

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 949 701**

51 Int. Cl.:

C07J 43/00 (2006.01)
A61K 31/58 (2006.01)
A61P 9/04 (2006.01)
C07J 3/00 (2006.01)
C07J 5/00 (2006.01)
C07J 9/00 (2006.01)
C07J 19/00 (2006.01)
C07J 31/00 (2006.01)
C07J 41/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.07.2018** **E 18185753 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.04.2023** **EP 3599243**

54 Título: **Compuestos similares al 17beta-heterociclil-digitalis para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.10.2023

73 Titular/es:

CVIE THERAPEUTICS LIMITED (100.0%)
Songhzi Rd. 23F 1
Taipei 11047, TW

72 Inventor/es:

CERRI, ALBERTO;
BIANCHI, GIUSEPPE;
FERRARI, PATRIZIA;
FERRANDI, MARA;
BARASSI, PAOLO;
ZAZA, ANTONIO;
ROCCHETTI, MARCELLA;
RONCHI, CARLOTTA y
HSU, SHIH-CHE

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 949 701 T3

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

DESCRIPCIÓN

Compuestos similares al 17beta-heterociclic-digitalis para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca

La presente invención se refiere al campo de los productos farmacéuticos, en particular a compuestos similares al 17β-heterociclo-digitalis y su uso para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca.

5 Antecedentes de la invención

La prevalencia de la insuficiencia cardíaca (IC) depende de la edad, y oscila entre menos del 2 % de las personas menores de 60 años y más del 10 % de las mayores de 75 años (Metra M, Teerlink JR Lancet 2017; 390:1981-1995). La mayoría de los pacientes con IC tienen antecedentes de hipertensión, enfermedad arterial coronaria, miocardiopatías o valvulopatías, o una combinación de estos trastornos (Metra M, Teerlink JR Lancet 2017; 390:1981-1995). Se prevé que el riesgo calculado de desarrollar IC a lo largo de la vida aumente y que las personas con hipertensión tengan un riesgo mayor (Lloyd-Jones DM et al. Circulation 2002;106:3068-3072). Los pacientes con IC tienen un mal pronóstico, con altas tasas de ingreso hospitalario y mortalidad.

Los síntomas clínicos de la IC están causados por una doble patología cardíaca que consiste en una anomalía inotrópica que provoca una disminución del vaciado sistólico (disfunción sistólica) y una anomalía de la distensibilidad en la que la capacidad de los ventrículos para aspirar sangre del sistema venoso está alterada (disfunción diastólica), lo que reduce la cantidad de sangre disponible para la contracción sistólica (es decir, una alteración del llenado del ventrículo izquierdo (VI)). El deterioro de la contractilidad y la relajación es consecuencia de una distribución anormal del Ca^{2+} intracelular, resultado de una captación reducida de Ca^{2+} por el retículo sarcoplásmico (RS), el almacén intracelular de Ca^{2+} (Bers D et al Ann N.T Acad Sci 2006 1080:165-177). Este último es operado por la Ca^{2+} -ATPasa de la membrana RS (SERCA2a), un transporte activo de membrana. La actividad de SERCA2a está fisiológicamente limitada por su interacción con el fosfolamban (PLN) (Bers DM. Annu Rev Physiol 2008;70:23-49.; MacLennan DH, Kranias EG. Nat Rev Mol Cell Biol 2003; 4(7): 566-577); tal restricción se alivia normalmente mediante la fosforilación del PLN por la proteína quinasa A (PKA), una vía de señalización gravemente deprimida como consecuencia de la remodelación de la IC (Lohse M et al Circ Res 2003; 93:896-906). Así pues, la función de SERCA2a está alterada en el miocardio insuficiente (Bers D et al Ann N.Y. Acad Sci 2006; 1080:165-177) y esto es el principal responsable de la reducción de la captación de Ca^{2+} por el RE. Además de sus consecuencias sobre la contractilidad y relajación de los miocitos, la distribución anormal de Ca^{2+} también facilita las arritmias cardíacas (Zaza & Rocchetti, Curr Pharm Des 2015; 21:1053-1061) y, a largo plazo, acelera la pérdida de miocitos por apoptosis (Nakayama H et al., J Clin Invest 2007; 117:2431-44). La reducción de la función de SERCA2a también aumenta el coste energético de la contracción, ya que requiere un aumento compensatorio de la extrusión de Ca^{2+} a través del intercambiador Na-Ca (NCX), que es menos eficiente desde el punto de vista energético (Lipskaya L et al 2010 Expert Opin Biol Ther 2010; 10:29-41). Numerosas pruebas indican que la normalización de la función de SERCA2a restablece la homeostasis del Ca^{2+} intracelular y mejora la contractilidad y la relajación de los cardiomiocitos y del corazón in situ (Byrne MJ et al., Gene Therapy 2008;15:1550-1557; Sato et al., JBC 2001;276:9392-99). En resumen, la recuperación de la función de SERCA2a en la IC puede mejorar la relajación y la contractilidad cardíacas y minimizar las arritmias, el consumo miocárdico de oxígeno y la muerte de miocitos (Lipskaia L et al., Expert Opin Biol Ther. 2010; 10:29-41). Si se produce en paralelo a la activación de SERCA2a, la inhibición de la bomba de Na,K puede aumentar aún más el contenido de Ca^{2+} intracelular sin inducir una acumulación excesiva de Ca^{2+} citosólico. Por lo tanto, la combinación de la inhibición de la Na,K-ATPasa y la estimulación de la SERCA2a puede proporcionar una inotropía positiva adicional con un riesgo reducido de eventos arritmogénicos de liberación de Ca^{2+} . Novedosas moléculas capaces de combinar la potenciación de la SERCA2a del RS con la inhibición de la bomba de Na,K podrían mejorar la función sistólica y diastólica y mejorar el rendimiento luso-inotrópico en la IC. Esto proporciona una fuerte motivación para la búsqueda de nuevos agentes luso-inotrópicos que minimicen los efectos pro-aritmicos y con un perfil de seguridad superior a la Digoxina que es capaz de inhibir la bomba de Na,K pero carece de actividad estimuladora de SERCA2a.

El tratamiento actual a largo plazo de la IC se centra en la prevención del "remodelado miocárdico" (β-bloqueadores, inhibidores de la ECA, antagonistas de la aldosterona), una respuesta crónica inadaptada a la contractilidad reducida, que amplifica el daño inicial y subyace a la evolución de la enfermedad (Heineke J & Molkentin D Nat Rev 2006; 7:589-600). Aunque este enfoque tiene un mérito indiscutible, no se centra en el deterioro de la "contractilidad" y la "relajación", que son las alteraciones funcionales que definen la IC y son responsables de sus síntomas. De hecho, particularmente en las etapas avanzadas de la enfermedad, los fármacos que aumentan la contractilidad/relajación miocárdica ("agentes inotrópicos/lusitropicos") siguen siendo ampliamente utilizados y cruciales para el manejo del paciente (Metra M, Teerlink JR Lancet 2017; 390:1981-1995). Entre ellos se encuentran las aminas simpaticomiméticas (dobutamina) y el levosimendán, un sensibilizador del Ca^{2+} con un fuerte efecto vasodilatador. Lamentablemente, estos agentes actúan mediante mecanismos con componentes potencialmente nocivos, como la facilitación de arritmias potencialmente mortales, el aumento del consumo miocárdico de oxígeno y el deterioro de un flujo sanguíneo coronario ya insuficiente debido a la caída de la presión arterial causada por la vasodilatación (Ashkar H, Makaryus AN StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2018 ene-2017 dic 19 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470431/>); Gong B. et al. J Cardiothorac Vasc Anesth 2015; 29: 1415-25; EDITORIAL). Esto limita el uso de agentes inotrópicos a las últimas fases de la enfermedad, con lo que se pierden los beneficios potenciales de aumentar la contractilidad en las primeras fases de la enfermedad. Además, estos agentes no mejoran el pronóstico ni la supervivencia de los pacientes, por lo que su uso terapéutico debe controlarse

cuidadosamente (Ashkar H, Makaryus AN StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2018 ene-.2017 dic 19; Gong B. et al. J Cardiothorac Vase Anesth 2015; 29: 1415-25; EDITORIAL).

Entre los inótrópos positivos, el glucósido cardíaco Digoxina, un inhibidor de la actividad enzimática Na,K-ATPasa, ha sido uno de los medicamentos más recetados en el pasado. Sin embargo, su uso ha ido disminuyendo en las últimas décadas debido a la dificultad de mantener intervalos de concentración sérica de digoxina (0,5-0,7 ng/ ml) en los que la digoxina despliega sus efectos beneficiosos sin alcanzar el nivel umbral de 0,9 ng/ ml por encima del cual se ha observado un aumento del riesgo de muerte, principalmente por arritmias (Packer M Journal of Cardiac Failure 2016; 22:726-730; Packer M Eur J Heart Failure 2018;20:851-852)

También se está investigando intensamente el desarrollo de fármacos para la IC con mecanismos de acción distintos de la inotropía positiva. Entre muchos, los agentes más investigados y en fase de desarrollo clínico son: SERELAXIN- mediador recombinante de relaxina 2; ULARITIDE- péptido natriurético recombinante; OMECANTIV MECARBIL- activador cardíaco de miosina; BMS986231-NO donante; ADRECIZUMAB- inhibidor de adrenomedulina; ANX-042- variante empalmada de NP; TD1439- inhibidor de neprilisina (NEP). Sin embargo, cuando se han evaluado en ensayos clínicos de fase 2-3, ninguno de estos nuevos agentes ha alcanzado el criterio de valoración principal.

La evolución clínica y el pronóstico de un paciente con insuficiencia cardíaca crónica (ICC) son mucho peores tras un episodio de insuficiencia cardíaca aguda (ICA) (Solomon SD et al. Circulation 2007;116: 1482-87). El ICA puede definirse como la nueva aparición o recurrencia de síntomas y signos de insuficiencia cardíaca, que requiere una evaluación y un tratamiento urgentes y da lugar a una asistencia no programada o a un ingreso hospitalario. La mitad de los pacientes con ICA presentan una función sistólica reducida (HFrEF), lo que representa un objetivo para posibles terapias futuras (Braunwald E. Lancet 2015; 385:812-24). Las terapias para el ICA en pacientes con fracción de eyección reducida se han centrado en aliviar la congestión con vasodilatadores, diuréticos o ultrafiltración o en aumentar el gasto cardíaco con inótrópos positivos. Aunque esta estrategia terapéutica ha reducido el riesgo de muerte súbita cardíaca, la tasa de eventos tras el alta sigue siendo inaceptablemente alta en los pacientes hospitalizados por ICA. El tratamiento disponible puede causar muchos efectos secundarios cardiovasculares no deseados, como isquemia miocárdica, lesión cardíaca y arritmias como consecuencia del tratamiento con inótrópos, especialmente en pacientes con enfermedad arterial coronaria (EAC) (Abraham WT et al., J Am Coll Cardiol 2005; 46:57-64; Flaherty JD et al., J Am Coll Cardiol. 2009; 53(3):254-63), hipotensión y baja perfusión de los órganos periféricos (riñón) causada por los vasodilatadores, especialmente en pacientes con IC y presión arterial baja. En consecuencia, el objetivo principal durante la hospitalización es mejorar el gasto cardíaco sin causar lesiones cardíacas y/o renales. Además, se ha prestado poca atención al examen o tratamiento de la relajación diastólica del ventrículo izquierdo (VI) que, en el 50 % restante de los pacientes con IC pero fracción de eyección (FE) conservada, es responsable de los síntomas de la IC. También en los pacientes con ICA que tienen una FE reducida, un deterioro de la relajación ventricular contribuye al fallo general de la función cardíaca. Se ha desarrollado una variedad de índices ecocardiográficos para medir la capacidad de relajación cardíaca tanto en modelos animales como en pacientes con IC, (p. ej., disminución de la velocidad tisular temprana del anillo mitral [e'] y disminución del tiempo de desaceleración [DT] temprana del flujo de entrada mitral [E]), junto con parámetros ecocardiográficos de aumento de la presión de llenado del VI (p. ej., relación E/e'). Aunque la correspondencia de los cambios individuales de los índices no es perfectamente superponible en algunos modelos animales y en pacientes, sus cambios globales en modelos animales de alteración de la relajación ventricular son ciertamente trasladables a la condición humana y se utilizan para estudiar el efecto de los fármacos en el ICA (Shah SA et al. Am Heart J 2009; 157: 1035-41).

Recientemente se han investigado varios enfoques terapéuticos que aumentan la función de SERCA2a. Entre ellas se incluye la sobreexpresión de SERCA2a mediante transferencia génica (Byrne et al., Gene Therapy 2008;15:1550-1557), o la inactivación del PLN mediante la expresión de mutantes con dominancia negativa (Hoshijima M et al. Nat. Med. 2002;8: 864-871; Iwanaga Y et al. J Clin Invest 2004;113, 727-736), AdV-shRNA (Suckau L et al. Circulation 2009; 119: 1241-1252), microARN (Gröbl et al. PLoS One 2014;9: e92188) o anticuerpos (Kaye DM et al J. Am. Coll. Cardiol. 2007;50:253-260). Como ponen de relieve los resultados negativos del mayor ensayo clínico de fase 2b que aplica la administración del gen SERCA2a en la IC (CUPID 2), estos enfoques adolecen de problemas importantes en la administración del constructo (vectores virales, etc.) y el ajuste de la dosis que están lejos de resolverse (Hulot JS Eur Heart J 2016;19:1534-1541). Recientemente se ha descrito una molécula pequeña (derivado de la piridona) que inhibe el PLN, estructuralmente diferente de la istaroxima (Kaneko M. et al. Eur J Pharmacol 2017;814:1-7).

Por lo tanto, el desarrollo de un activador de SERCA2a de molécula pequeña sería ventajoso para tratar la IC y sigue representando una estrategia muy prometedora.

La Istaroxima es un nuevo fármaco de molécula pequeña en desarrollo clínico para el tratamiento del ICA que está dotado del doble mecanismo de acción de inhibición de la bomba Na⁺/K⁺ (Micheletti et al J Pharmacol Exp Ther 2002; 303:592-600) al tiempo que activa la SERCA2a (Rocchetti M et al. J Pharmacol Exp Ther 2005;313:207-15). Al mismo nivel de inotropía, el efecto proarrítmico de la istaroxime es considerablemente menor que el de la digoxina, un inhibidor puro de la bomba de Na⁺/K⁺ (Rocchetti M et al. J Pharmacol Exp Ther. 2005;313:207-15). Esto sugiere que, al mejorar el aclaramiento de Ca²⁺ del citosol (Alemani J Mol Cell Cardiol 2011;50:910-8), la estimulación de SERCA2a también puede minimizar el efecto proarrítmico del bloqueo de la bomba de Na⁺/K⁺ (Rocchetti M et al. J Pharmacol Exp Ther 2005;313:207-15, Zaza & Rocchetti, Curr Parm Des 2015: 21:1053-1061) preservando su efecto inotrópico. La

reducción del efecto proarrítmico por la istaroxime se ha confirmado en estudios clínicos (Georghiade M et al J Am Coll Cardiol 2008; 51:2276-85).

En pacientes con IC, la infusión de istaroxime mejoró las funciones sistólica y diastólica. La mejora de la función sistólica se detectó mediante aumentos de la velocidad sistólica del tejido (S') y de la pendiente de la elastancia telesistólica (pendiente ESPVR); el aumento de la distensibilidad diastólica se reveló mediante un incremento de la velocidad diastólica del tejido (E') y una disminución de la elastancia telediastólica (pendiente EDPVR) (Shah SA et al. Am Heart J 2009;157:1035-41). Aunque dotada de un excelente perfil farmacodinámico, la istaroxime no es adecuada para la administración crónica porque tiene una mala absorción GI, una alta tasa de aclaramiento y contiene una potencial fracción genotóxica (oxima); por lo tanto, este agente se ha desarrollado para infusión intravenosa sólo en pacientes hospitalizados con ICA (Dec GW J Am Coll Cardiol 2008;51:2286-88; Shah SA et al. Am Heart J 2009;157:1035-41).

La istaroxima se describe en el documento EP0825197 y en S. De Munari, et al., J. Med. Chem. 2003, 64, 3644-3654 y es el compuesto (3Z,5a)-3-[(2-Aminoetoxi)imino]androstano-6,17-diona.

A pesar de su actividad favorable en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca, la Istaroxima no está completamente desprovista de inconvenientes.

La fracción aminoetoximino de la molécula sufre una transformación metabólica que puede provocar una posible genotoxicidad.

Además, la Istaroxima sólo es activa mediante administración intravenosa, por lo que sólo puede administrarse en hospitales y entornos relacionados. La administración de Istaroxima requiere personal médico bien formado y no es adecuada para el tratamiento crónico.

En consecuencia, existe una necesidad largamente sentida de un compuesto para su uso en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca dotado de efecto inotrópico positivo y lusitrópico positivo, que esté desprovisto de genotoxicidad y pueda administrarse preferentemente por vía oral.

Can. J. Chem. Vol 59(23) pp 3241-3247 (1981) divulga el análogo cardioactivo 17.beta.-[2,5-dihidrotiofeno-3-il] de la digitoxigenina.

J. Prakt. Chem. Vol 330(3) pp 445-452 (1988) divulga el análogo 17.beta.-[3-furil] cardioactivo de la digoxigenina.

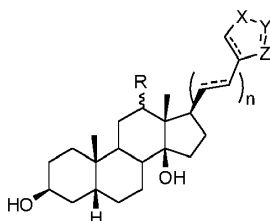
EP-A-576,915 divulga el análogo 17.beta.-[3-furil] cardioactivo de la digitoxigenina.

J. Med. Chem. Vol 40(21) pp 3484-3488 (1997) divulga el análogo cardioactivo 17.beta.-CH=CH-[2H-furan-5-ona-3-il] de la digitoxigenina.

La presente invención satisface las necesidades anteriores y supera el problema de la técnica anterior.

