opropil)-4-metil-2-(metilamino)pentanamida
235		356,307	(R)-N-(3,5-bis(trifluorometil)bencil)-3-metil-2-(metilamino)butanamida

(continuación)

No.	Estructura	Peso mol.	Nombre químico
236		382,348	(R)-N-(2-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)propan-2-il)piperidina-2-carboxamida

Ejemplo 20. Estudios de canales iónicos

La generación de una línea celular HEK 293F que expresa establemente $Na_v1,7$ humano se logró mediante la cotransfección de ADNc SCN9A humano y SCN1B humano, subclonado en vectores plasmídicos y utilizando técnicas de transfección estándar. Los clones se seleccionaron usando agentes de selección apropiados (0,3 mg/ml de Zeocin y 0,8 mg/ml de Geneticina) y se mantuvieron en medio Eagle modificado de Dulbecco, suero bovino fetal al 10 %, aminoácidos no esenciales al 1 % a confluencia de ~80 % a 37 ºC en una incubadora humidificada con 95 % de atmósfera y CO_2 al 5 %.

El día de cada experimento, las células que crecieron hasta 80 % de confluencia en un matraz T75 se cosecharon para usar en PatchXpress (Molecular Devices, CA, Estados Unidos). Después de un período de recuperación a 37 ºC en una incubadora humidificada con 95 % de atmósfera y 5 % de CO_2 en medio Eagle modificado de Dulbecco, el medio se reemplazó con una solución de grabación externa que contenía (en mM): 90 de TEACl, 50 de NaCl, 1,8 de $CaCl_2$, 1 de $MgCl_2$, 10 de HEPES, 10 de glucosa, ajustado a pH 7,4 con TEAOH y 300 de mOsm con sacarosa. La solución de grabación interna contenía (en mM): 129 de CsF, 2 de $MgCl_2$, 11 de EGTA, 10 de HEPES, 6 de NaCl, 3 de Na_2ATP ajustados a pH 7,2 con CsOH y 280 de mOsm con sacarosa. La instalación automatizada de manejo de líquidos de PatchXpress dispensa células y compuesto agregado.

La modulación de los canales Na_v 1,7 por los compuestos se evaluó promoviendo los canales al estado inactivo utilizando un pulso de voltaje de acondicionamiento de amplitud variable, seguido de un breve pulso hiperpolarizante con una etapa de voltaje despolarizado posterior para medir la amplitud de corriente en presencia y ausencia de compuesto. Se proporcionan datos ejemplares en la Figura 1.

Ejemplo 21. Ensayos

Modulación de la actividad del canal iónico

Los compuestos descritos en la presente memoria también pueden ensayarse para la modulación de otros canales regulados por voltaje (por ejemplo, otras isoformas de canales de Na^+ o canales de Ca^{2+} como los canales de tipo T $Ca_v3,2$). Se conocen procedimientos adicionales en la técnica. Los datos ejemplares obtenidos de acuerdo con estos procedimientos también se muestran en la Figura 1.

Ensayo $Na_v1,5$

La inhibición del canal de sodio $Na_v1,5$ resistente a TTX, un canal de iones cardíacos clave, puede tener profundos efectos en la duración y amplitud del potencial de acción cardíaca y puede provocar arritmias y otras disfunciones cardíacas. Para evaluar la posible responsabilidad cardíaca de los compuestos en una etapa temprana del proceso de descubrimiento de fármacos, se realizó un ensayo de detección de canales de sodio $Na_v1,5$ en la plataforma de electrofisiología automatizada PatchXpress™ de Molecular Device. Bajo condiciones de pinzamiento de voltaje, se registraron corrientes $Na_v1,5$ de las células HEK que expresan el canal humano $Na_v1,5$ en la ausencia y presencia de concentraciones crecientes del compuesto de prueba para obtener un valor IC_{50}. La solución de grabación externa contenía (en mM): 90 de TEACl, 50 de NaCl, 1,8 de CaCl, 1 de $MgCl_2$, 10 de HEPES, 10 de glucosa, ajustado a pH 7,4 con TEA-OH y a 300 de mOsm con sacarosa (si es necesario), mientras que la solución interna de pipeta de parche contenía (en mM): 129 de CsF, 2 de $MgCl_2$, 11 de EGTA, 10 de HEPES, 3 de Na_2ATP ajustados a pH 7,2 con CsOH y a 290 de mOsm con sacarosa (si es necesario). Las corrientes del canal $Na_v1,5$ fueron evocadas usando una forma de onda de potencial de acción cardíaca a 1 Hz, digitalizada a 31,25 kHz y filtrado de paso bajo a 12 kHz.

Canales de Ca^{2+} regulados por voltaje

Los compuestos descritos en la presente memoria también pueden estudiarse como moduladores de canales de Ca^{2+} regulados por voltaje (por ejemplo, canales $Ca_v1,2$, $Ca_v2,2$, $Ca_v3,1$ o $Ca_v3,2$). Se describen en la presente memoria procedimientos ejemplares.

A. Procedimientos de pinzamiento de parche

Para grabar las corrientes de los canales de Ca^{2+} tipo T de $Ca_v3,2$ expresados en las células HEK, los medios de cultivo se pueden reemplazar con solución extracelular (ECS) que contiene (en mM): 142 de CsCl, 10 de D-glucosa, 2 de $CaCl_2$, 1 de $MgCl_2$, 10 de HEPES, pH ajustado a 7,4 con CsOH. Las pipetas de parche de vidrio de borosilicato, extraídas con un extractor de micropipetas P-97 (Sutter Instruments, Novato, CA) con resistencias típicas de 2-4 MW, pueden retrollenarse con solución intracelular que contiene (en mM: 126,5 de Cs-metanosulfonato, 2 de $MgCl_2$, 10 de HEPES, 11 de EGTA, 2 de Na-ATP, pH ajustado a 7,3 CsOH. Los voltajes se registraron en la configuración de célula completa a temperatura ambiente (~21 ºC) usando un amplificador de pinzamiento de parche Axopatch 200B (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Las grabaciones pueden filtrarse de paso bajo a 1 kHz (filtro Bessel de 4 polos a -3 dB), digitalizarse a 2 kHz con una interfaz Digidata 1322A (Molecular Devices) y adquirirse utilizando pClamp 9,2 (Molecular Devices), sin usar sustracción de fugas. Los compuestos de prueba, preparados como soluciones madre de 30 mM en DMSO y diluidos en tampón extracelular, se pueden aplicar a través de una matriz de capilares de barril múltiple (calibre 24) accionados por gravedad conectados a depósitos controlados por válvulas solenoides. Los efectos de los compuestos sobre la inactivación lenta y rápida de $Ca_v3,2$ se pueden evaluar utilizando diferentes protocolos de voltaje. La dependencia del voltaje de la inactivación rápida y lenta del canal se puede examinar utilizando un protocolo de dos pulsos. Los datos fueron analizados y ajustados utilizando el software OriginPro v.7.5 (OriginLab, Northampton, MA).

B. Ensayo fluorescente de tipo T $Ca_v2,2/K_{ir}2,3$ de alto rendimiento

Las células se sembraron sobre placas de 384 pocillos recubiertas con poli-D-lisina de fondo transparente, paredes negras (Becton Dickinson, Franklin Lake, NJ) 2 días antes de su uso en el ensayo FLIPR. Se añadieron a cada pocillo 100 µl de células (1,4 x 10^6 células/ml) que contenían doxiciclina (Sigma-Aldrich, 1,5 µg/ml; para inducir la expresión del canal) usando un Multidrop (Thermo Scientific, Waltham, MA) y se mantuvieron en incubadora con CO_2 al 5 % a 37 ºC. En la mañana del ensayo, las células se transfirieron a una incubadora con CO_2 al 5 % a 29 ºC.

Las células se pueden lavar con un tampón de lavado que contenga (en mM): 118 de NaCl, 18,4 de HEPES, 11,7 de D-glucosa, 2 de $CaCl_2$, 0,5 de $MgSO_4$, 4,7 de KCl, 1,2 de KH_2PO_4, pH ajustado a 7,2 con NaOH. Se cargaron 4,4 µM del pigmento indicador fluorescente, Fluo-4 (Invitrogen), preparado en ácido plurónico (Sigma-Aldrich), en los pocillos y se incubaron durante 45 minutos a 29 ºC en CO_2 al 5 %. Luego, las células se enjuagaron con un tampón de estado cerrado KCl 2 mM (en mM: 138,5 de NaCl, 10 de HEPES, 10 de D-glucosa, 1 de $CaCl_2$ y 2 de KCl, con el pH ajustado a 7,4 con NaOH) cuando se realizó el ensayo de estado cerrado o tampón de estado inactivo KCl 12,5 mM (en mM: 128 de NaCl, 10 de HEPES, 10 de D-glucosa, 1 de $CaCl_2$ y 12,5 mM de KCl, con el pH ajustado a 7,4 con NaOH) cuando se realiza el ensayo de estado inactivo.

Se generaron curvas de respuesta dependientes de la concentración a partir de soluciones madre de 5 mM preparadas en DMSO (Sigma-Aldrich) y diluidas en el tampón KCl 2 mM o tampón KCl 12,5 mM y se incubaron durante 20 minutos a 29 ºC en CO_2 al 5 %. Se evocó la entrada de calcio con una adición de tampón de estimulación de KCl 130 mM (en mM: 10,5 de NaCl, 10 de HEPES, 10 de D-glucosa, 1 de $CaCl_2$ y 130 de KCl, con el pH ajustado a 7,4 con NaOH) tanto para el ensayo de estado cerrado o estado inactivo. Se evaluó un cambio en la señal de fluorescencia Fluo-4 usando el instrumento FLIPR$^{TETRA™}$ (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) durante 3 minutos después de la elevación del KCl extracelular usando una longitud de onda de iluminación de 470-495 nm con emisiones registradas a 515-575 nm.

Las curvas de respuesta dependientes de la concentración se obtuvieron comparando la señal de fluorescencia en presencia del compuesto y ajustado con una función logística (**1**) para obtener la concentración que inhibía el 50 % (IC_{50}) de la señal RLU usando el software OriginPro v.7.5 (OriginLab, Northampton, MA).

$$(1) \qquad y = \left[\frac{\text{máx - mín}}{1 + \left(\frac{[\text{fármaco}]}{IC_{50}} \right)^{n_H}} \right] + \text{mín}$$

Para evaluar la calidad de los ensayos FLIPR, se utilizó el factor Z (**2**) para cuantificar la idoneidad de las condiciones del ensayo utilizando la siguiente ecuación:

$$(2) \qquad Z = 1 - \frac{3SD_{\mathbf{muestra}} + 3SD_{\mathbf{control}}}{\text{media}_{\text{muestra}} - \text{media}_{\text{control}}}$$

Los datos se expresaron como media y desviación estándar (SD).

C. Ensayo fluorescente de tipo T $Ca_v3,1$ de alto rendimiento

Las células se sembraron en placas de 384 pocillos, recubiertas con poli-D-lisina de fondo transparente, paredes negras (Becton Dickinson, Franklin Lake, NJ) 2 días antes de su uso en el ensayo FLIPR. Se agregaron 100 µl de células (2,0 x 10^6 células/ml) que contenían doxiciclina (Sigma-Aldrich, 1,5 µg/ml; para inducir la expresión del canal) a cada pocillo usando un Multidrop (Thermo Scientific, Waltham, MA) y se mantuvieron en incubadora de CO_2 al 5 % a 37 ºC. En la mañana del ensayo, las células se transfirieron a una incubadora con CO_2 al 5 % a 29 ºC.

Las células se lavaron con un tampón de lavado que contenía (en mM): 118 de NaCl, 18,4 de HEPES, 11,7 de D-glucosa, 0,05 de $CaCl_2$, 0,5 de $MgSO_4$, 1 de KCl y 1,2 de KH_2PO_4, con el pH ajustado a 7,2 con NaOH. Se cargaron 4,4 µM del pigmento indicador fluorescente, Fluo-4 (Invitrogen), preparado en ácido plurónico (Sigma-Aldrich), en los pocillos y se incubaron durante 45 minutos a 29 ºC en CO_2 al 5 %. Luego, las células se enjuagaron con el siguiente tampón bajo de Ca^{2+} (en mM): 0,34 de Na_2HPO_4, 4,2 de $NaHCO_3$, 0,44 de KH_2PO_4, 0,41 de $MgSO_4$ 0,49 de $MgCl_2$-$6H_2O$, 20 de HEPES, 5,5 de D-Glucosa, 137 de NaCl, 5,3 de KCl y 0,001 de $CaCl_2$, con BSA al 0,1 % y el pH ajustado a 7,2 con NaOH. Se generaron curvas de respuesta dependientes de la concentración a partir de soluciones madre de 5 mM preparadas en DMSO (Sigma-Aldrich) y diluidas en el tampón que contenía Ca^{2+} bajo y se incubaron durante 20 minutos a 29 ºC en CO_2 al 5 %. La entrada de calcio se evocó con una adición de (en mM): 0,34 de Na_2HPO_4, 4,2 de $NaHCO_3$, 0,44 de KH_2PO_4, 0,41 de $MgSO_4$, 0,49 de $MgCl_2$-$6H_2O$, 20 de HEPES, 5,5 de D-Glucosa, 137 de NaCl, 5,3 de KCl y 6 de $CaCl_2$, con BSA al 0,1 % y el pH ajustado a 7,2 con NaOH. Se evaluó un cambio en la señal de fluorescencia Fluo-4 usando el instrumento FLIPR^{TETRA}™ (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) durante 3 minutos después de la elevación del KCl extracelular usando una longitud de onda de iluminación de 470-495 nm con emisiones registradas a 515-575 nm.

Las curvas de respuesta dependientes de la concentración se obtuvieron comparando la señal de fluorescencia en presencia del compuesto y ajustados con una función logística (**1**) para obtener la concentración que inhibía el 50 % (IC_{50}) de la señal RLU usando el software OriginPro v.7.5 (OriginLab, Northampton, MA).

$$(1) \qquad y = \left[\frac{\text{máx - mín}}{1 + \left(\frac{[\text{fármaco}]}{IC_{50}} \right)^{n_H}} \right] + \text{mín}$$

Para evaluar la calidad de los ensayos FLIPR, se usó el factor Z (**2**) para cuantificar la idoneidad de las condiciones del ensayo utilizando la siguiente ecuación:

$$(\mathbf{2}) \qquad Z = 1 - \frac{\mathbf{3SD_{muestra} + 3SD_{control}}}{\text{media}_{\text{muestra}} - \text{media}_{\text{control}}}$$

Los datos se expresaron como media y desviación estándar (SD).

D. Ensayo fluorescente de tipo T $Ca_v3,2/K_{ir}2,3$ de alto rendimiento

Las células se sembraron en placas de 384 pocillos recubiertas con poli-D-lisina de fondo transparente, paredes negras (Becton Dickinson, Franklin Lake, NJ) 2 días antes de su uso en el ensayo FLIPR. Se agregaron 100 µl de células (1,2 x 10^6 células/ml) que contenían doxiciclina (Sigma-Aldrich, 1,5 µg/ml; para inducir la expresión del canal) a cada pocillo usando un Multidrop (Thermo Scientific, Waltham, MA) y se mantuvieron en incubadora de CO_2 al 5 % a 37 ºC. En la mañana del ensayo, las células se transfirieron a una incubadora con CO_2 al 5 % a 29 ºC.