Sumario de la invención

Ahora se ha encontrado y son objetos de la invención los compuestos 17β-heterocicliil-digitalis-like de fórmula (I)



(I)

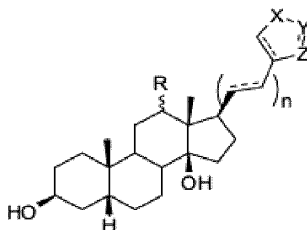
donde X, Y, Z son átomos anulares comprendidos en un anillo carbocíclico o heterocíclico de cinco miembros, seleccionado del grupo que consiste en CH, NH, N, O, S; dicho anillo heterocíclico se selecciona del grupo que consiste en imidazolilo, pirazolilo, tiazolilo, isoxazolilo, y los correspondientes derivados dihidro- y tetrahidro; dicho anillo carbocíclico o heterocíclico está opcionalmente sustituido con amino (C₁-C₄) alquilo lineal o ramificado o guanidina o guanidino (C₁-C₄) alquilo lineal o ramificado;

n es 0 o 1;

R es H u OH;

la línea de puntos representa un doble enlace opcional C=C; la línea gruesa representa un enlace en la configuración β; la línea ondulada representa un enlace tanto en la configuración α como β; sus sales farmacéuticamente aceptables, sus solvatos, hidratos.

Otro objeto de la invención son los compuestos de fórmula (I)



donde X, Y, Z son átomos anulares comprendidos en un anillo carbocíclico o heterocíclico de cinco miembros, seleccionado del grupo que consiste en CH, NH, N, O, S; dicho anillo carbocíclico o heterocíclico está opcionalmente sustituido con amino (C₁-C₄) alquilo lineal o ramificado o guanidina o guanidino (C₁-C₄) alquilo lineal o ramificado;

con la condición de que el anillo heterociclo no sea furilo;

n es 1 y existe un enlace simple o doble entre el esqueleto de androstano y el anillo 17β-heterociclilo o carbociclilo;

R es H u OH;

la línea de puntos representa un doble enlace opcional C=C; la línea gruesa representa un enlace en la configuración β; la línea ondulada representa un enlace tanto en la configuración α como en la β; o

sales, solvatos o hidratos farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Algunos compuestos de fórmula (I) también pueden ser profármacos de las formas activas.

Cuando los compuestos de fórmula (I) pueden presentar tautomería, la fórmula pretende abarcar todos los tautómeros.

También las sales farmacéuticamente aceptables están incluidas en el alcance de la invención. Las sales farmacéuticamente aceptables son sales que conservan la actividad biológica del compuesto base y se derivan de ácidos farmacológicamente aceptables conocidos como, por ejemplo, ácido clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, fosfórico, nítrico, fumárico, succínico, oxálico, málico, tartárico, maleico, cítrico, metanosulfónico o benzoico y otros comúnmente utilizados en la técnica, véase por ejemplo Pharmaceutical Salts and Co-crystals; Editors: Johan Wouters, Luc Quéré, RSC Publishing.

El grupo alquilo C₁-C₄ puede ser de cadenas ramificadas o rectas o grupos cíclicos, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, i-butilo, t-butilo, ciclopropilo, metilciclopropilo o ciclobutilo.

Algunos compuestos de fórmula (I) también pueden ser profármacos de las formas activas.

Otro objeto de la presente invención son dichos compuestos de fórmula general (I) para su uso como medicamentos, en particular para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca.

Otro objeto de la presente invención son las composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más de los compuestos de fórmula (I), opcionalmente en combinación con otros ingredientes terapéuticamente activos.

El encima y otros objetos de la invención presente ahora serán revelados en detalle también por medio de ejemplos y Figuras.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra los efectos del CVie 101 y del CVie 102 sobre la captación de Ca²⁺ por el RS. Los puntos de datos son la media ± SE. Efectos del CVie 101 (A-B) y CVie 102 (C-D) sobre la amplitud del transitorio de Ca²⁺ (CaT) y la constante de tiempo (τ) del decaimiento del CaT. Las diferencias entre las curvas CVie 101 o CVie 102 frente a CTRL fueron estadísticamente significativas (p<0,05) según el ANOVA de dos vías. En todos los protocolos N ≥ 13 para CVie 101 y N ≥ 11 para CVie 102.

La figura 2 muestra el efecto del CVie 101 sobre las características del potencial de acción (PA) a distintas frecuencias de estimulación (Hz). A) potencial de membrana diastólico (E_{diast}); B) velocidad máxima de subida del potencial de acción (dV/dt_{máx}); C) duración del potencial de acción (DPA) al 90 %, 50 % y 20 % de la repolarización; D) constante de tiempo de adaptación de la DPA (tau) tras un aumento escalonado de la velocidad de estimulación. CTRL= control. CTRL N=12; CVie 101 N=14. Las diferencias entre CTRL y CVie no fueron estadísticamente significativas en todos los parámetros.

La figura 3 muestra el efecto del CVie 101 sobre la dependencia de la variabilidad a corto plazo (VCP) de la DPA respecto a la DPA media. A-D) VCP representada como función de la DPA₉₀ media durante la estimulación en estado estacionario a 4 frecuencias (Hz); las líneas continuas son ajustes lineales de los puntos de datos; E) se agrupan los valores de VCP a todas las frecuencias de estimulación. CTRL= control. CTRL N=10, CVie 101 N=11

La figura 4 muestra la biodisponibilidad del CVie 101 en ratas

Descripción detallada de la invención

Dentro de los significados de la presente invención, el residuo carbocíclico de cinco miembros en la posición 17 β de la fórmula (I) de la reivindicación 2 se selecciona de ciclopentadienilo, ciclopentenilo, ciclopentilo.

10 Dentro de los significados de la presente invención, el residuo heterocíclico de cinco miembros en la fórmula (I) de la reivindicación 2 se selecciona de pirrolilo, tiofenilo, pirazolilo, imidazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, dioxolanilo, ditiolanilo, triazolilo, oxadiazolilo, tiadiazolilo, dioxazolilo, ditiolanilo, tetrazolilo, dioxolanilo, dioxolenilo, tiazolilo, isotiazolilo y todos sus derivados hidrogenados o parcialmente hidrogenados. Los grupos heterocíclicos pueden tener carácter aromático o no aromático y pueden unirse a la posición 17 por cualquier posición disponible en el anillo.

15 Dentro de los significados de la presente invención, el grupo alquilo C₁-C₄ en la fórmula (I) significa una cadena ramificada o recta o un grupo cíclico, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, i-butilo, t-butilo, ciclopropilo, metilciclopropilo o ciclobutilo.

En el sentido de la presente invención, una sal farmacéuticamente aceptable es una sal que retiene o mejora la actividad biológica o farmacocinética del compuesto de fórmula (I) y se deriva de ácidos farmacológicamente aceptables conocidos.

20 De acuerdo con una primera realización preferida de la presente invención, los compuestos de fórmula (I) de la reivindicación 1 son aquellos en los que el símbolo n es 0.

De acuerdo con una segunda realización preferida de la presente invención, expresada en la reivindicación 2, los compuestos de fórmula (I) son aquellos en los que el grupo heterociclo en posición 17 β se selecciona del grupo que consiste en imidazolilo, pirazolilo, tiazolilo, isoxazolilo, los correspondientes dihidro- y tetrahidroderivados (estos grupos son una característica esencial de los compuestos de la reivindicación 1, pero sólo preferidos para los compuestos de la reivindicación 2).

De acuerdo con una tercera realización preferida de la presente invención, los compuestos de fórmula (I) son aquellos en los que el grupo heterociclo se selecciona del grupo que consiste en imidazolilo, pirazolilo, tiazolilo, isoxazolilo y está sustituido por un amino(C₁-C₄) alquilo lineal o ramificado o guanidina.

30 De acuerdo con una cuarta realización preferida de la presente invención, los compuestos de fórmula (I) son aquellos en los que R es beta OH.

De acuerdo con una quinta realización preferida de la presente invención, los compuestos de fórmula (I) son aquellos en los que el símbolo n es 1 y hay un doble enlace.

35 De acuerdo con una sexta realización preferida de la presente invención, los compuestos de fórmula (I) son aquellos en los que el símbolo n es 1 y existe un enlace simple.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, los compuestos de fórmula (I) se seleccionan del grupo que consiste en:

3 β -hidroxi-5 β -10 β -metil-13 β -metil-14 β -hidroxi-17 β -(imidazol-4-il)androstano;

40 3 β -hidroxi-5 β -10 β -metil-13 β -metil-14 β -hidroxi-17 β -(2-guanidino-tiazol-4-il)androstano;

3 β -hidroxi-5 β -10 β -metil-12 β -hidroxi-13 β -metil-14 β -hidroxi-17 β -(imidazol-4-il)androstano;

3 β -hidroxi-5 β -10 β -metil-12 β -hidroxi-13 β -metil-14 β -hidroxi-17 β -(2-guanidino-tiazol-4-il)androstano;

3 β -hidroxi-5 β -10 β -metil-13 β -metil-14 β -hidroxi-17 β -(N-(3-aminopropil)-imidazol-4-il)androstano;

3 β -hidroxi-5 β -10 β -metil-13 β -metil-14 β -hidroxi-17 β -(pirazol-3-il)androstano;

45 3 β -hidroxi-5 β -10 β -metil-13 β -metil-14 β -hidroxi-17 β -((5-(3-aminopropil)-isoxazol-3-il))androstano;

3 β -hidroxi-5 β -10 β -metil-13 β -metil-14 β -hidroxi-17 β -((5-3-aminopropil)-isoxazol-3-il)-etil)androstano;

3 β -hidroxi-5 β -10 β -metil-13 β -metil-14 β -hidroxi-17 β -(5-(2-aminoetil)-isoxazol-3-il)-etil)androstano;

3 β -hidroxi-5 β -10 β -metil-13 β -metil-14 β -hidroxi-17 β -(5-(2-aminometil)-isoxazol-3-il)-etenil)androstano;

La invención proporciona además un proceso para la preparación de compuestos de fórmula general (I).

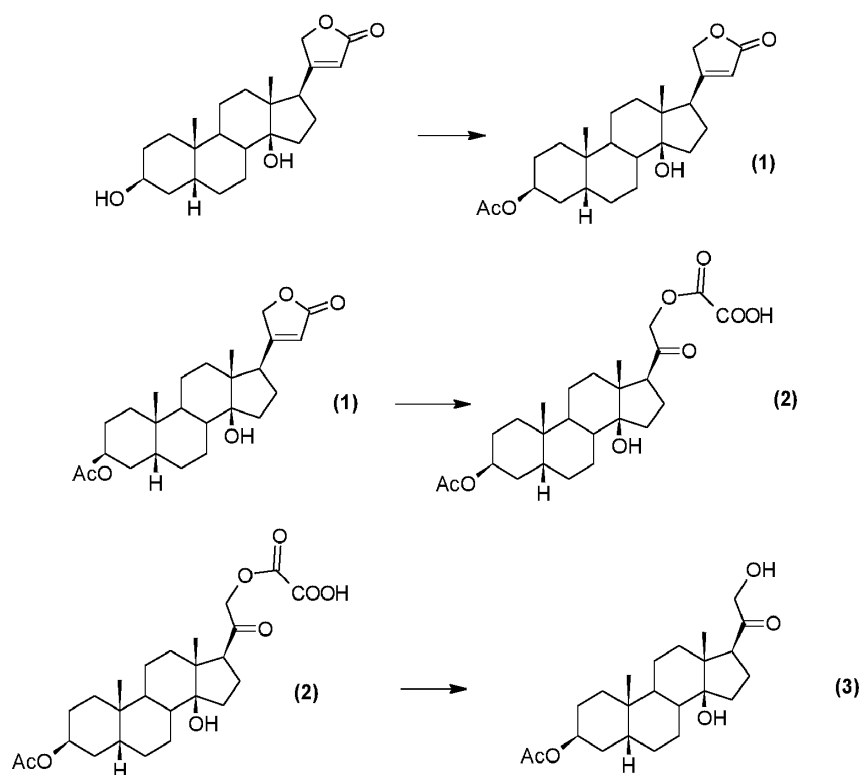
Otro objeto de la presente invención se relaciona con composiciones y formulaciones farmacéuticas y su uso para tratar, mejorar, revertir o disminuir los síntomas o prevenir la insuficiencia cardíaca aguda o crónica. Dado que la distribución intracelular defectuosa de Ca^{2+} desempeña un papel en el proceso de remodelación miocárdica, su corrección mediante la estimulación de SERCA2a puede contrarrestarlo. De este modo, puede prevenirse la evolución de una alteración inicial y compensada de la contractilidad a una insuficiencia cardíaca manifiesta.

Preparación de los compuestos de fórmula (I)

Generalmente, los compuestos de fórmula (I) en los que R es H se preparan a partir de digitoxigenina mientras que los compuestos de fórmula (I) en los que R es $\beta\text{-OH}$ se preparan a partir de digoxigenina.

Tanto la digitoxigenina como la digoxigenina son productos comerciales o pueden prepararse según procedimientos bien conocidos. Por ejemplo, la digoxigenina puede prepararse a partir de la digoxina.

Los compuestos de fórmula (I) en los que R es H pueden prepararse partiendo de digitoxigenina para llegar al intermedio (3).



La digitoxigenina se trata con un reactivo adecuado para proteger el grupo hidroxilo en la posición 3. Los grupos protectores adecuados son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, el 3-OH puede protegerse mediante acilación, por ejemplo acetilación, que es una reacción convencional. Por ejemplo, la digitoxigenina puede hacerse reaccionar con anhídrido acético en un disolvente orgánico, preferentemente un disolvente nitrogenado, como la piridina, preferentemente en atmósfera inerte, por ejemplo en atmósfera de Argón. Preferentemente se utiliza un catalizador de esterificación, como la 4-dimetilaminopiridina (DMAP) u otros catalizadores convencionales. La temperatura de reacción se controla y la reacción se lleva a cabo preferentemente a temperatura ambiente durante un tiempo suficiente para que la reacción se complete. A continuación, el disolvente se elimina por evaporación, preferentemente a presión reducida (es posible la coevaporación con otros disolventes). La elaboración de la reacción se realiza según procedimientos bien conocidos, por ejemplo tomando el residuo con agua y dejándolo a temperatura ambiente durante un tiempo conveniente. El sólido resultante puede recogerse, por ejemplo por filtración, lavarse con agua y secarse, preferentemente al vacío. El producto obtenido (1) puede utilizarse en los pasos siguientes sin necesidad de purificación adicional.

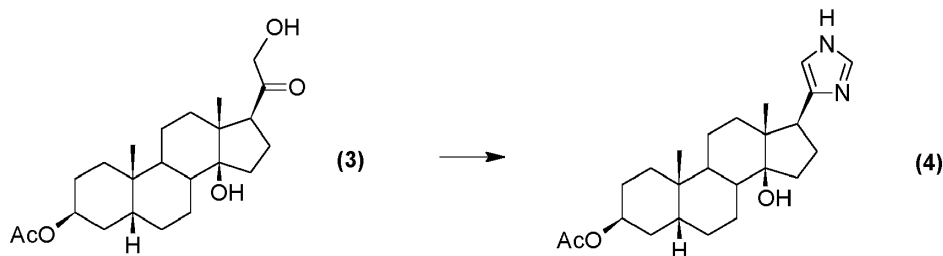
El intermedio (1) se somete entonces a una reacción de oxidación para abrir el anillo de lactona en 17- para dar el intermedio (2). Este tipo de reacción es bien conocida por el experto y puede consultarse en la literatura técnica. A modo de ejemplo, la sustancia intermedia (2) se disuelve en un disolvente orgánico, como la acetona, y se añade el agente oxidante. Por ejemplo, es conveniente una solución de NaIO_4 y RuO_2 hidrato en agua, aunque también pueden utilizarse otros agentes conocidos. Si es necesario, se pueden realizar más adiciones del agente oxidante. La temperatura de reacción no es limitante y puede determinarse en función de la naturaleza del agente oxidante. Una

vez que la reacción de oxidación se ha completado, cualquier exceso de agente oxidante se apaga de acuerdo con procedimientos bien conocidos. Por ejemplo, se puede utilizar isopropanol como agente de enfriamiento cuando se utiliza el sistema de NaIO_4 y RuO_2 hidratado. Cualquier sólido se separa de la mezcla de reacción, por ejemplo por filtración, el volumen de reacción se reduce preferentemente por evaporación, convenientemente a presión reducida y el residuo se extrae con un disolvente adecuado, como acetato de etilo (AcOEt). A continuación se lava la fase orgánica, preferentemente con salmuera, se seca de forma convencional, por ejemplo con MgSO_4 , se filtra si es necesario y se elimina el disolvente, por ejemplo al vacío. El intermedio **(2)** puede utilizarse en los pasos siguientes sin purificación adicional.

El intermedio **(3)** se obtiene hidrolizando en condiciones suaves el compuesto **(2)**, disuelto en un disolvente adecuado, por ejemplo en un alcohol, como el metanol, con, por ejemplo, KHCO_3 acuoso durante un tiempo suficiente para restablecer el alcohol primario en la posición 17. A continuación, se elimina el disolvente orgánico, preferentemente a presión reducida, y se extrae el residuo con un disolvente, como diclorometano. La fase orgánica se lava, por ejemplo con salmuera, luego se seca de manera convencional, se filtra si es necesario y se elimina el disolvente, preferentemente a presión reducida. El residuo se purifica según procedimientos bien conocidos, por ejemplo cromatografía instantánea (SiO_2) eluyendo con el eluyente apropiado (por ejemplo 7:3 ciclohexano/ AcOEt).

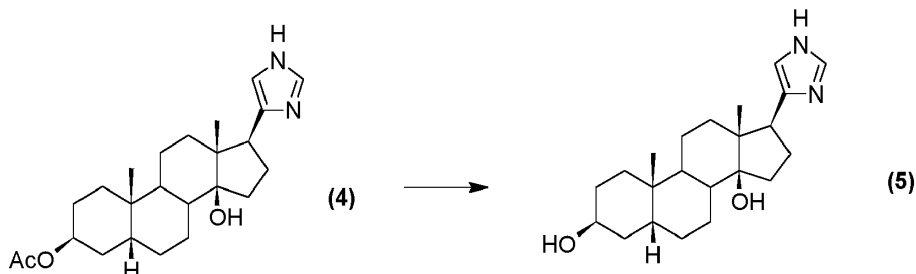
El compuesto **(3)** es el intermedio utilizado para preparar la mayoría de los compuestos 17 β -heterociclilo y carbociclilo de fórmula **(I)**. Dependiendo del producto final, es decir, del tipo de hetero- o carbociclilo a obtener en el compuesto final de fórmula **(I)**, el experto puede recurrir a los conocimientos generales comunes para encontrar la vía sintética adecuada, por ejemplo *Advanced Organic Chemistry Pt. B : Reactions and Synthesis* by Francis A. Carey and Richard J. Sundberg y *The Chemistry of Heterocycles: Structures, Reactions, Synthesis, and Applications*, Edition 3 by Theophil Eicher, Siegfried Hauptmann, Andreas Speicher.