Las células se lavaron con un tampón de lavado que contenía (en mM): 118 de NaCl, 18,4 de HEPES, 11,7 de D-glucosa, 2 de $CaCl_2$, 0,5 de $MgSO_4$, 4,7 de KCl y 1,2 de KH_2PO_4, con el pH ajustado a 7,2 con NaOH. Se cargaron 4,4 µM del pigmento indicador fluorescente Fluo-4 (Invitrogen) preparado en ácido plurónico (Sigma-Aldrich) en los pocillos y se incubaron durante 45 minutos a 29 ºC en CO_2 al 5 %. Luego, las células se enjuagaron con un tampón de estado cerrado KCl 2 mM (en mM: 138,5 de NaCl, 10 de HEPES, 10 de D-glucosa, 1 de $CaCl_2$ y 2 de KCl, con el pH ajustado a 7,4 con NaOH) cuando se realizó el ensayo de estado cerrado o de tampón de estado inactivo KCl 7,6 mM (en mM: 130,9 de NaCl, 10 de HEPES, 10 de D-glucosa, 1 de $CaCl_2$ y KCl 7,6 mM, con el pH ajustado a 7,4 con NaOH) cuando se realiza el ensayo en estado inactivo. Se generaron curvas de respuesta dependientes de la concentración a partir de soluciones madre de 5 mM preparadas en DMSO (Sigma-Aldrich), diluidas en el tampón KCl 2 mM o tampón KCl 7,6 mM, y se incubaron durante 20 minutos a 29 ºC en CO_2 al 5 %. Se evocó la entrada de calcio con una adición de tampón de estimulación de KCl 12 mM (en mM: 128,5 de NaCl, 10 de HEPES, 10 de D-glucosa, 1 de $CaCl_2$ y 12 de KCl, con el pH ajustado a 7,4 con NaOH) o tampón de estimulación de KCl 14,5 mM (en mM: 126 de NaCl, 10 de HEPES, 10 de D-glucosa, 1 de $CaCl_2$ y 14,5 de KCl, con el pH ajustado a 7,4 con NaOH) para el ensayo en estado cerrado o en estado inactivo, respectivamente. Se evaluó un cambio en la señal de fluorescencia Fluo-4 usando el instrumento FLIPR^{TETRA}™ (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) durante 3 minutos después de la elevación del KCl extracelular usando una longitud de onda de iluminación de 470-495 nm con emisiones registradas a 515-575 nm.

Las curvas de respuesta dependientes de la concentración se obtuvieron comparando la señal de fluorescencia en presencia del compuesto y ajustadas con una función logística (**1**) para obtener la concentración que inhibía el 50 % (IC_{50}) de la señal RLU usando el software OriginPro v.7,5 (OriginLab, Northampton, MA).

$$(1) \qquad y = \left[\frac{\text{máx - mín}}{1 + \left(\frac{[\text{fármaco}]}{IC_{50}} \right)^{n_H}} \right] + \text{mín}$$

Para evaluar la calidad de los ensayos FLIPR, se usó el factor Z (**2**) para cuantificar la idoneidad de las condiciones del ensayo utilizando la siguiente ecuación:

$$(2) \qquad Z = 1 - \frac{3SD_{muestra} + 3SD_{control}}{media_{muestra} - media_{control}}$$

Los datos se expresaron como media y desviación estándar (SD).

E. Ensayo fluorescente de tipo T $Ca_v1,2/K_{ir}2,3$ de alto rendimiento

Las células se sembraron en placas de 384 pocillos recubiertas con poli-D-lisina de fondo transparente, paredes negras (Becton Dickinson, Franklin Lake, NJ) 2 días antes de su uso en el ensayo FLIPR. Se agregaron 100 µl de células (1,2 x 10^6 células/ml) que contenían doxiciclina (Sigma-Aldrich, 1,5 µg/ml; para inducir la expresión del canal) a cada pocillo usando un Multidrop (Thermo Scientific, Waltham, MA) y se mantuvieron en incubadora con CO_2 al 5 % a 37 ºC. En la mañana del ensayo, las células se transfirieron a una incubadora con CO_2 al 5 % a 29 ºC.

Las células se lavaron con un tampón de lavado que contenía (en mM): 118 de NaCl, 18,4 de HEPES, 11,7 de D-glucosa, 2 de $CaCl_2$, 0,5 de $MgSO_4$, 4,7 de KCl y 1,2 de KH_2PO_4, con el pH ajustado a 7,2 con NaOH. Se cargaron 4,4 µM del pigmento indicador fluorescente Fluo-4 (Invitrogen) preparado en ácido plurónico (Sigma-Aldrich) en los pocillos y se incubaron durante 45 minutos a 29 ºC en CO_2 al 5 %. Luego, las células se enjuagaron con un tampón de estado cerrado KCl 2 mM (en mM: 138,5 de NaCl, 10 de HEPES, 10 de D-glucosa, 1 de $CaCl_2$ y 2 de KCl, con el pH ajustado a 7,4 con NaOH) cuando se realizó el ensayo de estado cerrado o tampón de estado inactivo KCl 30 mM (en mM: 110,5 de NaCl, 10 de HEPES, 10 de D-glucosa, 1 de $CaCl_2$ y KCl 30 mM, con el pH ajustado a 7,4 con NaOH) cuando se realiza el ensayo en estado inactivo. Se generaron curvas de respuesta dependientes de la concentración a partir de soluciones madre de 5 mM preparadas en DMSO (Sigma-Aldrich), diluidas en el tampón KCl 2 mM o tampón KCl 30 mM, y se incubaron durante 20 minutos a 29 ºC en CO_2 al 5 %. Se evocó la entrada de calcio con una adición de tampón de estimulación KCl 130 mM (en mM: 10,5 de NaCl, 10 de HEPES, 10 de D-glucosa, 1 de $CaCl_2$ y 130 de KCl, con el pH ajustado a 7,4 con NaOH). Se evaluó un cambio en la señal de fluorescencia Fluo-4 usando el instrumento FLIPR^{TETRA}™ (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) durante 3 minutos después de la elevación del KCl extracelular usando una longitud de onda de iluminación de 470-495 nm con emisiones registradas a 515-575 nm.

Las curvas de respuesta dependientes de la concentración se obtuvieron comparando la señal de fluorescencia en presencia del compuesto y con una función logística (**1**) para obtener la concentración que inhibía el 50 % (IC_{50}) de la señal RLU usando el software OriginPro v.7.5 (OriginLab, Northampton, MA).

$$(1) \qquad y = \left[\frac{\text{máx - mín}}{1 + \left(\frac{[\text{fármaco}]}{IC_{50}} \right)^{n_H}} \right] + \text{mín}$$

Para evaluar la calidad de los ensayos FLIPR, se usó el factor Z (**2**) para cuantificar la idoneidad de las condiciones del ensayo utilizando la siguiente ecuación:

$$(2) \qquad Z = 1 - \frac{3SD_{muestra} + 3SD_{control}}{media_{muestra} - media_{control}}$$

Los datos se expresaron como media y desviación estándar (SD).

Actividad del canal hERG K^+

Puede ser deseable que el compuesto tenga una actividad muy baja con respecto al canal hERG K^+, que se expresa en el corazón: los compuestos que bloquean este canal con alta potencia pueden causar reacciones que son fatales. Ver, por ejemplo, Bowlby et al., "HERG (KCNH2 or Kv11.1 K + Channels: Screening for Cardiac Arrhythmia Risk," Curr. Drug Metab. 9(**9**):965-70 (2008)). Por lo tanto, para un compuesto que modula, por ejemplo, la actividad del canal

de sodio, también se puede demostrar que el canal hERG K^+ no se inhibe o se inhibe mínimamente en comparación con la inhibición del canal primario objetivizado. Tales compuestos pueden ser particularmente útiles en los procedimientos descritos en la presente memoria.