A modo de ejemplo, para los compuestos de fórmula **(I)** en los que X es NH, es CH y Z es N, es decir, el heterociclilo es imidazolilo, el compuesto **(3)** se transforma en intermedio **(4)** según el esquema siguiente.



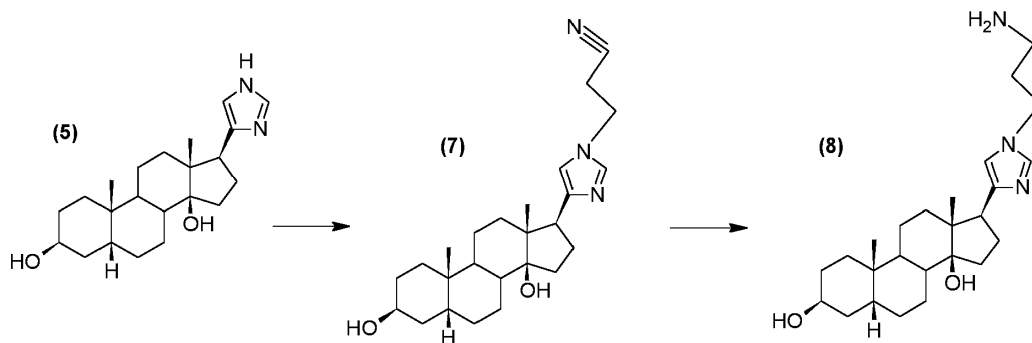
Generalmente, el compuesto **(3)** se disuelve en un disolvente orgánico, por ejemplo en un alcohol, como el etanol, y se trata con formaldehído. Convenientemente, se añade una solución de $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ en agua y amonio. La mezcla de reacción se calienta, preferentemente a reflujo, durante el tiempo suficiente para que se complete la reacción. A continuación se elimina el disolvente, preferentemente a presión reducida, y el residuo se disuelve en un disolvente orgánico, como AcOEt , y se lava repetidamente con salmuera. Se recogen las fases orgánicas y se extrae la fase acuosa con el mismo disolvente. Las fases orgánicas agrupadas se secan, por ejemplo sobre MgSO_4 , se filtran, preferentemente sobre una almohadilla de celita y se elimina el disolvente, preferentemente a presión reducida, obteniéndose 13,34 g (96 %) de **(4)** como sólido, que se utiliza en la etapa siguiente sin purificación adicional.

Por último, el producto intermedio **(4)** se convierte en el producto final restaurando el grupo 3-hidroxi mediante procedimientos convencionales, de acuerdo con el siguiente esquema



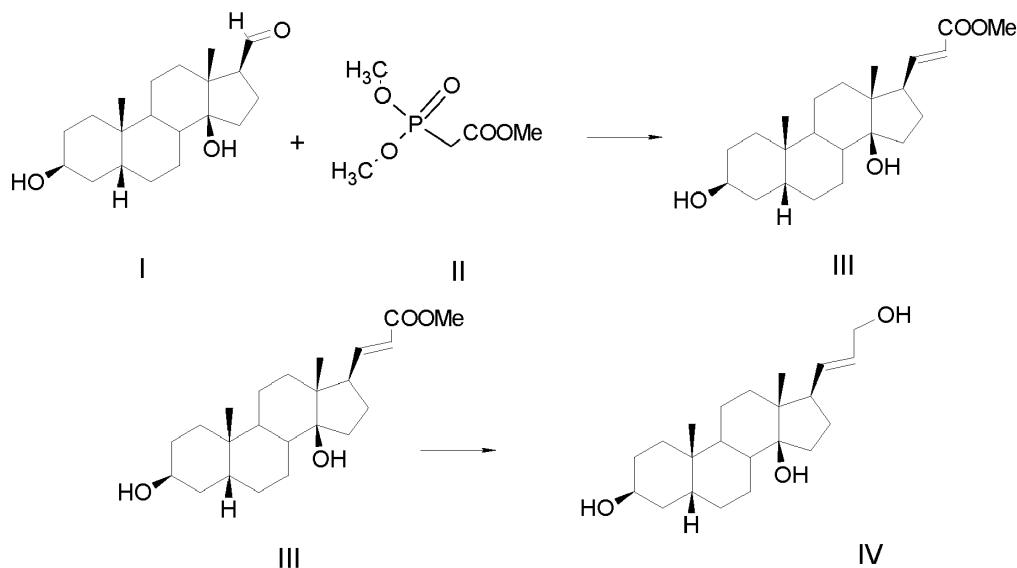
Generalmente, el compuesto **(4)** se disuelve en un disolvente orgánico, como un alcohol, por ejemplo metanol, y se añade un agente hidrolizante, por ejemplo NaOH . Se deja que la reacción se complete. El tiempo de reacción y la temperatura los determina el experto, por ejemplo, la temperatura ambiente es conveniente. El disolvente se elimina, preferentemente a presión reducida, y el residuo se diluye con agua y se extrae con un disolvente orgánico, como diclorometano. La fase orgánica se seca, por ejemplo sobre MgSO_4 , se filtra y se elimina el disolvente, preferentemente al vacío, obteniéndose el producto final **(5)**. Si se desea, el compuesto final puede convertirse con procedimientos convencionales en una sal farmacéuticamente aceptable.

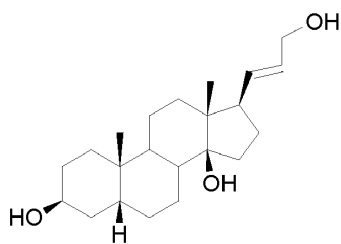
A modo de ejemplo, para compuestos de fórmula (I) en los que X es NH, es CH y Z es N, es decir, el heterociclo es imidazolilo sustituido con amino (C₁-C₄) alquilo, el compuesto (3) se transforma en el intermedio pertinente (4) según el esquema descrito anteriormente, pero seleccionando el reactivo adecuado en lugar de formamida y modificando las condiciones de reacción en consecuencia, como es bien sabido por el experto. En caso de que el compuesto final de fórmula (I) lleve el grupo amino (C₁-C₄) alquilo en el nitrógeno 1-N del residuo imidazolilo, el compuesto (5) se trata según el esquema siguiente, aquí mostrado para el caso ejemplar del derivado N-(3-aminopropil):



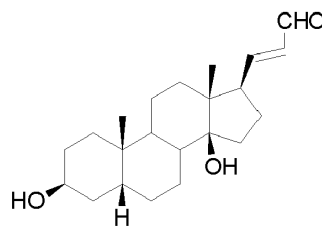
El compuesto (5) se disuelve en un disolvente orgánico adecuado, por ejemplo dimetilsulfóxido (DMSO), en presencia de una base fuerte, por ejemplo K₂CO₃. Se añade acrilonitrilo y la reacción se lleva a cabo a una temperatura adecuada, por ejemplo temperatura ambiente, durante un tiempo suficiente para que se complete la reacción. El experto puede seleccionar fácilmente el nitrilo ε-insaturado adecuado en función de la longitud de la cadena alquílica. Al finalizar la reacción, se añade agua y la mezcla se extrae con un disolvente orgánico adecuado, por ejemplo acetato de etilo, la fase orgánica se seca como de costumbre, por ejemplo sobre Na₂SO₄, se filtra y el disolvente se elimina, preferentemente a presión reducida, dando el intermedio (7), utilizado en la etapa siguiente sin más purificación. Por último, el grupo nitrilo se reduce a grupo amino según procedimientos bien conocidos. Por ejemplo, el producto (7) se disuelve en un disolvente orgánico, por ejemplo tetrahidrofurano (THF), preferentemente el disolvente es anhidro. Se añade un agente reductor, como LiAlH₄, y la mezcla se calienta, preferentemente a reflujo, durante un tiempo suficiente para completar la reacción. Posteriormente, la solución enfriada se diluye con el mismo disolvente de reacción, u otro disolvente conveniente y agua, y se añade una solución de una base, como NaOH, para precipitar un sólido. El sólido se aísla, por ejemplo por filtración y lavado con un disolvente, y el producto sólido aislado se purifica según procedimientos convencionales, por ejemplo mediante cromatografía instantánea (SiO₂) eluyendo con un sistema eluyente adecuado, por ejemplo CHCl₃/MeOH/NH₃ 9/1/0,1 dando el producto (8).

A modo de ejemplo, para los compuestos de fórmula (I) en los que X es CH, es NH y Z es N, es decir, el heterociclo es pirazolilo, el compuesto (I) se transforma en intermedio (V) según el esquema siguiente.





IV



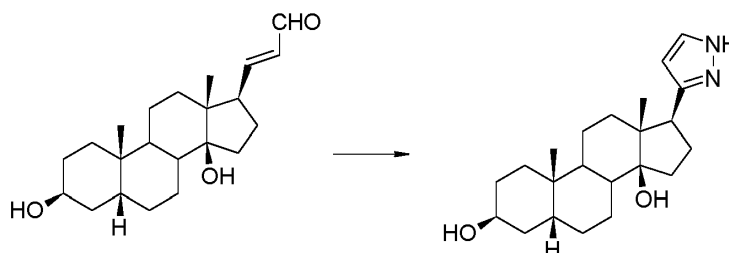
V

El aldehído (I) es bien conocido y su preparación se describe en Gobbini et al. Synth Comm, 27(6), 1115-1122 (1997).

El aldehído (I) se transforma en el derivado (III) según procedimientos bien conocidos. Por ejemplo, a una suspensión de NaH (típicamente 55 % disperso en aceite mineral) en un disolvente anhidro, como THF, se añade gota a gota Trimetil Fosfonoacetato (II), a 0°C, bajo atmósfera inerte. La suspensión se deja a temperatura ambiente durante un tiempo conveniente, por ejemplo 30 minutos, y después se enfría a 0°C. Se añade el aldehído (I), disuelto en un disolvente orgánico seco, preferentemente el mismo disolvente de la mezcla anterior, y se deja la mezcla hasta completar la reacción, por ejemplo a temperatura ambiente. Posteriormente se añade un disolvente orgánico, por ejemplo EtOAc, se transfiere la mezcla a una solución de NaH₂PO₄ (normalmente 5 % en agua) y se extrae con el mismo disolvente. Las fases orgánicas agrupadas se concentran hasta sequedad, preferentemente a presión reducida. El residuo sólido se suspende en agua y se mantiene agitando durante algún tiempo, se filtra y se disuelve en disolvente orgánico, por ejemplo AcOEt y diclorometano, después se seca como de costumbre, se filtra y se elimina el disolvente, preferentemente a presión reducida, dando el intermedio (III), **que** se utiliza en el siguiente paso de reducción del éster a alcohol sin más purificación. La reducción de ésteres a alcoholes es bien conocida y el experto dispone de muchos procedimientos. Por ejemplo, a una solución del compuesto (III) en disolvente orgánico seco, por ejemplo THF, bajo atmósfera inerte, a -78°C, se añade hidruro de diisobutilaluminio (DIBAH) puro y se lleva la reacción hasta su finalización. Después de enfriar a -78°C, se añade una solución ácida suave (típicamente ácido cítrico al 13 % en agua) y se hace reaccionar durante un tiempo suficiente, después se añade una sal inorgánica neutra adicional para facilitar la separación de las fases, por ejemplo NaCl, y se lava la fase acuosa con un disolvente orgánico, como EtOAc. Las fases orgánicas agrupadas se lavan con una solución acuosa básica suave, como por ejemplo una solución de NaHCO₃ (por ejemplo al 5 %), se secan como de costumbre, se filtran y se elimina el disolvente, preferentemente a presión reducida, obteniéndose el intermedio (IV), **que** se utiliza en la etapa siguiente sin más purificación. El siguiente paso es una oxidación convencional de un alcohol a aldehído. Por ejemplo, a una solución del compuesto (IV) en un disolvente orgánico adecuado, como dioxano, se añade MnO₂ y se agita la suspensión durante un tiempo suficiente, normalmente a temperatura ambiente. La mezcla se filtra para eliminar los metales, por ejemplo sobre una almohadilla de celita, que se lava con un disolvente orgánico, como AcOEt. Los disolventes se eliminan, preferentemente a presión reducida, y el residuo puede cristalizarse con un medio de cristalización adecuado, por ejemplo éter dietílico, para dar el compuesto (V).

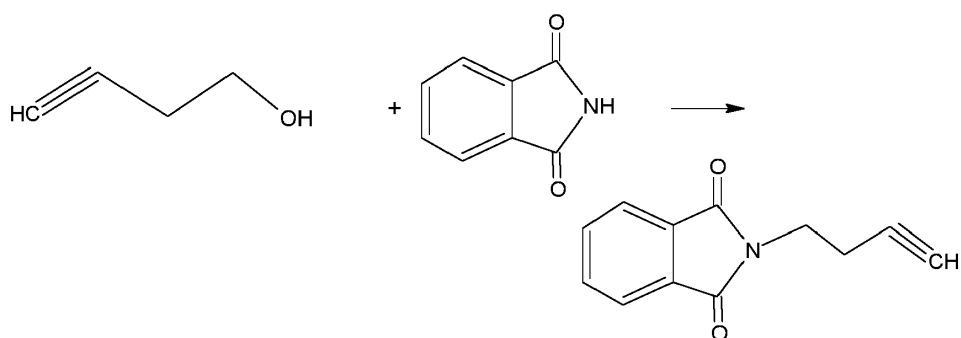
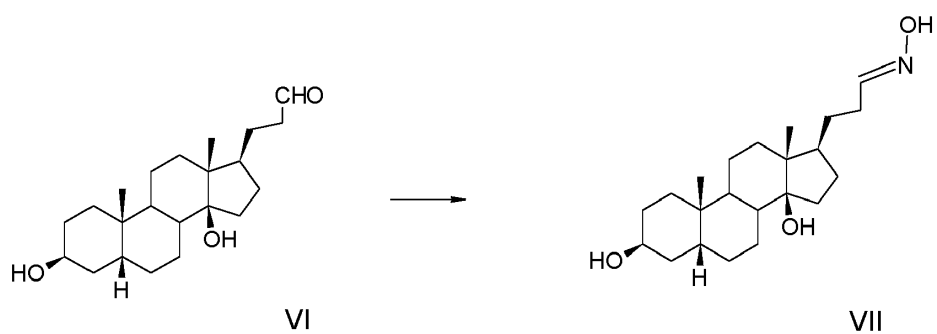
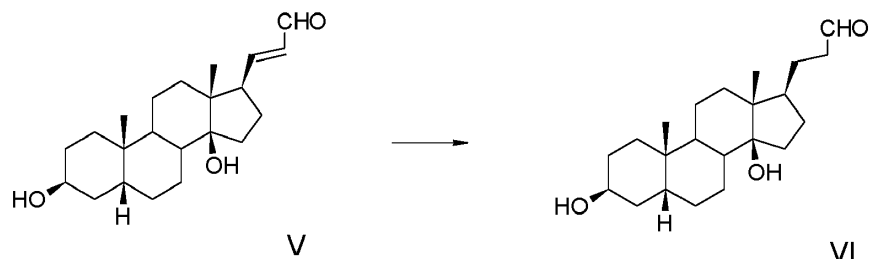
Como se divulga posteriormente, el intermedio (V) puede usarse como compuesto de partida para preparar compuesto de fórmula (I) con una variedad de residuos de heterociclo.

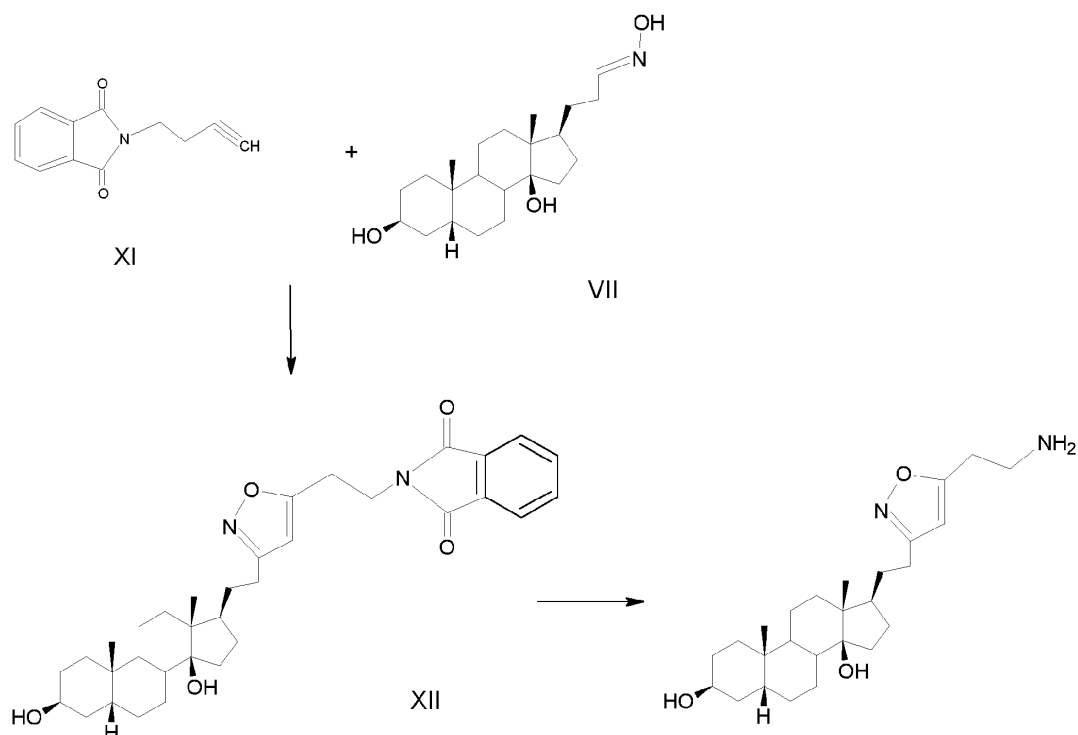
Para la preparación del compuesto de fórmula (I), en el que el pirazol es el heterociclo, puede seguirse el siguiente esquema de reacción.