Los compuestos se probaron usando un ensayo electrofisiológico estándar (ver Kiss et al., Assay & Drug Development Technologies, 1:1-2, 2003, y Bridgland-Taylor et al., Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 54:189-199, 2006). Brevemente, los compuestos se probaron a 3 μM usando IonWorks y el porcentaje de inhibición del pico de la corriente de cola hERG de desactivación lenta se usó para evaluar la afinidad.

Modelos de dolor

L5/L6 Ligadura del nervio espinal (SNL): Modelo de dolor de Chung

La ligadura del nervio espinal es un modelo animal que representa la lesión del nervio periférico que genera un síndrome de dolor neuropático. En este modelo, los animales experimentales desarrollan los síntomas clínicos de alodinia táctil e hiperalgesia. La lesión por ligadura del nervio espinal (SNL) L5/L6 se indujo mediante el procedimiento de Kim y Chung (Kim et al., Pain 50:355-363 (1992)) en ratas macho Sprague-Dawley (Harlan; Indianapolis, IN) con un peso de 200 hasta 250 gramos. A continuación, se proporciona un protocolo ejemplar.

Los animales se anestesiaron con isoflurano, se retiró el proceso transverso L6 izquierdo y los nervios espinales L5 y L6 se ligaron firmemente con sutura de seda 6-0. La herida se cerró con suturas internas y adhesivo de tejido externo. Las ratas que exhiben deficiencia motora (como arrastrar las patas) o no exhiben alodinia táctil posterior pueden excluirse de las pruebas adicionales.

Las ratas de control simuladas pueden someterse a la misma operación y manipulación que los animales experimentales, pero sin SNL.

Evaluación de hiperalgesia mecánica

Los valores de línea base y postratamiento para la hiperalgesia mecánica se evaluaron usando un dispositivo digital Randall-Selitto (dRS; IITC Life Sciences, Woodland Hills, CA). Se permitió que los animales se aclimataran a la sala de pruebas durante un mínimo de 30 minutos antes de la prueba. Los animales se colocaron en un cabestrillo de sujeción que suspende al animal, dejando las extremidades posteriores disponibles para la prueba. El umbral de compresión de la pata se midió una vez en cada punto de tiempo para las patas ipsilateral y contralateral. El estímulo se aplicó a la superficie plantar de la pata trasera mediante una punta en forma de cúpula colocada entre el tercer y cuarto metatarso, y se aplicó presión gradualmente durante aproximadamente 10 segundos. Las mediciones se toman del primer comportamiento nocifensivo observado de vocalización, lucha o retirada. Se usó un valor de corte de 300 g para evitar lesiones al animal. La media y el error estándar de la media (SEM) se determinaron para cada pata para cada grupo de tratamiento. Catorce días después de la cirugía, se evaluó la hiperalgesia mecánica y las ratas se asignaron a grupos de tratamiento en función de los valores de línea base pretratamiento. Antes de iniciar la administración de fármacos, se pueden obtener datos de pruebas de comportamiento de línea base. En momentos seleccionados después de la infusión de la Prueba o el Artículo de Control, los datos de comportamiento se pueden recopilar nuevamente.

Datos ejemplares se muestran en las **Figuras 2A-2C** y **3A-3C** para compuestos seleccionados de la invención. Se presentan datos adicionales en las **Tablas 2-4** a continuación.

La **Tabla 2** muestra que el Compuesto (**1**) y el Compuesto (**41**) (30 mg/kg, p.o.) disminuyeron significativamente la hiperalgesia mecánica a las 2 y 4 horas después de la administración en comparación con los animales tratados con vehículo. El compuesto (**24**) (30 mg/kg, p.o.) no tuvo un efecto significativo sobre la hiperalgesia mecánica en ningún momento probado en comparación con los animales tratados con vehículo.

La **Tabla 3** muestra que la administración del Compuesto (**33**) (30 mg/kg, p.o.) disminuyó significativamente la hiperalgesia mecánica a las 1, 2 y 4 horas después de la administración en comparación con los animales tratados con vehículo. La administración del Compuesto (**56**), Compuesto (**31**) o Compuesto (**34**) (30 mg/kg, p.o.) disminuyó significativamente la hiperalgesia mecánica 2 y 4 horas después de la administración en comparación con los animales tratados con vehículo. La administración del Compuesto (**36**) (30 mg/kg, p.o.) no tuvo un efecto significativo sobre la hiperalgesia mecánica en ningún momento probado en comparación con los animales tratados con vehículo.

Tabla 2

Compuesto	**Umbral de respuesta (g)**			**% Reversión**			**% Pico de gabapentina**
	1 hora	**2 horas**	**4 horas**	**1 hora**	**2 horas**	**4 horas**	
Gabapentina (100 mg/kg; p.o.)	129,0	154,6	135,7	359,	55,3	41,0	--
DMA/PS80/PEG400 (10:45:45, 2 ml/kg, p.o.)	90,9	85,1	84,6	5,4	0,8	0,4	1,4
Compuesto (**1**) (30 mg/kg, p.o.)	93,8	120,6	113,3	9,2	30,2	24,4	54,7
Compuesto (**24**) (30 mg/kg, p.o.)	84,0	118,4	116,6	0,8	27,9	26,5	50,5
Compuesto (**41**) (30 mg/kg, p.o.)	99,6	108,3	109,0	13,8	20,7	21,3	37,5

Tabla 3

Compuesto	**Umbral de respuesta (g)**			**% Reversión**			**% Pico de gabapentina**
	1 hora	**2 horas**	**4 horas**	**1 horas**	**2 horas**	**4 horas**	
Gabapentina (100 mg/kg; p.o.)	113,5	153,8	169,3	22,9	61,0	75,7	-
DMA/PS80/PEG400 (10:45:45, 2 ml/kg, p.o.)	87,8	85,5	83,2	-0,2	-2,2	-4,3	-3,7
Compuesto (**31**) (30 mg/kg, p.o.)	107,9	139,0	109,9	17,2	48,0	19,2	78,7
Compuesto (**33**) (30 mg/kg, p.o.)	113,6	136,9	150,8	22,4	44,7	58,1	73,3
Compuesto (**34**) (30 mg/kg, p.o.)	104,5	144,8	132,4	15,3	54,2	42,3	88,9
Compuesto (**56**) (30 mg/kg, p.o.)	110,8	131,4	140,4	19,8	40,4	49,4	66,2
Compuesto (**36**) (30 mg/kg, p.o.)	87,8	107,0	112,3	-0,5	18,6	23,8	30,5

Los datos ejemplares también se muestran en la Figura 2C y la Figura 3C para el Compuesto (110) y en la Tabla 4 a continuación. Se muestra que el compuesto (110) disminuye significativamente la hiperalgesia mecánica a las dos y cuatro horas después de la administración en comparación con los animales tratados con vehículo.