A una solución del compuesto (V) en un medio de reacción adecuado, por ejemplo Ácido Acético, se añade p-Toluenesulfonyl hidrazida. La mezcla de reacción se deja durante un tiempo suficiente a una temperatura adecuada, por ejemplo temperatura ambiente, y luego se diluye con una solución de Na₂HPO₄ (normalmente 5 % en agua). La suspensión se filtra, el sólido se seca, preferentemente a presión reducida, y se solubiliza en un disolvente, por ejemplo dimetilformamida (DMF), añadiendo una base fuerte estéricamente impedida, como terc-butoxido potásico. La reacción se lleva a término, por ejemplo partiendo de temperatura ambiente, luego se calienta, por ejemplo a 80°C, luego se vierte en agua y se extrae con un disolvente adecuado, por ejemplo éter dietílico. Las fases orgánicas agrupadas se secan como de costumbre, se filtran y se elimina el disolvente, preferentemente a presión reducida. El residuo se purifica por procedimientos convencionales, por ejemplo cromatografía instantánea (SiO₂) con un sistema de eluyente adecuado (por ejemplo CH₂Cl₂/Acetona 7/3 como eluyente) para dar el producto final.

El mismo compuesto (**V**) puede utilizarse para obtener otros sistemas heterociclo, por ejemplo, compuestos de fórmula (**I**) en los que el heterociclo es isoxazol, a saber, en los que X es CH, en particular CH sustituido con un alquilo amino (C₁-C₄), es O y Z es N. En el presente documento se proporciona un procedimiento ejemplar de acuerdo con el siguiente esquema:

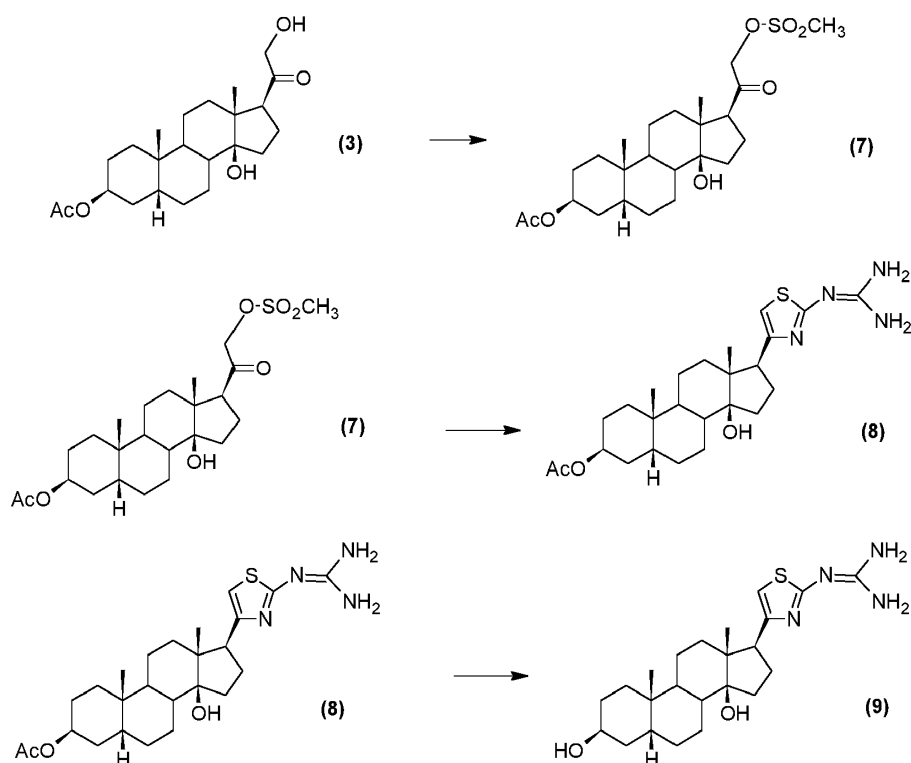




El compuesto (V) se somete a una hidrogenación de doble enlace según los procedimientos convencionales. Por ejemplo, a una solución del producto (V) en un medio de reacción adecuado, por ejemplo EtOAc, se añade un catalizador de hidrogenación, por ejemplo Pd/C (5 %), y la mezcla se mantiene bajo hidrógeno, típicamente a presión atmosférica y temperatura ambiente, durante un tiempo suficiente. Una vez finalizada la reacción, se filtra el catalizador, por ejemplo sobre una almohadilla de celita, y el filtrado se concentra hasta sequedad, preferentemente a presión reducida, obteniéndose el producto (VI). A continuación, el aldehído (VI) se convierte en oxima (VII) según los procedimientos convencionales. Por ejemplo, a una solución del compuesto (VI) en un medio de reacción, por ejemplo dioxano, se añaden hidrocloreuro de hidroxilamina y NaOH. La reacción se lleva a término, puede hacerse a temperatura ambiente, se elimina el disolvente, preferentemente a presión reducida y se extrae con un disolvente, por ejemplo CHCl_3 . La fase orgánica se concentra hasta sequedad, preferentemente a presión reducida, dando el producto (VII).

El alquino (XI) se prepara según la longitud deseada de la cadena alquímica, como se indica en la fórmula (I). En la realización ejemplar mostrada en el esquema anterior, en la que el alquino tiene dos grupos metileno, a una solución de 3-butin-1-ol en un disolvente seco, como THF, se añaden PPh_3 y Ftalimida, a 0°C . se añade solución de 1,2-etoxicarbonil diazeno (DEAD) a la solución anterior y se deja la mezcla hasta que se complete la reacción, entonces se elimina el disolvente, preferentemente a presión reducida, y se purifica el residuo por procedimientos convencionales, por ejemplo por cromatografía instantánea (SiO_2) en un eluyente adecuado (por ejemplo Heptano/éter dietílico 9/1) para dar el producto (XI). El alquino (XI) se hace reaccionar con la oxima (VII). A una suspensión de (VII) en disolvente orgánico, por ejemplo cloroformo que contiene 0,5 % de piridina, se añade N-clorosuccinimida y la reacción se lleva a cabo en atmósfera inerte (N_2). Se añade una solución de alquino (XI) en disolvente orgánico, por ejemplo cloroformo que contenga trimetilamina (TEA), y se lleva la reacción a su fin, por ejemplo a temperatura ambiente, se diluye con disolvente orgánico, preferentemente el mismo disolvente y se lava con agua. El disolvente se elimina hasta sequedad, preferentemente a presión reducida, y el residuo se purifica por procedimientos convencionales, por ejemplo cromatografía instantánea (SiO_2) en sistema eluyente adecuado (por ejemplo ciclohexano/acetona/cloroformo 7/2/2) para dar el producto (XII). Por último, el producto final deseado se obtiene tratando el compuesto (XII) con hidrocloreuro de hidracina en un disolvente, por ejemplo etanol, preferentemente a reflujo hasta la terminación de la reacción. La mezcla se diluye con agua, se elimina el disolvente, preferentemente a presión reducida, y la parte acuosa residual se extrae con disolvente orgánico, por ejemplo CH_2Cl_2 . La fase orgánica se lleva a sequedad, preferentemente a presión reducida, y el residuo se purifica por procedimientos convencionales, por ejemplo cromatografía instantánea (SiO_2) (diluyente ejemplar $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ 95/5/0,5) para dar el producto final.

En la realización ejemplar de compuestos de fórmula (I) en los que está presente un grupo guanidina, puede seguirse el siguiente esquema, partiendo del intermedio (3).



A una solución del producto **(3)** en disolvente anhidro, por ejemplo diclorometano, se añade trietilamina o un agente equivalente. La solución se enfría, por ejemplo a 5°C, y se añade cloruro de metanosulfonilo, u otro grupo saliente conocido, y la solución se mantiene a la misma temperatura de enfriamiento durante un tiempo suficiente, y después a temperatura ambiente durante un tiempo adicional hasta la finalización de la reacción. La solución se diluye con el disolvente y se lava con una solución de NaHCO₃ o equivalente. La fase acuosa se extrae con disolvente orgánico, por ejemplo diclorometano, y las fases orgánicas agrupadas se lavan con agua. La fase acuosa se extrae de nuevo con disolvente de extracción y las fases orgánicas agrupadas se secan como de costumbre, eliminándose el disolvente, preferentemente a presión reducida, dando el intermedio **(7)**, utilizado en el paso siguiente sin más purificación. A una disolución orgánica del intermedio **(7)**, por ejemplo Acetona, se le añade 2-Imino-4-tiobiuret. La reacción se lleva a cabo, preferentemente a reflujo, hasta la terminación de la reacción, comprobada por procedimientos convencionales, como la cromatografía en capa fina (TLC). Después de enfriar a temperatura ambiente, se deja reposar la reacción durante un tiempo adicional, comprobando la finalización de la reacción. Se filtra el sólido y se elimina el disolvente, preferentemente a presión reducida. El residuo sólido se absorbe con disolvente orgánico, por ejemplo diclorometano, y agua. La fase acuosa se extrae, el disolvente y las fases orgánicas agrupadas se secan como de costumbre, se filtran y el disolvente se elimina, preferentemente al vacío, dando el producto intermedio **(8)**, que se purifica por procedimientos convencionales, por ejemplo cromatografía instantánea (SiO₂) (eluyente ejemplar ciclohexano/acetato de etilo 1/1 + 1 % de TEA - acetato de etilo 99 % + 1 % de TEA) para dar el producto **(8)**. Se añade NaOH o un agente equivalente a una solución de **(8)** en un disolvente, como por ejemplo MeOH. La reacción se lleva a cabo, preferentemente, a temperatura ambiente y, a continuación, se elimina el disolvente. El residuo se lava con agua y se filtra. El sólido del filtro se lava con más agua y se purifica por cristalización con un medio de cristalización adecuado, por ejemplo EtOH/agua. El sólido se disuelve en disolvente orgánico, por ejemplo EtOH, normalmente a temperatura ambiente y se añade agua, la mezcla se deja recristalizar. El sólido se recupera por filtración y se obtiene el producto **(9)**.

Para el compuesto de fórmula **(I)** en el que R es beta-OH, los esquemas sintéticos descritos anteriormente se llevan a cabo a partir de digoxigenina en lugar de digitoxigenina. En este caso, la reacción inicial para la protección hidroxilica del OH se realiza para las posiciones 3- y 12-.

Los compuestos de fórmula **(I)** pueden prepararse recurriendo a los conocimientos generales comunes de los expertos en síntesis orgánica. Todos los productos de partida, reactivos, medios de reacción, catalizadores y cualquier otro material están disponibles comercialmente o pueden prepararse según los procedimientos descritos en la bibliografía. Las fuentes de conocimiento son bien conocidas y comprenden literatura científica, libros de texto, manuales, bases de datos y proveedores de servicios; véase, por ejemplo, www.cas.org.

Para la preparación de los compuestos de fórmula **(I)** puede utilizarse una síntesis alternativa. Las reacciones aquí descritas pueden variarse, modificando sus reactivos, materiales y condiciones, así como los procedimientos de aislamiento y purificación de los productos finales. Los tiempos de reacción y las temperaturas pueden ser

seleccionados por el experto según su experiencia y conocimientos generales. Si se desea, pueden adoptarse Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) y Buenas Prácticas de Fabricación (BPF) en función de los requisitos de pureza que se deseen. Los materiales son preferentemente de pureza, alta pureza o grado farmacéutico. Los procedimientos analíticos son los utilizados convencionalmente en química orgánica, como por ejemplo la cromatografía, la espectroscopia y cualquier otra técnica adecuada.

En la discusión de las composiciones farmacéuticas y usos médicos de los compuestos reivindicados como se da a continuación, cualquier referencia al uso de los compuestos reivindicados en terapia como parte de la presente invención debe interpretarse como referida a los compuestos de la presente invención para su uso en esos mismos procedimientos terapéuticos.

Composiciones farmacéuticas

Las composiciones y formulaciones farmacéuticas comprenden uno o más de los compuestos de fórmula (I) aquí divulgados en mezcla con al menos un portador y/o vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable convencional.

Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse por vía parenteral, tópica, subcutánea, intramuscular, oral o por administración local, como por aerosol o transdérmica. Se prefieren las composiciones farmacéuticas de administración enteral, en particular las de administración oral.

Las composiciones farmacéuticas pueden formularse de cualquier manera y pueden administrarse en una variedad de formas de dosificación unitarias dependiendo de la afección o enfermedad y el grado de enfermedad, la condición médica general de cada paciente, el procedimiento de administración preferido resultante y similares. Los detalles sobre las técnicas de formulación y administración están bien descritos en la literatura científica y de patentes; véase, por ejemplo, la última edición de Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co, Easton PA ("Remington's").

Los compuestos de fórmula (I) como agentes terapéuticos pueden administrarse solos o como componente de una formulación farmacéutica (composición). Los compuestos pueden formularse para su administración de cualquier forma conveniente para su uso en medicina humana o veterinaria. También pueden estar presentes en las composiciones agentes humectantes, emulsionantes y lubricantes, como lauril sulfato sódico y estearato de magnesio, así como colorantes, agentes desmoldeantes, agentes de recubrimiento, edulcorantes, aromatizantes y perfumantes, tampones, conservantes y antioxidantes.

Las formulaciones de las composiciones según la presente invención incluyen las adecuadas para la administración oral/nasal, sublingual, tópica, parenteral - por ejemplo mediante inyección intramuscular o intravenosa - rectal y/o intravaginal. Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse por cualquier procedimiento bien conocido en el arte de la farmacia. La cantidad de principio activo que puede combinarse con un material de soporte para producir una única forma de dosificación variará en función del sujeto tratado y del modo de administración concreto. La cantidad de principio activo que puede combinarse con un material de soporte para producir una única forma de dosificación será generalmente aquella cantidad del compuesto que produzca un efecto terapéutico.

Las formulaciones farmacéuticas aquí previstas pueden prepararse según cualquier procedimiento conocido en la técnica de fabricación de productos farmacéuticos. Estas fórmulas pueden contener edulcorantes, aromatizantes, colorantes y conservantes. Una formulación puede ser adicionada con excipientes no tóxicos farmacéuticamente aceptables que sean adecuados para la fabricación. Las formulaciones pueden comprender uno o más diluyentes, emulsionantes, conservantes, tampones, excipientes, etc., y pueden presentarse en forma de líquidos, polvos, emulsiones, polvos liofilizados, aerosoles, cremas, lociones, formulaciones de liberación controlada, comprimidos, píldoras, geles, en parches, en implantes, etc.

Las formulaciones farmacéuticas para administración oral pueden formularse utilizando portadores farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica en dosis apropiadas y adecuadas. Dichos soportes permiten que los productos farmacéuticos se formen en formas de dosificación unitarias como comprimidos, gélulas, píldoras, polvos, grageas, cápsulas, líquidos, pastillas, geles, jarabes, lechadas, suspensiones, etc., adecuadas para su ingestión por el paciente. Las preparaciones farmacéuticas para uso oral pueden formularse como un excipiente sólido, moliendo opcionalmente una mezcla resultante, y procesando la mezcla de gránulos, tras añadir compuestos adicionales adecuados, si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Los excipientes sólidos adecuados son rellenos de carbohidratos o proteínas, por ejemplo, azúcares, como lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; almidón de maíz, trigo, arroz, patata u otras plantas; celulosa, como metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa o carboximetilcelulosa sódica; y gomas, como arábica y tragacanto; y proteínas, por ejemplo, gelatina y colágeno. Pueden añadirse agentes desintegradores o solubilizantes, como la polivinilpirrolidona reticulada, el agar, el ácido alginico o una sal del mismo, como el alginato sódico.

Los núcleos de grageas están provistos de recubrimientos adecuados, como soluciones concentradas de azúcar, que también pueden contener goma arábica, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol y/o dióxido de titanio, soluciones de laca y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolventes. Pueden añadirse colorantes o

pigmentos a los comprimidos o a los recubrimientos de las grageas para identificar el producto o para caracterizar la cantidad de compuesto activo (es decir, la dosis). Las preparaciones farmacéuticas utilizadas para los usos y procedimientos aquí previstos también pueden administrarse por vía oral utilizando, por ejemplo, cápsulas de gelatina con cierre a presión, así como cápsulas blandas y selladas de gelatina y un recubrimiento como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de encaje a presión pueden contener agentes activos mezclados con un relleno o aglutinantes como lactosa o almidones, lubricantes como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizantes. En las cápsulas blandas, los agentes activos pueden disolverse o suspenderse en líquidos adecuados, como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicol líquido con o sin estabilizantes.

Las suspensiones acuosas pueden contener un agente activo (por ejemplo, una composición utilizada para poner en práctica los usos y procedimientos aquí previstos) en mezcla con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Dichos excipientes incluyen un agente de suspensión, como carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato sódico, polivinilpirrolidona, goma tragacanto y goma acacia, y agentes dispersantes o humectantes como un fosfátido natural (por ejemplo, lecitina), un producto de condensación de un óxido de alquileno con un ácido graso (por ejemplo estearato de polioxietileno), un producto de condensación de óxido de etileno con un alcohol alifático de cadena larga (por ejemplo, heptadecaetilenol oxietanol), un producto de condensación de óxido de etileno con un éster parcial derivado de un ácido graso y un hexitol (por ejemplo, monooleato de sorbitol polioxietilenado), o un producto de condensación de óxido de etileno con un éster parcial derivado de un ácido graso y un anhídrido de hexitol (por ejemplo, monooleato de sorbitán polioxietilenado). La suspensión acuosa también puede contener uno o más conservantes, como p-hidroxibenzoato de etilo o n-propilo, uno o más colorantes, uno o más aromatizantes y uno o más edulcorantes, como sacarosa, aspartamo o sacarina, o eritritol o rebaudiósido A. Las formulaciones pueden ajustarse en función de la osmolaridad.

Los productos farmacéuticos a base de aceite son particularmente útiles para la administración de agentes activos hidrófobos utilizados para practicar los usos y procedimientos aquí previstos. Las suspensiones a base de aceite pueden formularse suspendiendo un agente activo en un aceite vegetal, como el aceite de arachis, el aceite de oliva, el aceite de sésamo o el aceite de coco, o en un aceite mineral como la parafina líquida; o en una mezcla de éstos. Véase, por ejemplo Patente estadounidense nº 5.716.928 en la que se describe el uso de aceites esenciales o componentes de aceites esenciales para aumentar la biodisponibilidad y reducir la variabilidad interindividual e intraindividual de compuestos farmacéuticos hidrófobos administrados por vía oral (véase también la patente de los EE.UU. nº 5.858.401). Las suspensiones de aceite pueden contener un agente espesante, como cera de abeja, parafina dura o alcohol cetílico. Pueden añadirse agentes edulcorantes para proporcionar una preparación oral palatable, como glicerol, sorbitol o sacarosa, o eritritol o rebaudiósido A. Estas formulaciones pueden conservarse mediante la adición de un antioxidante como el ácido ascórbico. Como ejemplo de vehículo oleoso inyectable, véase Minto (1997) J. Pharmacol. Exp. Ther. 281:93-102. Las formulaciones farmacéuticas aquí previstas también pueden presentarse en forma de emulsiones de aceite en agua. La fase oleosa puede ser un aceite vegetal o un aceite mineral, descritos anteriormente, o una mezcla de los mismos. Entre los agentes emulsionantes adecuados se incluyen gomas naturales, como la goma acacia y la goma tragacanto, fosfátidos naturales, como la lecitina de soja, ésteres o ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, como el monooleato de sorbitán, y productos de condensación de estos ésteres parciales con óxido de etileno, como el monooleato de sorbitán polioxietilenado. La emulsión también puede contener agentes edulcorantes y aromatizantes, como en la formulación de jarabes y elixires. Dichas formulaciones también pueden contener un demulcente, un conservante o un colorante.

De acuerdo con la presente invención, los compuestos farmacéuticos también pueden administrarse por vía intranasal, intraocular e intravaginal, incluidos supositorios, insuflaciones, polvos y formulaciones en aerosol (para ejemplos de inhalantes de esteroides, véase Rohatagi (1995) J. Clin. Pharmacol. 35:1187-1193; Tjwa (1995) Ann. Allergy Asthma Immunol. 75:107-111). Las formulaciones para supositorios pueden prepararse mezclando el fármaco con un excipiente no irritante adecuado que sea sólido a temperaturas normales pero líquido a temperaturas corporales y que, por tanto, se funda en el cuerpo para liberar el fármaco. Tales materiales son la manteca de cacao y los polietilenglicoles.

De acuerdo con la presente invención, los compuestos farmacéuticos pueden administrarse por vía transdérmica, por vía tópica, formulados como bastoncillos aplicadores, soluciones, suspensiones, emulsiones, geles, cremas, ungüentos, pastas, jaleas, pinturas, polvos y aerosoles.

De acuerdo con la presente invención, los compuestos farmacéuticos de fórmula (I) pueden administrarse por inhalación; por ejemplo, en realizaciones alternativas los compuestos de fórmula (I) para inhalación se preparan para dispersión seca, por ejemplo, secando por pulverización una solución que contiene el ingrediente activo, es decir, el compuesto de fórmula (I), por ejemplo, usando procedimientos como los descritos en Patentes estadounidenses 6.509.006; 6.592.904; 7.097.827 y 6.358.530. Los excipientes en polvo seco ejemplares incluyen carbohidratos o polipéptidos de bajo peso molecular que se mezclan con el compuesto de fórmula (I) para ayudar a la dispersión. En realizaciones alternativas, los tipos de excipientes farmacéuticos que son útiles como portadores para la dispersión de polvo seco incluyen estabilizadores como la albúmina de suero humano (HSA), que también es un agente de dispersión útil, agentes de carga como carbohidratos, aminoácidos y polipéptidos; ajustadores de pH o tampones; sales como cloruro de sodio; y similares. Estos portadores pueden estar en forma cristalina o amorfa o ser una mezcla de ambas. Los dispositivos que pueden utilizarse para suministrar formulaciones en polvo o aerosol incluyen los descritos, por ejemplo, en Patentes estadounidenses 5.605.674; 7,097,827.

De acuerdo con la presente invención, los compuestos farmacéuticos también pueden administrarse como nanopartículas o microesferas para su liberación lenta en el organismo. Por ejemplo, las nanopartículas o microesferas pueden administrarse mediante inyección intradérmica o subcutánea del fármaco que se libera lentamente por vía subcutánea; véase Rao (1995) *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 7:623-645; como formulaciones de gel biodegradables e inyectables, véase, por ejemplo Gao (1995) *Pharm. Res.* 12:857-863 (1995); o, como microesferas para administración oral, véase, por ejemplo Eyles (1997) *J. Pharm. Pharmacol.* 49:669-674.

De acuerdo con la presente invención, los compuestos farmacéuticos de fórmula (I) pueden administrarse parenteralmente, como por administración intramuscular (IM) o intravenosa (IV) o administración en una cavidad corporal o lumen de un órgano. Estas formulaciones pueden comprender una solución de agente activo disuelta en un portador farmacéuticamente aceptable. Los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse son agua, dextrosa en agua y solución de Ringer, un cloruro sódico isotónico. Además, pueden emplearse aceites fijos estériles como disolvente o medio de suspensión. Para ello, puede emplearse cualquier aceite fijo insípido, incluidos los mono o diglicéridos sintéticos. Además, los ácidos grasos como el ácido oleico también pueden utilizarse en la preparación de inyectables. Estas soluciones son estériles y generalmente están libres de materias indeseables. Estas formulaciones pueden esterilizarse mediante técnicas de esterilización convencionales y bien conocidas. Las formulaciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables, según se requiera para aproximarse a las condiciones fisiológicas, como agentes reguladores y tamponadores del pH, agentes reguladores de la toxicidad, por ejemplo, acetato sódico, cloruro sódico, cloruro potásico, cloruro cálcico, lactato sódico y similares. La concentración de agente activo en estas formulaciones puede variar ampliamente, y se seleccionará principalmente en función de los volúmenes de fluidos, viscosidades, peso corporal y similares, de acuerdo con el modo de administración particular seleccionado y las necesidades del paciente. Para la administración IV, la formulación puede ser una preparación inyectable estéril, como una suspensión acuosa u oleaginosa inyectable estéril. Esta suspensión puede formularse utilizando aquellos agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una suspensión en un diluyente o disolvente no tóxico aceptable para los padres, como una solución de 1,3-butanodiol. La administración puede ser en bolo o en infusión continua (por ejemplo, introducción sustancialmente ininterrumpida en un vaso sanguíneo durante un periodo de tiempo determinado).

Los compuestos farmacéuticos y las formulaciones aquí previstas pueden liofilizarse. Se proporciona una formulación liofilizada estable que comprende una composición tal como se proporciona en el presente documento, que puede hacerse liofilizando una solución que comprende un producto farmacéutico tal como se proporciona en el presente documento y un agente de carga, por ejemplo, manitol, trehalosa, rafinosa y sacarosa o mezclas de los mismos. Existen muchos otros agentes liofilizantes convencionales. Entre los azúcares, la lactosa es el más común. También se utilizan ácido cítrico, carbonato sódico, EDTA, alcohol bencílico, glicina, cloruro sódico, etc. (véase por ejemplo *Journal of Excipients and Food Chemistry Vol. 1, Issue 1 (2010) pp 41-54*; Patente de EE.UU. nº 20040028670).

De acuerdo con la presente invención, los compuestos de fórmula (I) aquí proporcionados pueden administrarse para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos. En las aplicaciones terapéuticas, las composiciones se administran a un sujeto que ya padece una afección o enfermedad en una cantidad suficiente para curar, aliviar o detener parcialmente las manifestaciones clínicas de la afección o enfermedad y sus complicaciones (una "cantidad terapéuticamente eficaz"). Por ejemplo, en realizaciones alternativas, las composiciones farmacéuticas tal como se proporcionan en el presente documento se administran en una cantidad suficiente para tratar, prevenir o mejorar en un individuo que lo necesite. La cantidad de composición farmacéutica adecuada para conseguirlo se define como "dosis terapéuticamente eficaz". La pauta de dosificación y las cantidades eficaces para este uso, es decir, el "régimen de dosificación", dependerán de diversos factores, como el estadio de la enfermedad o afección, la gravedad de la enfermedad o afección, el estado general de salud del paciente, el estado físico del paciente, la edad y similares. Al calcular la pauta posológica para un paciente, también se tiene en cuenta el modo de administración.

El régimen de dosificación también toma en consideración parámetros farmacocinéticos bien conocidos en el arte, es decir, la tasa de absorción, biodisponibilidad, metabolismo, aclaramiento y similares de los agentes activos (ver, por ejemplo, Hidalgo-Aragones (1996) *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 58:611-617; Groning (1996) *Pharmazie* 51:337-341; Fotherby (1996) *Contraception* 54:59-69; Johnson (1995) *J. Pharm. Sci.* 84:1144-1146; Rohatagi (1995) *Pharmazie* 50:610-613; Brophy (1983) *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 24:103-108; lo último de Remington, supra). El estado de la técnica permite al clínico determinar el régimen de dosificación para cada paciente individual, agente activo y enfermedad o afección tratada. Las directrices proporcionadas para composiciones similares utilizadas como productos farmacéuticos pueden utilizarse como guía para determinar el régimen de dosificación, es decir, el esquema de dosis y los niveles de dosificación, administrados practicando los procedimientos aquí proporcionados son correctos y apropiados.

Pueden administrarse una o varias formulaciones en función de la dosis y la frecuencia requeridas y toleradas por el paciente. Las formulaciones deben proporcionar una cantidad suficiente de agente activo para tratar, prevenir o mejorar eficazmente las afecciones, enfermedades o síntomas descritos en el presente documento. Por ejemplo, una formulación farmacéutica ejemplar para la administración oral de las composiciones utilizadas para practicar los procedimientos y usos que se proporcionan en el presente documento puede estar en una cantidad diaria de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 20, 50, 100 o 1000 o más microgramos por kilogramo de peso corporal por día o un equivalente de una sal farmacéuticamente aceptable, solvato o hidrato del mismo.

- En realizaciones alternativas, una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula (I) o un equivalente de una sal farmacéuticamente aceptable, solvato o hidrato del mismo, administrado a un individuo que lo necesite comprende el uso de diversos esquemas de dosificación, por ejemplo: A) en caso de ICA, para rescatar al paciente hospitalizado, puede administrarse un compuesto de fórmula (I) mediante infusión intravenosa durante 24/48h a dosis que oscilan entre 0,1 y 0,5 hasta aproximadamente 10, 50 o 100 o más microgramos por kg de peso corporal por minuto. B) en pacientes rescatados del ICA y dados de alta del hospital, el esquema de dosificación para el mantenimiento del efecto terapéutico puede ser en la cantidad diaria de entre 1, 10, 50 o 100 o 1000 o más microgramos por kg de peso corporal. La administración oral es una realización preferida.
- En realizaciones alternativas, una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula (I) o un equivalente de una sal farmacéuticamente aceptable, solvato o hidrato del mismo, administrado a un individuo que lo necesite se individualiza basándose en la monitorización de la presión capilar pulmonar en cuña (PCWP), disnea, congestión venosa periférica y pulmonar, volumen urinario, capacidad de ejercicio, biomarcadores séricos como NT-proBNP y troponina cardiaca de alta sensibilidad (hs-cTnT).
- En realizaciones alternativas, un compuesto de fórmula (I) o un equivalente de una sal farmacéuticamente aceptable, solvato o hidrato del mismo, administrado a un individuo que lo necesite en una cantidad suficiente para mantener una tolerancia normal al ejercicio sin disnea.
- En realizaciones alternativas, una cantidad eficaz se demuestra por la reducción de la PCWP, la ortopnea, la disnea paroxística nocturna, el aumento de la tolerancia al ejercicio, la reducción de la congestión venosa periférica y pulmonar, como crepitaciones pulmonares o estertores, la reducción de la hinchazón del tobillo, la reducción de biomarcadores de producción urinaria como NT-proBNP y troponina cardiaca de alta sensibilidad (hs-cTnT).
- En realizaciones alternativas, se utilizan dosis más bajas de un compuesto de fórmula (I) o un equivalente de una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo, cuando se administra en el torrente sanguíneo o IV o IM (en contraste con la administración, por ejemplo, oral, por inhalación o subcutánea), por ejemplo, como una administración IV o IM, o en una cavidad corporal o en el lumen de un órgano. Se pueden utilizar dosis sustancialmente más altas en la administración tópica, por pulverización, inhalación u oral, o mediante polvos, pulverización o inhalación. Los procedimientos reales para preparar formulaciones administrables por vía parenteral o no parenteral serán conocidos o evidentes para los expertos en la materia y se describen con más detalle en publicaciones como la de Remington, supra.
- En realizaciones ventajosas alternativas, un compuesto de fórmula (I) o un equivalente de una sal farmacéuticamente aceptable, solvato o hidrato del mismo, se administran crónicamente, por ejemplo, desde el día del diagnóstico y hasta el último día de vida del paciente o hasta que la enfermedad haya remitido. En realizaciones alternativas, se requieren ajustes de dosis al pasar de una fase de tratamiento a un periodo de mantenimiento mediante la monitorización periódica de biomarcadores específicos, convencionalmente conocidos, o de signos clínicos de la enfermedad.
- En realizaciones alternativas, al evaluar la eficacia de un tratamiento, un régimen de tratamiento o una dosis particular, o para determinar si debe administrarse un tratamiento frente a una dosis de mantenimiento, los individuos, por ejemplo, los pacientes afectados por insuficiencia cardíaca aguda o crónica, se someten a exámenes periódicos regulares para detectar la presencia y el alcance de la afectación o el daño de órganos y tejidos, por ejemplo, corazón (dilatación ventricular, hipertrofia cardíaca de tercer ruido cardíaco), fatiga, cansancio, disminución de la tolerancia al ejercicio, aumento del tiempo de recuperación tras el ejercicio, riñón (insuficiencia renal, oliguria), pulmón (ortopnea, disnea paroxística nocturna, taquipnea), hinchazón de tobillos, elevación de la presión venosa yugular. Debe realizarse una exploración física exhaustiva en un intervalo de tiempo elegido por los expertos en el tratamiento de una enfermedad cardiovascular, en particular la insuficiencia cardíaca aguda o crónica, que se concentraría en las funciones cardíaca, pulmonar y circulatoria periférica. En consecuencia, en realizaciones alternativas, la terapia con un compuesto de fórmula (I) o un equivalente de una sal farmacéuticamente aceptable, solvato o hidrato del mismo, se instituye tan pronto como sea posible, preferentemente en caso de emergencia, para prevenir la rápida evolución de los síntomas y se continúa después del alta del paciente durante años, preferentemente durante toda la vida del paciente o al menos durante un periodo coherente con la forma en que se utilizan otros fármacos en la insuficiencia cardíaca.
- De acuerdo con la presente invención, los usos y procedimientos aquí previstos pueden comprender además la coadministración con otros medicamentos o productos farmacéuticos. De hecho, la presente invención corrige selectivamente una función bioquímica cardíaca deprimida (a saber, la actividad SERCA2a). Esto contribuye sin duda a aliviar los síntomas clínicos de la IC existente, con menos efectos secundarios no deseados que los de las terapias disponibles (sólo por la selectividad antes mencionada). Sin embargo, dado que la ICC y la ICA son síndromes clínicos complejos, la presente invención puede asociarse potencialmente a clases de fármacos existentes y futuros y/o a fármacos específicos, como por ejemplo a) clases de fármacos como inhibidores de la ECA, AIRB, diuréticos, bloqueadores de los canales de Ca, bloqueadores β , digitálicos, donantes de NO, vasodilatadores, estimuladores de SERCA2a, inhibidores de la neprilisina (NEP), activadores del filamento de miosina, mediadores de relaxina-2 recombinante, proteína NP recombinante, activadores de la guanilato ciclasa soluble (sGC), ligando beta-arrestina del receptor de angiotensina II; b) fármacos específicos: hidroclorotizida, furosemida, verapamilo, diltiazem, carvedilol, metoprolol, hidralazina, eplerenona, espironolactona, lisinopril, ramipril, nitroglicerina, nitratos, digoxina, valsartán,

olmesartán, telmisartán, candesartán, losartán, entresto, omecamtiv, sacubitrilo, serelaxina, ularitida, levosimendán, cinaciguat.

Los compuestos de la presente invención, tal como se utilizan como agentes terapéuticos, en particular para tratar la insuficiencia cardíaca, pueden combinarse con otros agentes terapéuticos utilizados en el tratamiento de la misma enfermedad. Otros agentes terapéuticos ejemplares son los diuréticos, por ejemplo la furosemida, la bumetanida y la torasemida. Metolazona, un antagonista de la aldosterona, como la espironolactona o la eplerenona; diuréticos tiazídicos, como la hidroclorotiazida, la metolazona y la clortalidona. Otros agentes son los inhibidores de la ECA, por ejemplo Lisinopril y Ramipril. También pueden tenerse en cuenta los antagonistas de los receptores de la angiotensina II (ARA), como el valsartán, el candesartán y el losartán. Se incluyen inhibidores de los receptores de angiotensina/neprilisina (IRA), como el sacubitril. Otros agentes pueden seleccionarse entre betabloqueadores, como carvedilol y metoprolol por ejemplo, o vasodilatadores, por ejemplo hidralazina, opcionalmente combinada con dinitrato de isosorbida, nitratos, como nitroglicerina, amlodipino y felodipino; no dihidropiridinas como diltiazem o verapamilo. Los compuestos de la presente invención también pueden combinarse con Digoxina, si es necesario. Otros fármacos, como la Ivabradina y otros Anticoagulantes pueden ser considerados.

Los compuestos de la presente invención pueden combinarse con otros agentes terapéuticos, en particular agentes útiles para tratar enfermedades cardiovasculares, más en particular en la terapia combinada de la insuficiencia cardíaca. Los principios activos combinados pueden administrarse según distintos protocolos, decididos por el médico. De acuerdo con una realización de la presente invención, la terapia combinada puede llevarse a cabo administrando los compuestos de fórmula (I) al mismo tiempo o en momentos diferentes del ingrediente o ingredientes terapéuticamente activos adicionales. En caso de administración concomitante, el compuesto de la presente invención y el principio o principios activos adicionales pueden formularse cada uno en una composición farmacéutica respectiva o en la misma forma farmacéutica unitaria. En el primer caso, la presente invención proporciona un kit, en particular para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca, que comprende composiciones farmacéuticas separadas que contienen el compuesto de la presente invención y el ingrediente o ingredientes activos adicionales, respectivamente. En otra realización, la presente invención proporciona un kit de forma farmacéutica de dosificación unitaria, en particular para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca, que comprende el compuesto de la presente invención y el ingrediente o ingredientes activos adicionales en la misma forma de dosificación unitaria. La terapia combinada según la presente invención proporciona un tratamiento ventajoso de la insuficiencia cardíaca debido al efecto inotrópico-lusitrópico de los compuestos de fórmula (I) aquí divulgados además de o combinados sinérgicamente con el conocido efecto terapéutico de los agentes activos adicionales aquí divulgados.