Tabla 4

Compuesto	Umbral de respuesta (g)			% Reversión			% Pico de gabapentina
	1 hora	2 horas	4 horas	1 hora	2 horas	4 horas	
Gabapentina (100 mg/kg; p.o.)	129,0	154,6	135,7	359,	55,3	41,0	-
DMA/PS80/PEG400 (10:45:45, 2 ml/kg, p.o.)	90,9	85,1	84,6	5,4	0,8	0,4	1,4
Compuesto (110) (30 mg/kg, p.o.)	100,6	148,5	126,1	14,6	51,2	34,1	92,7

Evaluación de la alodinia táctil: Von Frey

La evaluación de la alodinia táctil puede consistir en medir el umbral de retirada de la pata ipsilateral al sitio de la lesión nerviosa en respuesta al sondaje con una serie de filamentos de von Frey calibrados (estímulos inocuos). Los animales pueden aclimatarse durante 30 minutos antes de la prueba a las jaulas de malla de alambre suspendidas. Cada filamento de von Frey se puede aplicar perpendicularmente a la superficie plantar de la pata ligada de ratas durante 5 segundos. Una respuesta positiva puede ser indicada por una fuerte retirada de la pata. Para las ratas, el primer filamento de prueba es 4,31. Se pueden tomar medidas antes y después de la administración de los artículos de prueba. El umbral de retirada de la pata se puede determinar mediante el procedimiento no paramétrico de Dixon (Dixon, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 20:441-462 (1980)), en el que el estímulo se incrementó gradualmente hasta que se obtuvo una respuesta positiva, y luego disminuyó hasta que se observó un resultado negativo. El protocolo puede repetirse hasta que se determinen tres cambios en el comportamiento ("up and down" method; Chaplan et al., J. Neurosci. Methods 53: 55-63 (1994)). El umbral de retirada de la pata del 50 % se puede determinar como $(10^{[Xf+k\delta]})/10.000$, donde X_f = el valor del último filamento de von Frey empleado, k = valor de Dixon para el patrón positivo/negativo, y δ = la diferencia logarítmica entre estímulos. Los valores de corte para las ratas pueden ser, por ejemplo, no menos de 0,2 g y no más de 15 g (5,18 filamento); para ratones no menos de 0,03 g y no más de 2,34 g (4,56 filamentos). Una caída significativa del umbral de retirada de la pata en comparación con la línea base pretratamiento se considera alodinia táctil. La alodinia táctil de SNL de rata puede probarse para los compuestos descritos en la presente memoria, por ejemplo, en 60 minutos comparados con los valores de línea base y post SNL.

Evaluación de la hipersensibilidad térmica: Hargreaves

El procedimiento de Hargreaves y colegas (Hargreaves et al., Pain 32:77-8 (1988)) puede emplearse para evaluar la latencia de retirada de la pata a un estímulo térmico nocivo.

Se puede permitir que las ratas se aclimaten dentro de un recinto de plexiglás en una placa de vidrio transparente durante 30 minutos. Una fuente de calor radiante (por ejemplo, una bombilla halógena acoplada a un filtro infrarrojo) puede activarse con un temporizador y enfocarse en la superficie plantar de la pata afectada de las ratas tratadas. La latencia de retirada de la pata se puede determinar mediante una fotocélula que detiene tanto la lámpara como el temporizador cuando se retira la pata. La latencia para la retirada de la pata de la fuente de calor radiante se puede determinar antes de L5/L6 SNL, 7-14 días después de L5/L6 SNL pero antes de la administración del fármaco, así como después de la administración del fármaco. Un corte máximo de 33 segundos se emplea típicamente para prevenir el daño tisular. La latencia de retirada de la pata se puede determinar así al 0,1 segundo más cercano. Una caída significativa de la latencia de retirada de la pata desde la línea base indica el estado de la hiperalgesia térmica. La antinocicepción está indicada por una reversión de la hiperalgesia térmica a la línea de base pretratamiento o un aumento significativo ($p < 0,05$) en la latencia de retirada de la pata por encima de esta línea base. Los datos se convierten en % anti hiperalgesia o % antinocicepción mediante la fórmula: (100 × (latencia de prueba - latencia de línea base)/(corte - latencia de línea base) donde el corte es 21 segundos para determinar anti hiperalgesia y 40 segundos para determinar antinocicepción.

Modelos de epilepsia

Modelo de crisis psicomotora de 6 Hz de epilepsia parcial

Los compuestos pueden evaluarse para la protección contra las convulsiones inducidas por un pulso rectangular de 6 Hz de 0,2 ms de ancho de 3 s de duración, con una intensidad de estímulo de 32 mA (CC97) aplicada a la córnea de ratones machos CF1 (20-30 g) de acuerdo con los procedimientos descritos por Barton et al, "Pharmacological Characterization of the 6 Hz Psychomotor Seizure Model of Partial Epilepsy," Epilepsy Res. 47(**3**):217-27 (2001). Las

convulsiones se caracterizan por la expresión de uno o más de los siguientes comportamientos: aturdimiento, clonus de las extremidades anteriores, espasmos de las vibrisas y cola de Straub inmediatamente después de la estimulación eléctrica. Los animales pueden considerarse "protegidos" si, después del pretratamiento con un compuesto, el estímulo de 6 Hz no pudo evocar una respuesta conductual como se describe anteriormente.

Modelo de Epilepsia GAERS (Ratas con Epilepsia Ausente Genética de Estrasburgo)

El GAERS (Ratas con Epilepsia Ausente Genética de Estrasburgo) se caracteriza por sus episodios de convulsiones ausentes prolongados y frecuentes. Los investigadores han determinado, utilizando registros electrofisiológicos de neuronas dentro del tálamo, que la actividad y la expresión de los canales de calcio de bajo voltaje aumentan significativamente en GAERS. Se utilizaron para este estudio ocho ratas GAERS hembras, criadas en el Instituto Ludwig para la Investigación del Cáncer. Las ratas pesaron entre 180 y 250 g y tenían entre 18 y 26 semanas de edad al comienzo del experimento. Los procedimientos para realizar este ensayo son conocidos en la técnica.

Evaluaciones de deficiencias neurológicas o musculares

Para evaluar los efectos secundarios indeseables de un compuesto (toxicidad), se puede monitorizar a los animales en busca de signos evidentes de deterioro de la función neurológica o muscular. En ratones, el procedimiento de rotarod (Dunham et al., J. Am. Pharmacol. Assoc. 46:208-209 (1957)) se usa para divulgar un deterioro muscular o neurológico mínimo (MMI). Cuando se coloca un ratón sobre una varilla que gira a una velocidad de 6 rpm, el animal puede mantener su equilibrio durante largos períodos de tiempo. El animal se considera tóxico si se cae de esta varilla giratoria tres veces durante un período de 1 minuto. Además de MMI, los animales pueden exhibir una marcha circular o en zigzag, postura corporal anormal y extensión de las piernas, temblores, hiperactividad, falta de comportamiento exploratorio, somnolencia, estupor, catalepsia, pérdida de respuesta de colocación y cambios en el tono muscular.

Grabaciones de la lamina I/II de las neuronas de la médula espinal

Pueden anestesiarse ratas Wistar macho (P6 a P9 para grabaciones por pinzamiento de voltaje y P15 a P18 para pinzamiento de corriente) mediante inyección intraperitoneal de Inactin (Sigma). Luego, la médula espinal se puede diseccionar rápidamente y colocar en una solución helada de solución protectora de sacarosa que contiene (en mM): 50 de sacarosa, 92 de NaCl, 15 de D-Glucosa, 26 de $NaHCO_3$, 5 de KCl, 1,25 de NaH_2PO_4, 0,5 de $CaCl_2$, 7 de $MgSO_4$,1 de ácido cinurénico, y burbujeó con CO_2 al 5 %/O_2 al 95 %. Las meninges, la duramadre y las raíces dorsales y ventrales pueden luego extraerse de la región lumbar de la médula espinal bajo un microscopio de disección. La región lumbar "limpia" de la médula espinal se puede pegar a la etapa de vibratomo e inmediatamente sumergirse en una solución de sacarosa, burbujeante y helada. Para grabaciones de pinzamiento de corriente, se pueden cortar rebanadas parasagitales de 300 a 350 µm para preservar el árbol dendrítico de las neuronas de lámina I, mientras que se pueden preparar rebanadas transversales de 350 a 400 µm para grabaciones de canal de Na_V con pinzamiento de voltaje. Se puede permitir que las rebanadas se recuperen durante 1 hora a 35 ºC en solución de Ringer que contiene (en mM): 125 de NaCl, 20 de D-Glucosa, 26 de $NaHCO_3$, 3 de KCl, 1,25 de NaH_2PO_4, 2 de $CaCl_2$, 1 de $MgCl_2$, 1 de ácido cinurénico, 0,1 de picrotoxina, burbujeada con CO_2 al 5 %/O_2 al 95 %. La cámara de recuperación de rebanadas puede volver a temperatura ambiente (20 a 22 ºC) para grabaciones.