También se proporcionan nanopartículas, nanolipopartículas, vesículas y membranas liposomales que comprenden compuestos utilizados para practicar los usos y procedimientos según se proporcionan en el presente documento, por ejemplo, para administrar compuestos y composiciones farmacéuticamente activos según se proporcionan en el presente documento (un compuesto de fórmula (I) o un equivalente de una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo, opcionalmente combinado con un agente terapéuticamente activo adicional según se divulgó anteriormente) a un sujeto que lo necesite. En realizaciones alternativas, estas composiciones están diseñadas para dirigirse a moléculas específicas, incluidas moléculas biológicas, como polipéptidos, incluidos polipéptidos de superficie celular, por ejemplo, para dirigirse a un tipo celular deseado, por ejemplo, un miocito o célula cardíaca, una célula endotelial, y similares.

Se proporcionan liposomas multicapa que comprenden compuestos utilizados para practicar procedimientos como los proporcionados en el presente documento, por ejemplo, como se describe en Park, et al., solicitud de EE.UU. n.º 20070082042. Los liposomas multicapa pueden prepararse utilizando una mezcla de componentes de fase oleosa que comprenden escualeno, esteroides, ceramidas, lípidos o aceites neutros, ácidos grasos y lecitinas, con un tamaño de partícula de aproximadamente 200 a 5000 nm, para atrapar una composición utilizada para practicar los usos y procedimientos que se proporcionan en el presente documento.

Los liposomas pueden fabricarse utilizando cualquier procedimiento, por ejemplo, como se describe en Patente de EE.UU. n.º 4.534.899o Park, et al., solicitud de EE.UU. n.º 20070042031, incluyendo procedimiento para producir un liposoma encapsulando un agente activo según la presente invención (o una combinación de agentes activos), comprendiendo el procedimiento proporcionar una solución acuosa en un primer depósito proporcionar una solución lipídica orgánica en un segundo depósito, y luego mezclar la solución acuosa con la solución lipídica orgánica en una primera región de mezcla para producir una solución liposomal, donde la solución lipídica orgánica se mezcla con la solución acuosa para producir sustancialmente de forma instantánea un liposoma que encapsula el agente activo; e inmediatamente después mezclar la solución liposomal con una solución tampón para producir una solución liposomal diluida.

En una realización, las composiciones liposomales usadas para practicar usos y procedimientos como los aquí proporcionados comprenden un amonio sustituido y/o polianiones, p. ej., para la administración dirigida de un compuesto de fórmula (I) o un equivalente de una sal farmacéuticamente aceptable, solvato o hidrato del mismo usado para practicar procedimientos como los aquí proporcionados a un tipo celular deseado, como se describe p. ej., en Solicitud de EE.UU. n.º 20070110798.

Se proporcionan nanopartículas que comprenden compuestos según la presente invención utilizados para practicar usos y procedimientos según se proporcionan en el presente documento en forma de nanopartículas que contienen agente activo (por ejemplo, una nanopartícula secundaria), según se describe, por ejemplo, en la Solicitud estadounidense nº 20070077286. En una realización, se proporcionan nanopartículas que comprenden un agente activo liposoluble utilizado para practicar un uso y un procedimiento como los previstos en el presente documento o un agente activo hidrosoluble liposolubilizado para actuar con una sal metálica bivalente o trivalente.

En una realización, las suspensiones de lípidos sólidos pueden usarse para formular y suministrar composiciones usadas para practicar usos y procedimientos como se proporcionan en el presente documento a células de mamífero in vivo, in vitro o ex vivo, como se describe, por ejemplo, en Solicitud de EE.UU. nº 20050136121.

Las composiciones y formulaciones utilizadas para poner en práctica los usos y procedimientos aquí previstos pueden administrarse mediante el uso de liposomas o nanoliposomas. Mediante el uso de liposomas, en particular cuando la superficie del liposoma lleva ligandos específicos para las células diana, o se dirigen de otro modo preferentemente a un órgano específico, se puede concentrar la administración del agente activo en las células diana in vivo. Véase, por ejemplo Patentes estadounidenses n.º 6.063.400; 6,007,839; Al-Muhammed (1996) J. Microencapsul. 13:293-306; Chonn (1995) Curr. Opin. Biotechnol. 6:698-708; Ostro (1989) Am. J. Hosp. Pharm. 46:1576-1587.

Vehículos de administración

En realizaciones alternativas, puede utilizarse cualquier vehículo de administración para poner en práctica los usos y procedimientos previstos en el presente documento, por ejemplo, para administrar los compuestos previstos en el presente documento a un sujeto que los necesite. Por ejemplo, los vehículos de administración que comprenden polimeros catiónicos y/o péptidos catiónicos, tales como derivados de polietilimina, pueden utilizarse, por ejemplo, como se describe, por ejemplo, en la Solicitud estadounidense nº 20060083737.

En una realización, un complejo polipéptido-surfactante seco se utiliza para formular una composición utilizada para practicar un uso y procedimiento como se proporciona en el presente documento, por ejemplo, como se describe, por ejemplo, en Solicitud de EE.UU. nº 20040151766.

En una realización, una composición utilizada para practicar usos y procedimientos como los proporcionados en el presente documento puede aplicarse a células utilizando vehículos con conjugados peptídicos permeantes de membrana celular, por ejemplo, como se describe en Patentes de EE.UU. N.º 7.306.783; 6,589,503. En un aspecto, la composición a administrar se conjuga con un péptido permeante de la membrana celular. En una realización, la composición a administrar y/o el vehículo de administración se conjugan con un péptido mediador del transporte, por ejemplo, como se describe en la Patente de EE.UU. n.º 5.846.743 en la que se describen péptidos mediadores del transporte que son altamente básicos y se unen a polifosfoinosítidos.

En una realización, la electroporación se utiliza como medio primario o adyuvante para administrar la composición a una célula, p. ej., utilizando cualquier sistema de electroporación como se describe p. ej. en Patentes de EE.UU. No. 7,109,034; 6,261,815; 5,874,268.

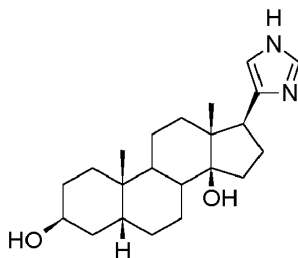
Los siguientes ejemplos ilustran mejor la presente invención.

Preparación de los compuestos de fórmula (I)

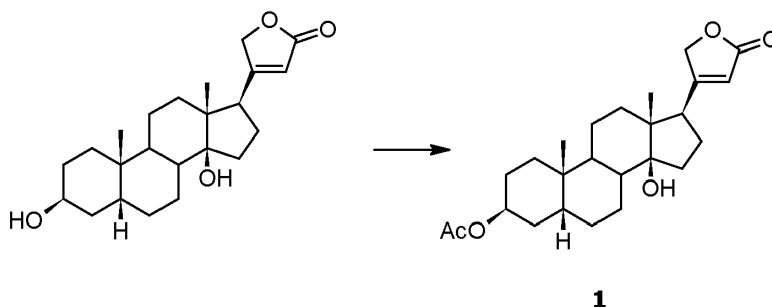
En los siguientes ejemplos, los compuestos químicos, disolventes, reactivos y cualquier otro material proceden de fuentes comerciales, salvo que se indique lo contrario.

Ejemplo 1

3β-hidroxi-5β-10β-metil-13β-metil-14β-hidroxi-17β-(imidazol-4-il)androstano (CVie 101)



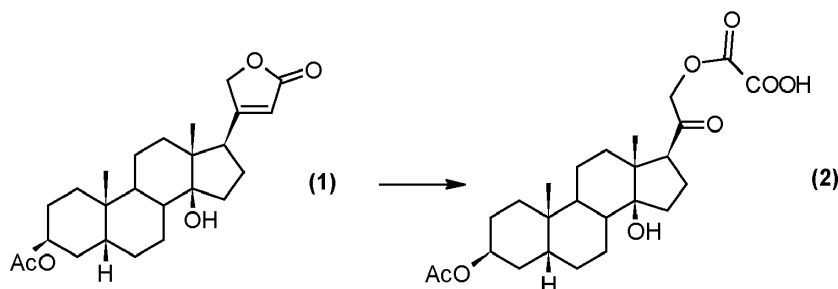
- De digitoxigenina a 3-acetil-digitoxigenina



A una solución de 25 gramos de digitoxigenina en 118 ml de piridina bajo atmósfera de Argón, se añadieron 41mg de DMAP y 33,1 ml de anhídrido acético, manteniendo la temperatura por debajo de 30°C.

Tras agitar a temperatura ambiente durante 20 h, se eliminó el disolvente a presión reducida (coevaporando con tolueno). El residuo se tomó con 480 ml de agua y se agitó a temperatura ambiente durante 1h. El sólido resultante se recogió por filtración, se lavó con 240 ml de agua y se secó al vacío, obteniéndose 28,04 g (rendimiento cuantitativo) del producto **1** como sólido amarillo pálido, que se utilizó en el paso siguiente sin purificación adicional.

- 3-Acetil-digitoxigenina a la apertura del anillo 17β-lactona

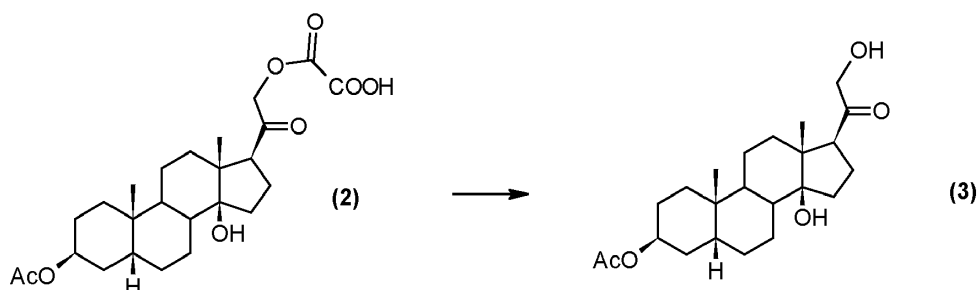


A una solución agitada de 26,33 g de intermedio **1** en 740 ml de acetona, se añadió una solución de 33,8 g de NaIO₄ y 105 mg de hidrato de RuO₂ en 222 ml de agua. Tras agitar 30 min a temperatura ambiente, se añadió una solución de 33,8 g de NaIO₄ y 105 mg de hidrato de RuO₂ en 222 ml de agua.

Se añadieron 32 ml de isopropanol y tras agitar 15min a temperatura ambiente se filtró el sólido, se redujo el volumen a presión reducida y se extrajo el residuo con AcOEt.

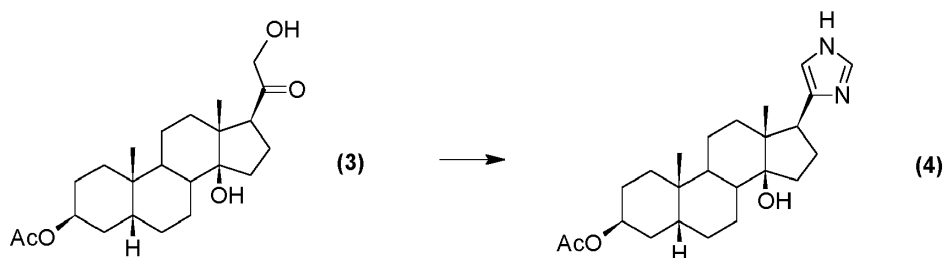
La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre MgSO₄, se filtró y el disolvente se eliminó al vacío dando el intermedio **2**, que se utilizó en el paso siguiente sin purificación adicional.

- Reducción al alcohol



Se añadió una solución de 21,47 g de KHCO₃ en 685 ml de agua a una solución de 28,18 g de intermedio **2** en 1080 ml de MeOH. La solución se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 16 h y se añadieron 10,74 g de KHCO₃. Tras 5 h a temperatura ambiente, el MeOH se eliminó a presión reducida, el residuo se extrajo dos veces con 500 ml de diclorometano y la fase orgánica se lavó con 250 ml de salmuera, después se secó sobre MgSO₄, se filtró y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía instantánea (SiO₂) eluyendo con 7:3 Ciclohexano/AcOEt, dando 14,78g (63 %) del intermedio **3** como sólido blanco.

- Construcción de un anillo de imidazol

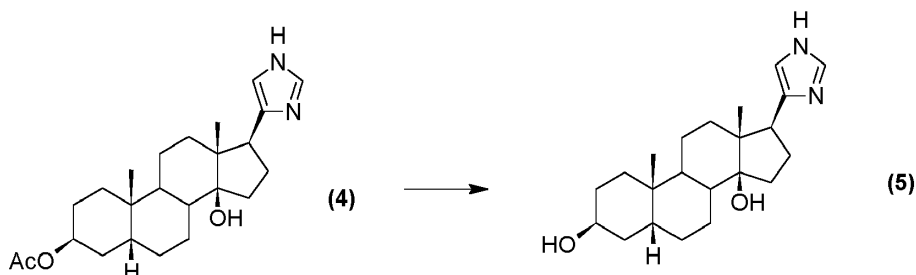


A una solución agitada de 13,66 g de producto **3** en 955 ml de etanol, se añadieron 68,3 ml de formaldehído al 37 %, una solución de $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ (13,27 g en 34 ml de agua) y 205 ml de hidróxido de amonio al 28 %. La mezcla se calentó a reflujo durante 3 h. El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo sólido se disolvió en AcOEt y se lavó con salmuera.

Se recogió la fase orgánica y se extrajo la fase acuosa con AcOEt.

Las fases orgánicas agrupadas se secaron sobre MgSO_4 , se filtraron sobre una almohadilla de celita y el disolvente se eliminó a presión reducida, obteniéndose 13,34 g (96 %) de **4** como sólido verdoso, utilizado en el paso siguiente sin purificación adicional.

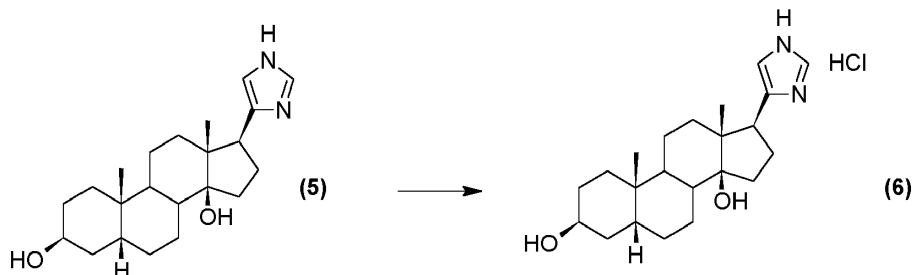
- Hidrólisis del 3-acetil



A una solución agitada de 13,34 g de intermedio **4** en 555 ml de MeOH, se añadieron 166,5 ml de NaOH 1M y la solución se agitó durante 16 horas a temperatura ambiente. El MeOH se eliminó a presión reducida y el residuo se diluyó con agua y se extrajo con diclorometano.

La fase orgánica se secó sobre MgSO_4 , se filtró y el disolvente se eliminó al vacío, obteniéndose 8,23 g (69 %) del intermedio **5** como sólido blanquecino, que se utilizó en el paso siguiente sin purificación adicional.

- Preparación de una sal farmacéuticamente aceptable



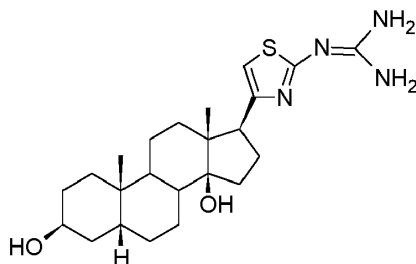
Se añadieron 18,1 ml de HCl 1,25M en EtOH a una solución de 8,11 g de producto **5** en 400 ml de MeOH. La mezcla se agitó 5 min a temperatura ambiente y después se eliminó el disolvente. El residuo se solubilizó en acetona y se calentó a reflujo, se enfrió y se recogió el sólido por filtración, dando 6,03 g de sólido blanco que se purificó por cromatografía.

El sólido se purificó mediante múltiples pasadas de cromatografía en columna C18 semipreparativa (se cargaron 3,0 g de crudo), eluyendo con 7:3 agua/ACN. Rendimiento global: 3,95g (44 %).

¹H-RMN (d₆-DMSO): 0,59 (s, 3H); 0,87 (s, 3H); 1,05-1,24 (m, 4H); 1,32-1,53 (m, 8H); 1,59-1,88 (m, 7H); 2,03-2,11 (m, 1H); 2,21-2,29 (m, 1H); 2,92 (dd, 1H); 3,89 (s, 1H); 4,25 (brs, 1H); 7,29 (d, 1H); 8,86 (d, 1H); 13,72 (s, 1H); 14,22 (s, 1H).

Ejemplo 2

5 3β-hidroxi-5β-10β-metil-13β-metil-14β-hidroxi-17β-(2-guanidino-tiazol-4-il)androstano (Cvie 102)



- De digitoxigenina a 3-acetil-digitoxigenina

10 A una solución de 25 gramos de digitoxigenina en 118 ml de piridina bajo atmósfera de Argón, se añadieron 41mg de DMAP y 33,1 ml de anhídrido acético, manteniendo la temperatura por debajo de 30°C.

Tras agitar a temperatura ambiente durante 20 h, se eliminó el disolvente a presión reducida (coevaporando con tolueno). El residuo se tomó con 480 ml de agua y se agitó a temperatura ambiente durante 1h. El sólido resultante se recogió por filtración, se lavó con 240 ml de agua y se secó al vacío, obteniéndose 28,04 g (rendimiento cuantitativo) del producto **1** como sólido amarillo pálido, que se utilizó en el paso siguiente sin purificación adicional.

15 - 3-Acetil-digitoxigenina para abrir el anillo 17β-lactona

A una solución agitada de 26,33 g de intermedio **1** en 740 ml de acetona, se añadió una solución de 33,8 g de NaIO₄ y 105 mg de hidrato de RuO₂ en 222 ml de agua. Tras agitar 30 min a temperatura ambiente, se añadió una solución de 33,8 g de NaIO₄ y 105 mg de hidrato de RuO₂ en 222 ml de agua. La mezcla se agitó durante 15 minutos más a temperatura ambiente y, a continuación, se añadió una solución de 33,8 g de NaIO₄ y 105 mg de hidrato de RuO₂ en 222 ml de agua.

Se añadieron 32 ml de isopropanol y tras agitar 15min. a temperatura ambiente se filtró el sólido, se redujo el volumen a presión reducida y se extrajo el residuo con AcOEt.

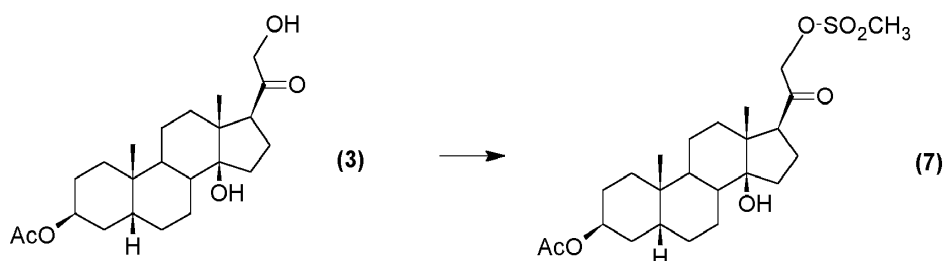
La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre MgSO₄, se filtró y el disolvente se eliminó al vacío dando 29,8 g de sólido marrón pálido que se disolvió en 790 ml de acetona.

25 Se añadió una solución de 33,8 g de NaIO₄ y 105 mg de hidrato de RuO₂ en 222 ml de agua. Después de agitar 30 min a temperatura ambiente, se añadió una solución de 33,8 g de NaIO₄ y 105 mg de hidrato de RuO₂ en 222 ml de agua y la mezcla se agitó 30 min a t.r., después se añadió isopropanol (32 ml). Se añadió una solución de NaIO₄ (33,8g, 158,0mmol, 2,5eq) e hidrato de RuO₂ (105mg, 0,79mmol, 2eq) en agua (222 ml) y la mezcla se agitó 30min a temperatura ambiente, después se añadieron 32 ml de isopropanol. Tras agitar 15 min. a temperatura ambiente, se filtró el sólido, se redujo el volumen a presión reducida y se extrajo el residuo con AcOEt. La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre MgSO₄, se filtró y el disolvente se eliminó a presión reducida, obteniéndose 28,25 g (97 %) del intermedio **2**, que se utilizó en el paso siguiente sin purificación adicional.

- Reducción al alcohol

35 Se añadió una solución de 21,47 g de KHCO₃ en 685 ml de agua a una solución de 28,18 g de intermedio **2** en 1080 ml de MeOH. La solución se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 16 h y se añadieron 10,74 g de KHCO₃. Tras 5 h a temperatura ambiente, el MeOH se eliminó a presión reducida, el residuo se extrajo dos veces con 500 ml de diclorometano y la fase orgánica se lavó con 250 ml de salmuera, después se secó sobre MgSO₄, se filtró y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía instantánea (SiO₂) eluyendo con 7:3 Ciclohexano/AcOEt, dando 14,78g (63 %) del intermedio **3** como sólido blanco.

40 - Del alcohol al metanosulfonato



A una solución agitada de 10,2 gramos del producto **3** en 205 ml de diclorometano anhidro, se añadieron 5,1 ml de trietilamina. La solución se enfrió a 5°C y se añadieron gota a gota 2,5 ml de cloruro de metanosulfonilo y la solución se mantuvo a 5°C durante 10 minutos y a temperatura ambiente durante 2 horas más. La solución se diluyó con 200 ml de diclorometano y se lavó con 200 ml de una solución de NaHCO_3

La fase acuosa se extrajo con 50 ml de diclorometano y las fases orgánicas agrupadas se lavaron con 200 ml de agua. La fase acuosa se extrajo de nuevo con 50 ml de diclorometano y las fases orgánicas agrupadas se secaron sobre MgSO_4 , y el disolvente se eliminó a presión reducida, obteniéndose 12,4 g (99 %) de **7** como sólido blanco, utilizado en el paso siguiente sin purificación adicional.

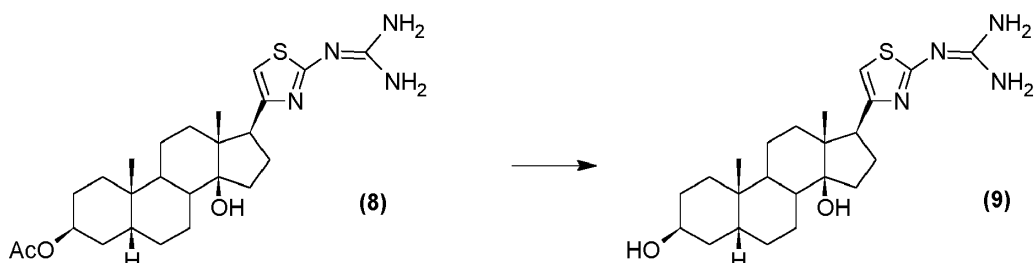
- Construcción de tiazoles sustituidos por guanidinas



A una solución agitada de 12,4 g de intermedio **7** en 1120 ml de acetona, se añadieron 52,3 gramos de 2-imino-4-tiobiuret. La solución se sometió a reflujo durante 5 horas, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se agitó durante 16 horas más. La suspensión se filtró, el sólido se desechó y la acetona se eliminó a presión reducida.

El residuo sólido se tomó con 500 ml de diclorometano y 500 ml de agua. La fase acuosa se extrajo dos veces con 250 ml de diclorometano y las fases orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO_4 , se filtraron y el disolvente se eliminó al vacío dando 15,3 g de intermedio **8** como sólido amarillento, que se purificó mediante cromatografía instantánea (SiO_2) (de ciclohexano/acetato de etilo 1/1 + 1 % de TEA - acetato de etilo 99 % + 1 % de TEA como eluyente) para dar 8,95 gramos de producto **8** puro (73 %).

- Restauración de 3β-hidroxi



Se añadieron 93,3 ml de NaOH 1M a una solución de 8,86 g de intermedio **8** en 900 ml de MeOH . La mezcla se agitó 48 horas a temperatura ambiente y después se eliminó el disolvente. El residuo se lavó con 250 ml de agua y se filtró. El sólido en el filtro se lavó posteriormente con 100 ml adicionales de agua dando 7,7 gramos de sólido blanquecino que se purificó por cristalización con EtOH /agua. El sólido se disolvió en 770 ml de EtOH a temperatura ambiente y se añadieron 385 ml de agua bajo agitación, la mezcla se dejó a 4°C durante 16 horas. El sólido se recuperó por filtración, obteniéndose 6,24 gramos del producto **9** en forma de polvo blanquecino.

¹H-RMN (d₆-DMSO, 400 MHz): 0,59 (s, 3H); 0,89 (s, 3H); 1,05-1,24 (m, 4H); 1,32-1,53 (m, 8H); 1,59-1,88 (m, 7H); 2,04-2,09 (m, 2H); 2,72 (t, 1H); 3,90 (s, 1H); 4,20 (s, 1H); 4,89 (s, 1H); 6,59 (bs, 4H).

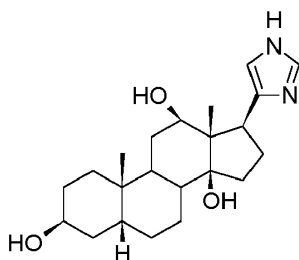
- Preparación de una sal farmacéuticamente aceptable

- 5 Se disolvieron 5,72 gramos del producto **9** en 230 ml de MeOH, se filtraron y se añadieron 4,4 ml de HCl 3M en MeOH a la solución filtrada. El disolvente se eliminó a presión reducida, el residuo se mezcló con 130 ml de acetona y se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente. Tras 16 horas adicionales a 4°C, el sólido se recuperó por filtración, obteniéndose 4,40 gramos de sólido blanco

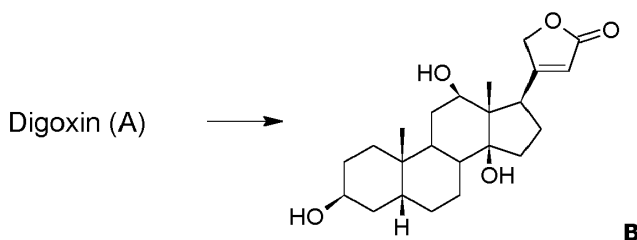
Ejemplo 3

3β-hidroxi-5β-10β-metil-12β-hidroxi-13β-metil-14β-hidroxi-17β-(imidazol-4-il)androstando (Cvie 104)

10

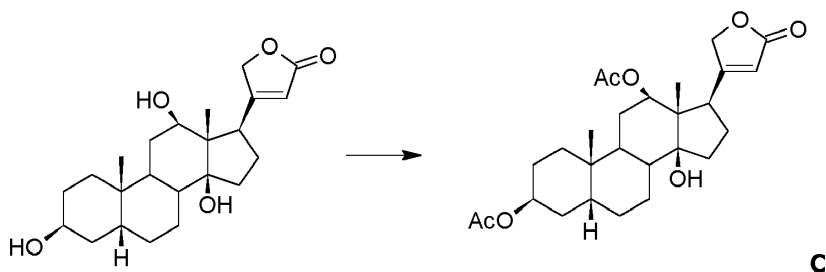


- De Digoxina (A) a Digoxigenina



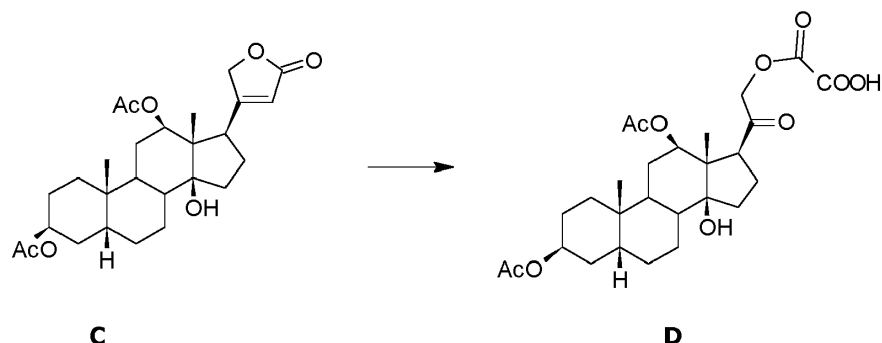
- 15 A una suspensión de 4,33 gramos de Digoxina en 43 ml de MeOH, se añadieron 12,3 ml de H₂SO₄ 0,2M y la mezcla se calentó a reflujo durante 1 hora y se enfrió a temperatura ambiente. El disolvente se eliminó a presión reducida y se añadió al residuo una mezcla de 25 ml de hielo y agua, que se agitó durante 30 minutos. El sólido recogido se lavó, agitando durante 1 hora en 25 ml de agua fría, la suspensión se filtró y el sólido se lavó en el filtro con agua, obteniéndose 2,238 gramos de sólido **B** blanco (99 %).

- 20 **- Acetilación de grupos 3B, 12β-hidroxi**



- 25 A una solución de 2,14 gramos de digoxigenina en 10 ml de piridina bajo atmósfera de argón, se añadieron 3 mg de DMAP y 2,5 ml de anhídrido acético, manteniendo la temperatura por debajo de 30°C. Tras agitar a temperatura ambiente durante 20 h, se eliminó el disolvente a presión reducida (coevaporando con tolueno). El residuo se trató con 25 ml de agua y se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. El sólido resultante se recogió por filtración y se secó al vacío, dando 1,92 gramos (79 %) del producto C como sólido blanco, utilizado en el siguiente paso sin más purificación.

- Apertura del anillo de lactona

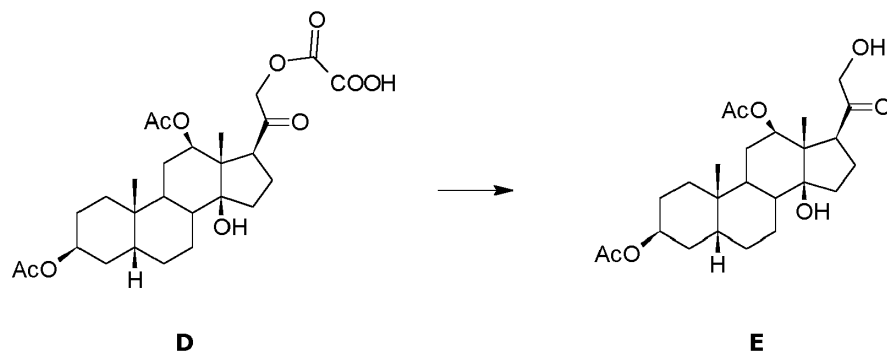


A una solución agitada de 1,91 gramos de intermedio **C** en 47 mL de acetona, se añadió una solución de 2,15 g de NaIO_4 y 7 mg de hidrato de RuO_2 en 14 ml de agua. Tras agitar 30 min a temperatura ambiente, se añadió una solución de 2,15 g de NaIO_4 y 7 mg de hidrato de RuO_2 en 14 ml de agua.

Se añadieron 2,4 ml de isopropanol y tras agitar 15 min, a temperatura ambiente, el sólido se filtró sobre una almohadilla de celita y se lavó sobre el filtro con 150 ml de acetona, el disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo se extrajo con AcOEt y agua.

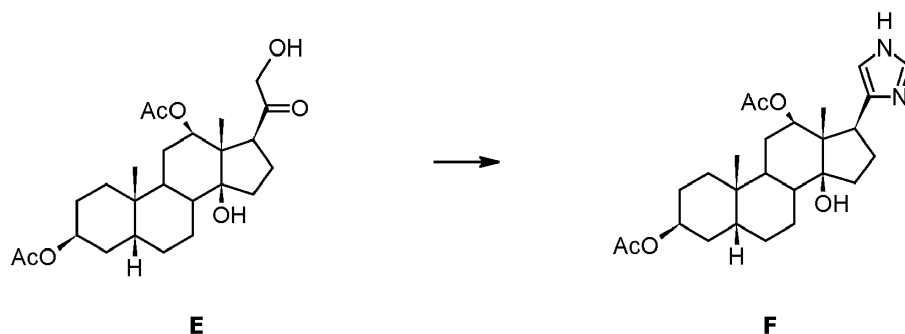
La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre MgSO_4 , se filtró y el disolvente se eliminó al vacío dando 2,25 g (99 %) del producto **D** como sólido blanco utilizado en el paso siguiente sin purificación adicional.

- Hidrólisis del éster



Se añadió una solución de 1,42 g de KHCO_3 en 47 ml de agua a una solución de 2,25 g de intermedio **D** en 71 ml de MeOH . La solución se agitó a temperatura ambiente durante 72 horas y, a continuación, se eliminó el MeOH a presión reducida. La solución acuosa restante se extrajo con EtOAc y la fase orgánica se secó sobre MgSO_4 , se filtró y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo crudo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de SiO_2 eluyendo con $\text{Ciclohexano}/\text{AcOEt}$ 6/4, dando 1,03 gramos (57 %) del intermedio **E** como sólido blanco.

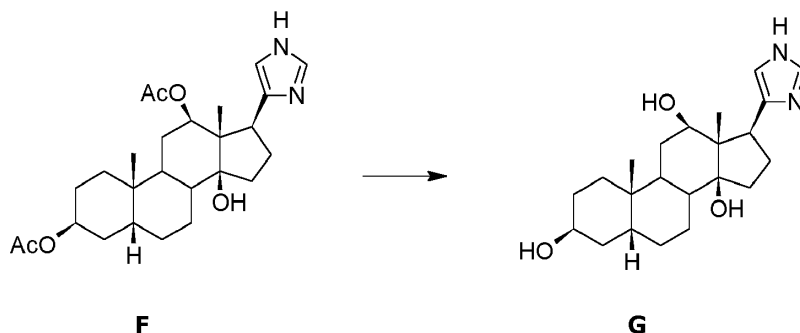
- Construcción de un anillo de imidazol



A una solución agitada de 500 mg del producto **E** en 30 ml de etanol, se añadieron 2,2 ml de formaldehído al 37 %, una solución de $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ (423 g en 2,6 ml de agua) y 6,5 ml de hidróxido de amonio al 28 %. La mezcla se calentó a reflujo durante 3 h. Se redujo el volumen y el residuo se tomó con salmuera y AcOEt.

- 5 Se recogió la fase orgánica y se extrajo la fase acuosa con AcOEt. Las fases orgánicas agrupadas se muraron sobre MgSO_4 , se filtraron y el disolvente se eliminó a presión reducida, dando 474mg (93 %) de **F** como sólido verdoso, utilizado en el siguiente paso sin más purificación.

- Hidrólisis de los grupos acetilo

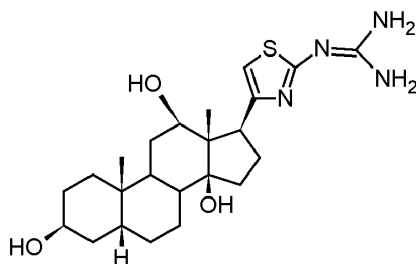


- 10 A una solución agitada de 470 mg de intermedio **F** en 17 ml de MeOH, se añadieron 5,1 ml de NaOH 1M y la solución se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente. El MeOH se eliminó a presión reducida y el residuo se diluyó con agua y se extrajo con diclorometano. La fase orgánica se secó sobre MgSO_4 , se filtró y el disolvente se eliminó al vacío dando 383 mg (73 %) de residuo crudo como sólido gris/verde, que se purificó mediante cromatografía en columna de gel de SiO_2 eluyendo con DCM/MeOH 8/2, dando 152 mg de producto puro **G** (**Cvie 104**) como sólido blanco.
- 15

$^1\text{H-RMN}$ (d_6 -DMSO, 600 MHz): 0,40 (s, 3H); 0,83 (s, 3H); 1,08-1,24 (m, 4H); 1,30-1,58 (m, 6H); 1,58-1,82 (m, 6H); 1,82-2,18 (m, 1H); 2,02-2,18 (m, 1H); 3,20 (m, 1H); 3,90 (s, 1H); 4,18 (s, 1H); 4,40 (s, 1H); 6,68 (s, 1H); 7,60 (s, 1H); 11,78 (s, 1H).