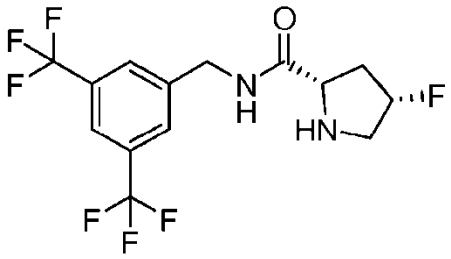
Las neuronas se pueden visualizar utilizando la óptica IR-DIC (Zeiss Axioskop 2 FS plus, Gottingen, Alemania), y las neuronas de la lámina I y la capa externa de la lámina II se pueden seleccionar en función de su ubicación con respecto a la capa de sustancia gelatinosa. Las neuronas se pueden someter a pinzamiento de parche usando pipetas de parche de vidrio de borosilicato con resistencias de 3 a 6 MW. Grabaciones de pinzamiento de corriente de neuronas de lámina I/II en la rebanada intacta, la solución de grabación externa fue la solución de Ringer anterior, mientras que la solución de pipeta de parche interno contenía (en mM): 140 de KGluconato, 4 de NaCl, 10 de HEPES, 1 de EGTA, 0,5 de $MgCl_2$, 4 de MgATP, 0,5 de Na_2GTP, ajustado a pH 7,2 con KOH 5 M y a 290 mOsm con D-manitol (si es necesario). Las neuronas de activación tónica se pueden seleccionar para los experimentos con pinzamiento de corriente, mientras que las neuronas fásicas, de inicio retardado y de espiga única se pueden descartar (**22**). Las grabaciones pueden digitalizarse a 50 kHz y someterse a filtrado de paso bajo a 2,4 kHz.

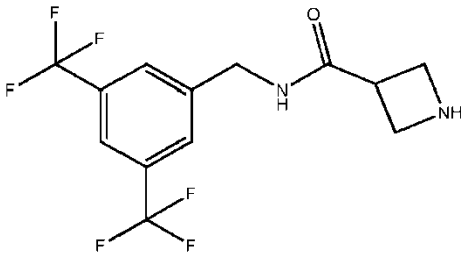
Parámetros farmacocinéticos.

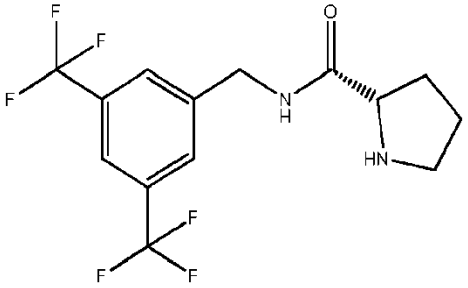
Las características de exposición preliminares de los compuestos se pueden evaluar utilizando, por ejemplo, un diseño de estudio in vivo de Farmacocinética Temprana de Rata (EPK) para mostrar biodisponibilidad. Por ejemplo, las ratas macho Sprague-Dawley se pueden dosificar mediante sonda oral (PO) en una formulación particular. Luego se pueden recolectar muestras de sangre de los animales en 6 puntos temporales hasta 4 horas postdosis. El análisis farmacocinético puede realizarse luego en las concentraciones medidas de LC-MS/MS para cada punto de tiempo de cada compuesto.

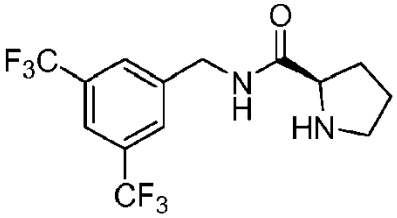
REIVINDICACIONES

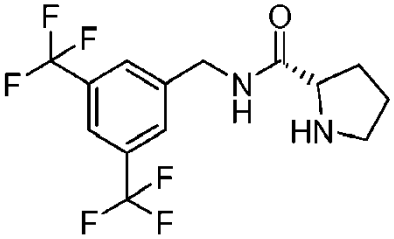
1. Un compuesto seleccionado del grupo que consiste en

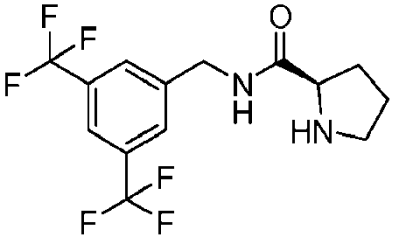

(205),

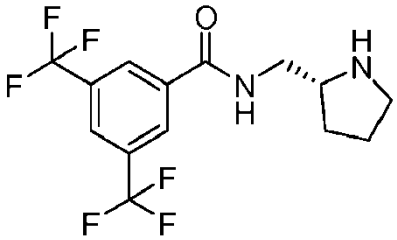

(16),

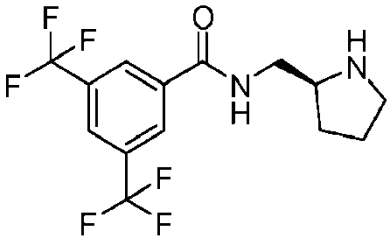

(17),

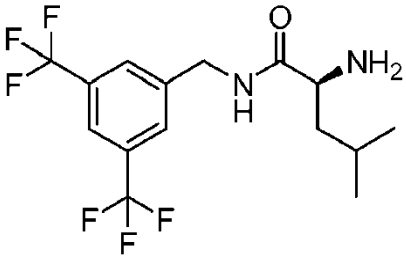

(18),

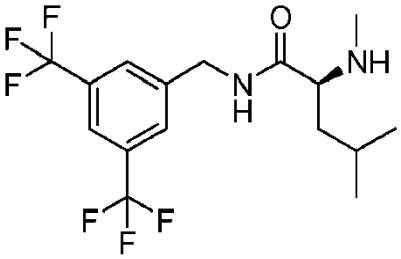

(189),

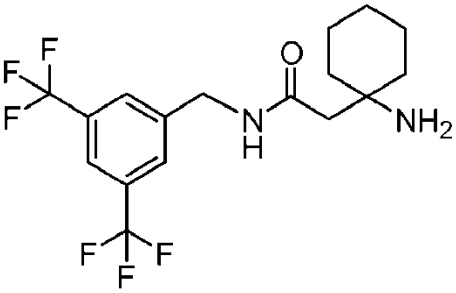

(190),

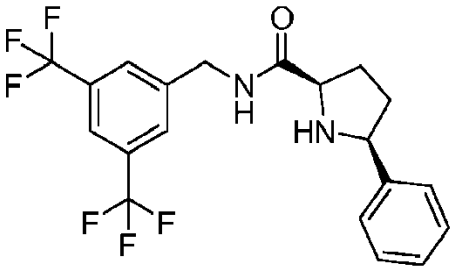

(194),

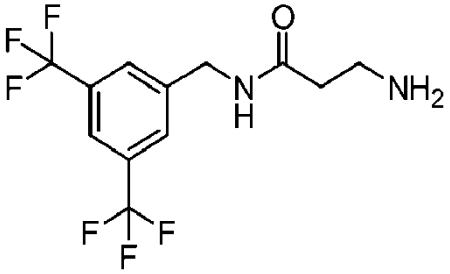

(195),


(196),

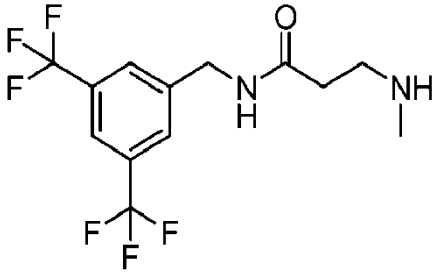

(197),


(199),

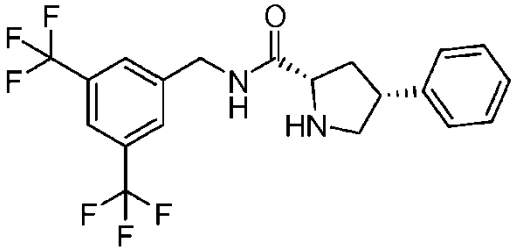

(200),



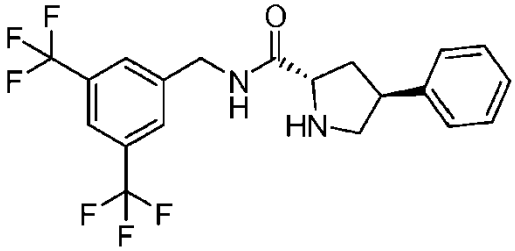
(201),



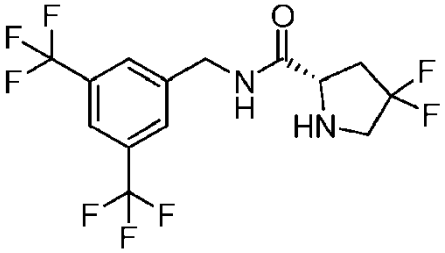
(202),



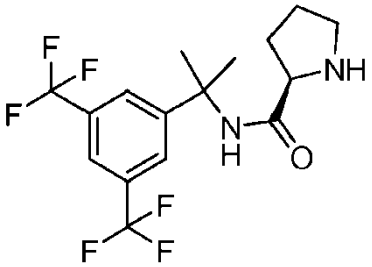
(203),



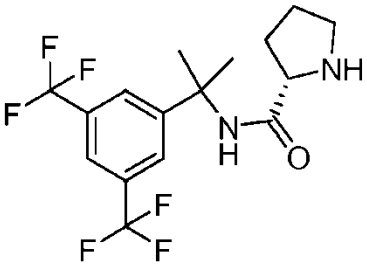
(204),



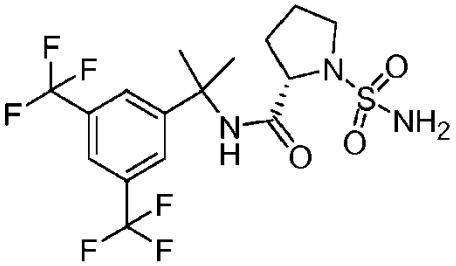
(206),



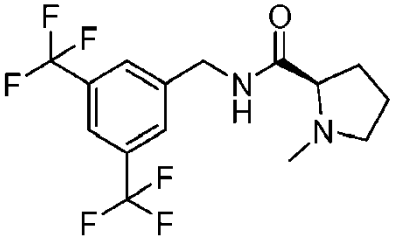
(207),



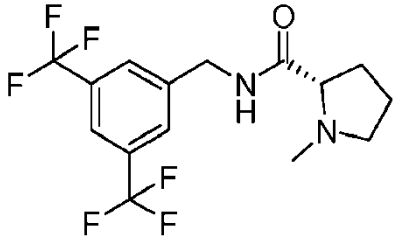
(208),



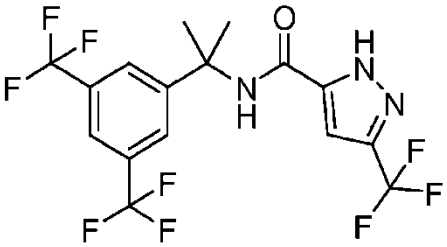
(209),



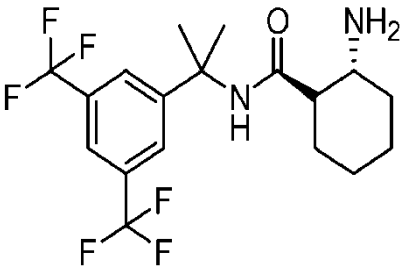
(210),

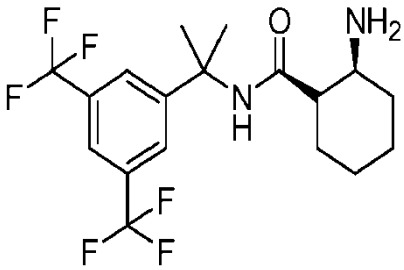


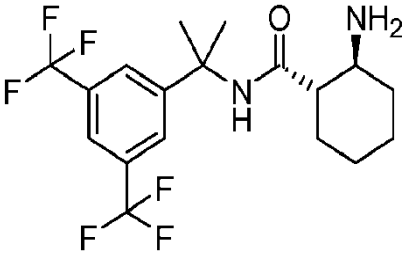
(211),

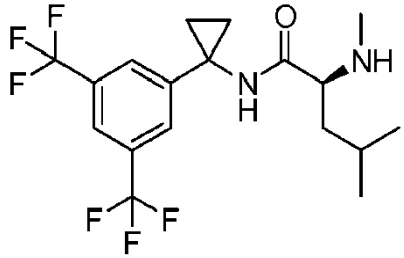


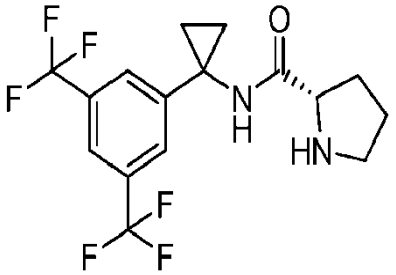
(215),

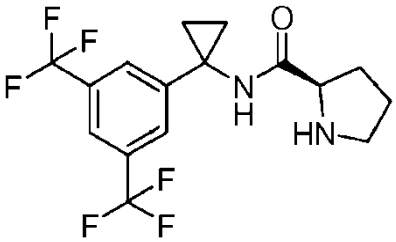

(216),

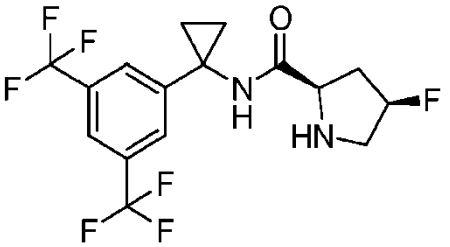

(217),

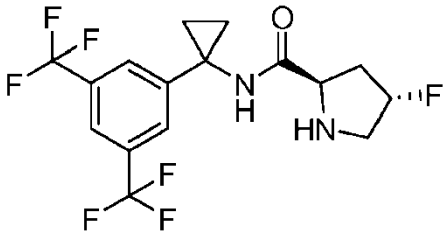

(218),

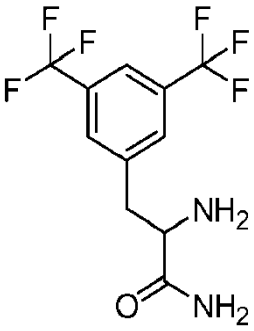

(219),

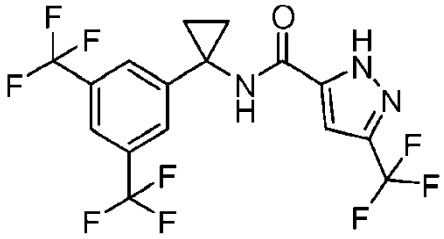

(220),

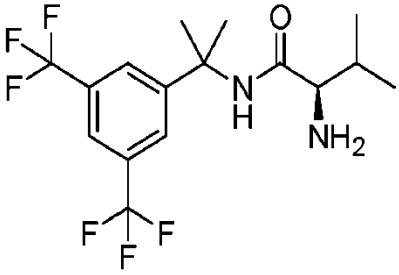

(221),

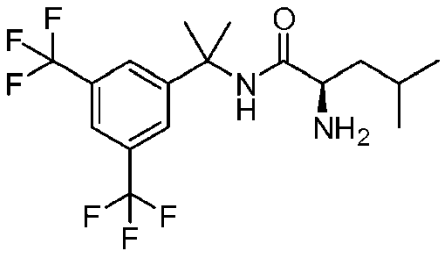

(222),

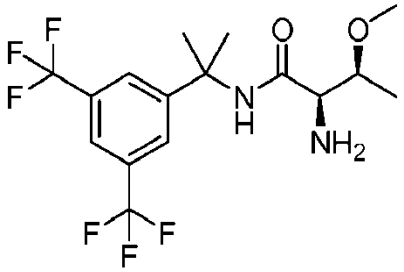

(223),


(224),

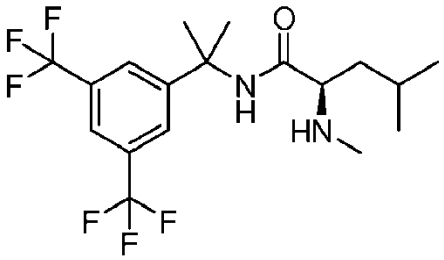

(225),


(226),

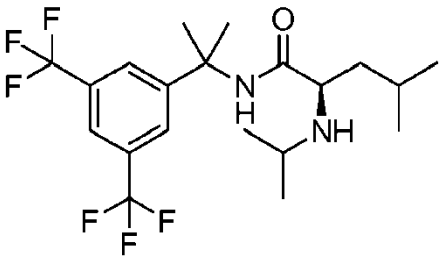

(227),



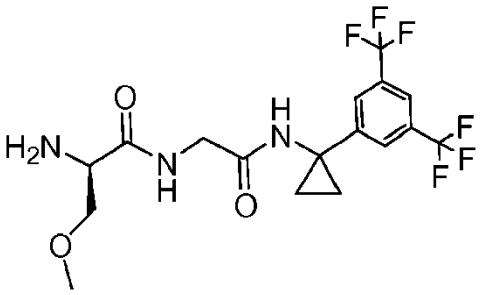
(228),



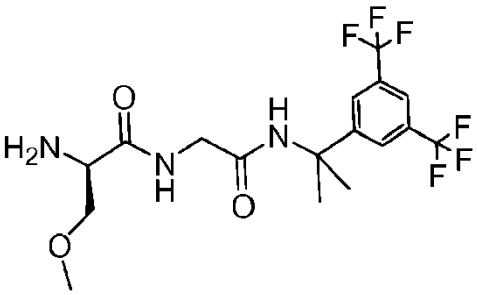
(229),



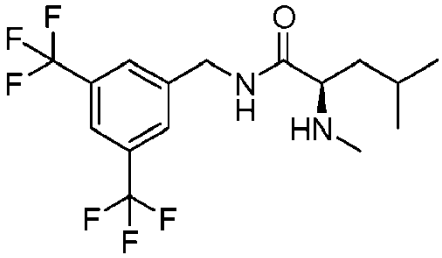
(230),



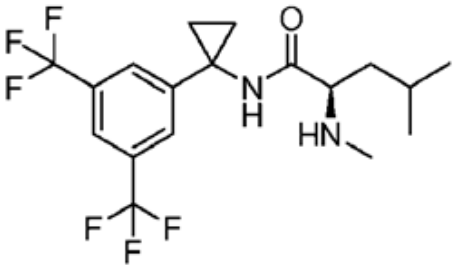
(231),



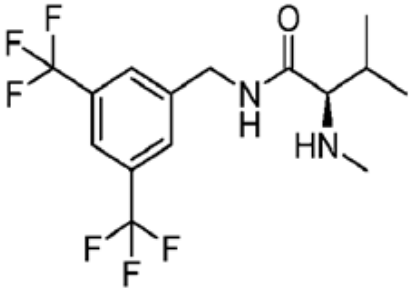
(232),



(233),



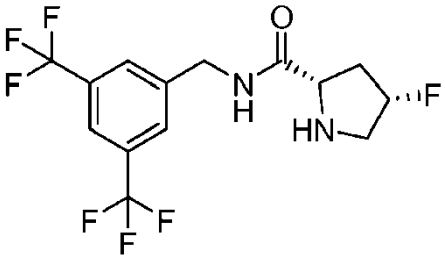
(234), <u>o</u>



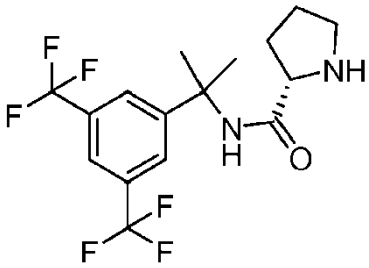
(235),

o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

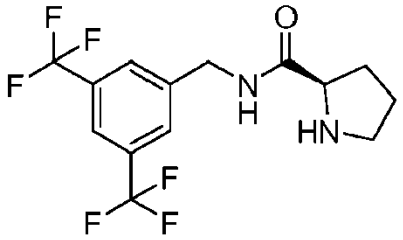
2. El compuesto de la reivindicación 1, seleccionado del grupo que consiste en



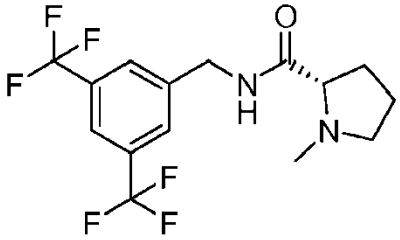
(205),



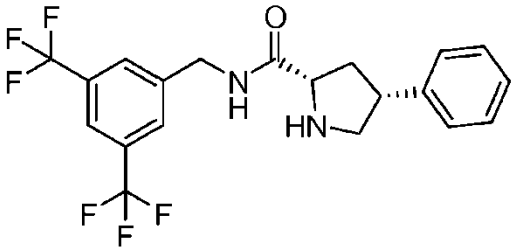
(208),



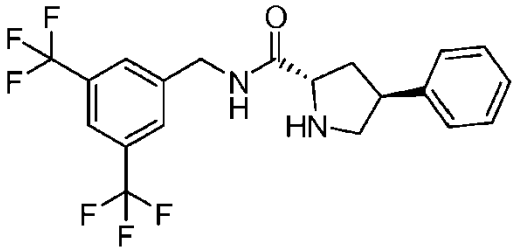
(190),



(211),

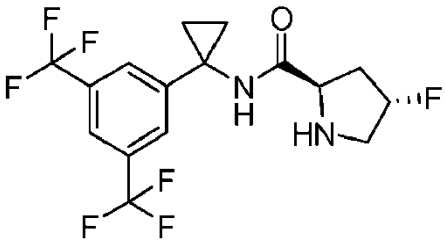


(203),



(204),

o



(223),

o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

3. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

4. La composición farmacéutica de la reivindicación 3, en la que dicha composición farmacéutica se formula en forma de dosificación unitaria.

5. La composición farmacéutica de la reivindicación 4, en la que dicha forma de dosificación unitaria es un comprimido, cápsula, comprimido oblongo, comprimido masticable, película, tira, cápsula de gel o jarabe.

6. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 para su uso en un procedimiento de tratamiento de una enfermedad o afección, comprendiendo dicho procedimiento administrar a un sujeto que necesita dicho tratamiento una cantidad efectiva de dicho compuesto o sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

7. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dicha afección es dolor, epilepsia, enfermedad de Parkinson, un trastorno del estado de ánimo, psicosis, tinnitus, esclerosis lateral amiotrófica, glaucoma, isquemia, trastornos de espasticidad, trastorno obsesivo compulsivo, síndrome de piernas inquietas o Síndrome de Tourette.

8. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 para su uso en un procedimiento de modulación de un canal de sodio regulado por voltaje, comprendiendo dicho procedimiento poner en contacto una célula con dicho compuesto.