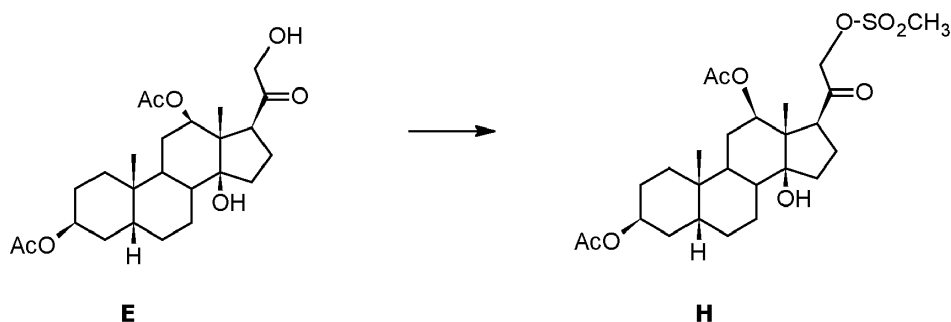
Ejemplo 4

- 20 **3 β -hidroxi-5 β -10 β -metil-12 β -hidroxi-13 β -metil-14 β -hidroxi-17 β -(2-guanidino-tiazol-4-il)androstano (Cvie 105)**



El ejemplo 3 se repite hasta el intermedio **E**.

- Del alcohol al metanosulfonato

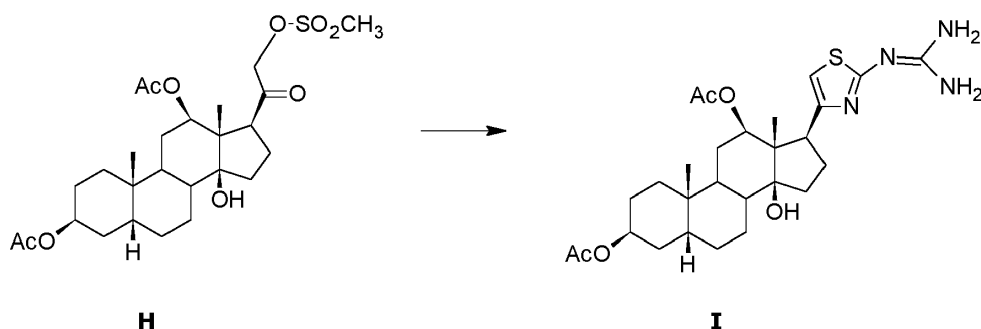


5 A una solución agitada de 0,55 gramos de producto **E** en 10 ml de diclorometano anhidro, se añadieron 0,24 ml de trietilamina. La solución se enfrió a 5°C y se añadieron gota a gota 0,12 ml de cloruro de metanosulfonilo y la solución se agitó a 5°C durante 10 minutos, después a temperatura ambiente durante 2 horas más. La solución se diluyó con 10 ml de diclorometano y se lavó con 10 l de una solución de NaHCO_3 al 5 %

La fase acuosa se extrajo con 50 ml de diclorometano y las fases orgánicas agrupadas se lavaron con 10 ml de agua. La fase orgánica se secó sobre MgSO_4 , y el disolvente se eliminó a presión reducida, dando 0,64g (99 %) de **H** como sólido blanco, utilizado en el siguiente paso sin más purificación.

- Construcción de un anillo de imidazol sustituido por guanidina

10

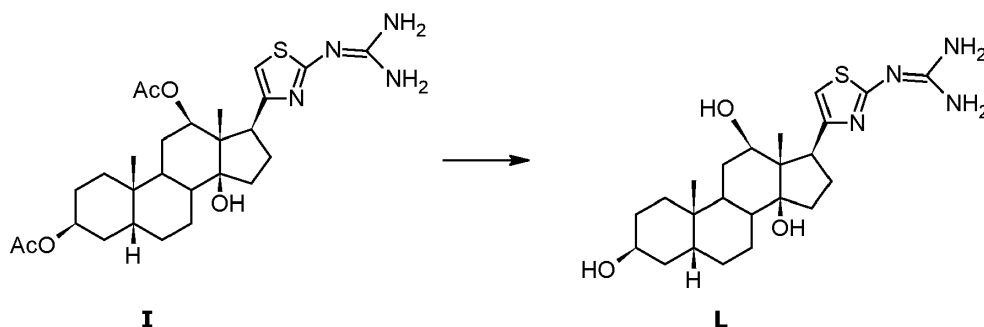


A una solución agitada de 0,64 g de intermedio **H** en 52 ml de acetona, se añadieron 2,39 gramos de 2-imino-4-tiobiuret (amidotiourea, comercial). La solución se sometió a reflujo durante 5 horas, se enfrió a temperatura ambiente y se agitó durante 16 horas más. La suspensión se filtró, el sólido se desechó y la acetona se eliminó a presión reducida.

15 El residuo sólido se disolvió con 20 ml de diclorometano y se lavó con agua. La fase orgánica se secó sobre MgSO_4 , se filtró y el disolvente se eliminó al vacío dando 0,59 gramos de producto crudo como sólido amarillo, que se purificó por cromatografía instantánea (SiO_2) (de acetato de etilo/ciclohexano 8/2 + 1 % de TEA - acetato de etilo 99 % + 1 % de TEA como eluyente) obteniéndose 0,40 gramos de producto puro **I** (62 %)

- Hidrólisis de los grupos acetilo

20



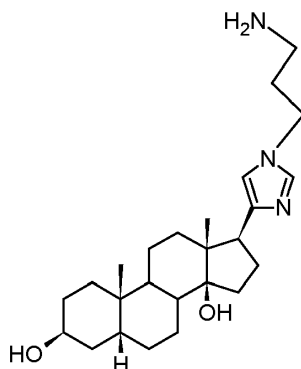
Se añadieron 1,9 ml de NaOH 1M a una solución de 200mg del intermedio **I** en 6 ml de MeOH. La mezcla se agitó 24 horas a temperatura ambiente y después se eliminó el disolvente. El residuo se lavó con 5 ml de agua y se filtró dando 131mg (78 %) del compuesto **L** (**CVie 105**) como sólido blanco

¹H-RMN (d₆-DMSO, 600 MHz): 0,50 (s, 3H); 0,87 (s, 3H); 1,01-1,26 (m, 4H); 1,26-1,58 (m, 6H); 1,58-1,62 (m, 2H); 1,62-1,98 (m, 6H); 1,98-2,06 (m, 1H); 3,20 (s, 1H); 3,30-3,38 (m, 1H); 3,90 (s, 1H); 6,19 (s, 1H).

Ejemplo 5

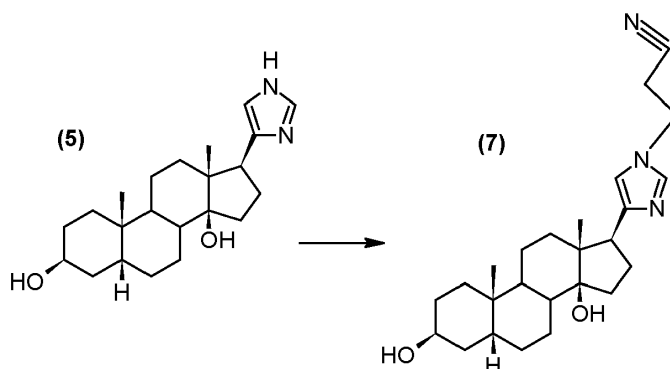
3β-hidroxi-5β-10β-metil-13β-metil-14β-hidroxi-17β-(N-(3-aminopropil)-imidazol-4-yl)androstano (CVie 106)

5



Se repite el ejemplo 1 hasta obtener el producto final como base libre **5**.

- Preparación del derivado N-(aminoalquilo)



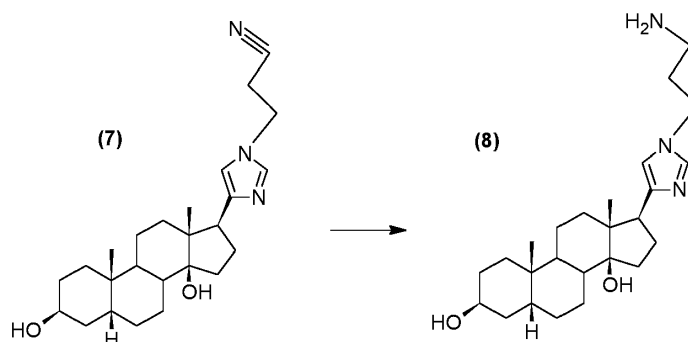
10

a) Derivado de nitrilo

A una solución agitada de 1,42 gramos de producto **5** en 50 ml de DMSO, se añadieron 55 mg de K₂CO₃ y 1,31 ml de acrilonitrilo y la mezcla se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente. se añadieron 150 ml de agua y la mezcla se extrajo con acetato de etilo, la fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y el disolvente se eliminó a presión reducida, obteniéndose 1,71 g (99 %) del intermedio **7**, **que** se utilizó en el paso siguiente sin más purificación.

15

b) Reducción del grupo nitrilo

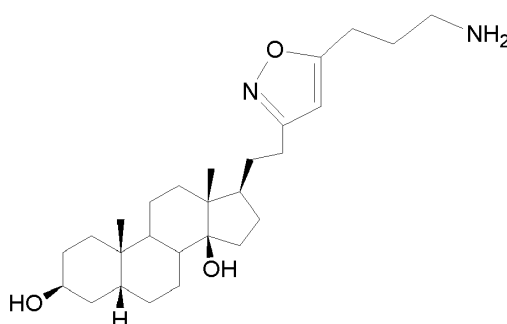


A una solución agitada de 286 mg de producto **7** en 20 ml de THF anhidro, se añadieron 340 mg de LiAlH₄ en porciones y la mezcla se calentó a 80°C y se sometió a reflujo durante 16 horas, después la solución enfriada se diluyó con THF y agua y se añadió una solución de NaOH 4N hasta que se formó un sólido blanco. La suspensión se filtró, el sólido se lavó con acetato de etilo y se purificó mediante cromatografía instantánea (SiO₂) eluyendo con CHCl₃/MeOH/NH₃ 9/1/0,1 dando 204 mg (69 %) del producto **8 (Cvie 106)** como sólido blanco.

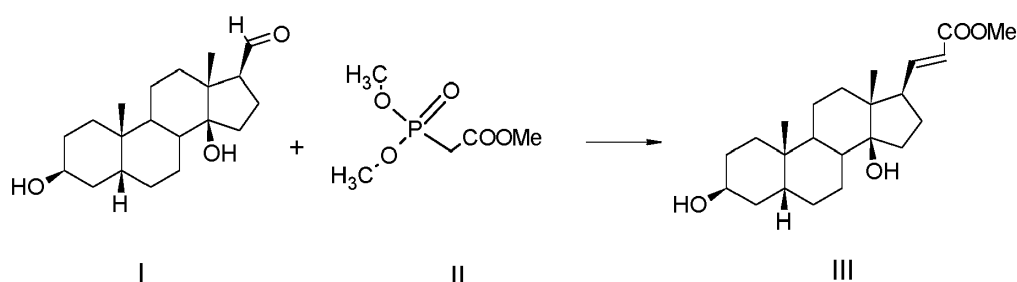
¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): 0,59 (s, 3H); 0,98 (s, 3H); 1,25-1,35 (m, 4H); 1,35-1,75 (m, 11H); 1,85-2,02 (m, 7H); 2,19-2,24 (m, 2H); 2,69-2,74 (m, 3H); 3,98 (t, 2H); 4,15 (s, 1H); 6,58 (s, 1H); 7,37 (s, 1H).

Ejemplo 6

3β-hidroxi-5β-10β-metil-13β-metil-14β-hidroxi-17β-((5-(3-aminopropil)-isoxazol-3-il)-etil)androstano (Cvie 108)



- Del aldehído I al éster α-insaturado



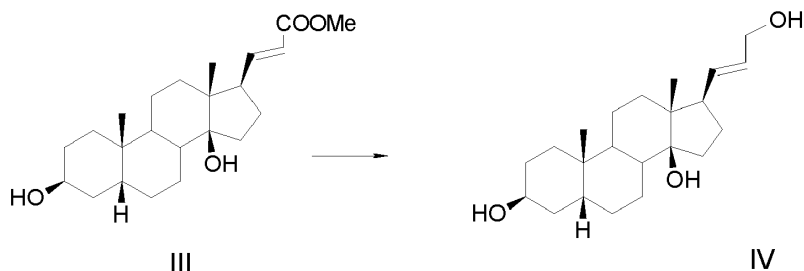
El aldehído I se preparó según Gobbini et al. Synth Comm, 27(6), 1115-1122 (1997).

A una suspensión de 2,43g de NaH (55 % dispersado en aceite mineral) en 73 ml de THF seco, se añadieron gota a gota 8,57 ml de Trimetil Fosfonoacetato II (líquido, comercial), a 0°C, bajo atmósfera de Nitrógeno.

La suspensión se dejó a temperatura ambiente durante 30 minutos y luego se enfrió a 0°C. se añadieron gota a gota 10 gramos del compuesto I disuelto en 146 ml de THF seco y se dejó la mezcla en agitación durante 2 horas a temperatura ambiente.

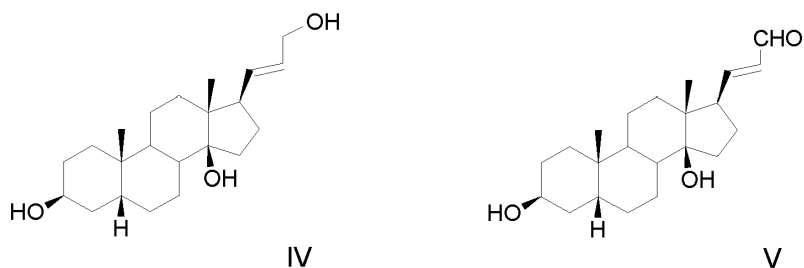
Se añadieron 100 ml de EtOAc, la mezcla se transfirió a 200 ml de una solución de NaH₂PO₄ (5 % en agua) y se extrajo tres veces con 150 ml de EtOAc. Las fases orgánicas agrupadas se concentraron hasta sequedad a presión reducida. El residuo sólido se suspendió en 130 ml de agua y se mantuvo en agitación durante 16 horas, se filtró y se disolvió en AcOEt y diclorometano, después se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y el disolvente se eliminó a presión reducida, obteniéndose 11 g (95 %) del intermedio III, que se utilizó en el paso siguiente sin más purificación.

- Reducción de éster a alcohol



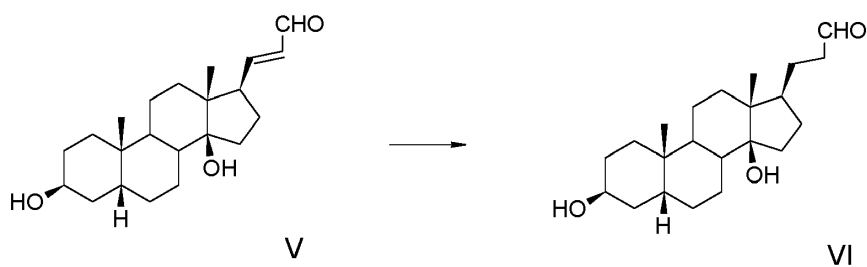
A una solución de 11 gramos del compuesto **III** en 450 ml de THF seco bajo atmósfera de N₂, a -78°C, se añadieron gota a gota 35 ml de DIBAH puro (la temperatura interna subió hasta 65°C) y la mezcla se agitó durante una hora. Tras enfriar a -78°C, se añadieron 500 ml de solución de ácido cítrico (13 % en agua) gota a gota en 30 minutos y se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente, después se añadieron 50 gramos de NaCl y la fase acuosa se lavó tres veces con 150 ml de EtOAc. Las fases orgánicas agrupadas se lavaron con una solución al 5 % de NaHCO₃, se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y el disolvente se eliminó a presión reducida, obteniéndose 11,9 g (98 %) del intermedio **IV**, que se utilizó en el paso siguiente sin purificación adicional.

- Oxidación de alcohol a aldehído



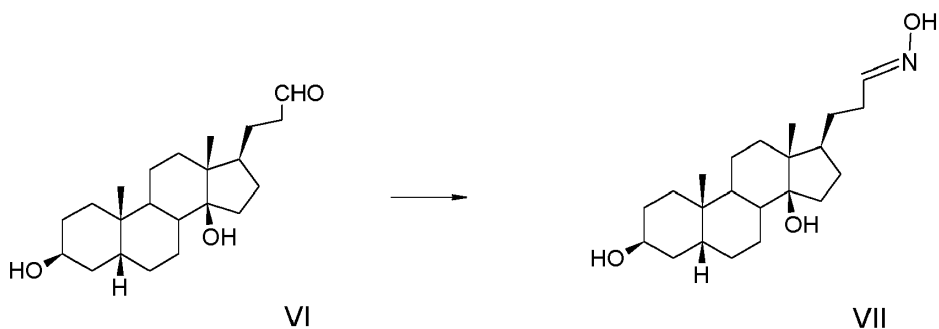
A una solución agitada de 11,9 gramos de compuesto **IV** en 140 ml de dioxano, se añadieron 75 gramos de MnO₂ y la suspensión se agitó durante 4 horas a temperatura ambiente. La mezcla se filtró sobre una almohadilla de celita, que se lavó con 150 ml adicionales de AcOEt. Los disolventes se eliminaron a presión reducida y el residuo se cristalizó con 150 ml de éter dietílico obteniéndose 8,4 gramos del compuesto **V** (83 %)

- Hidrogenación del doble enlace



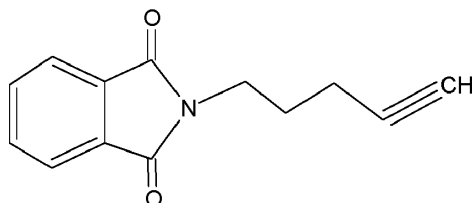
A una solución de 2,95 gramos de producto **V** en 600 ml de EtOAc, se añadieron 55 mg de catalizador Pd/C (5 %) y la mezcla se mantuvo bajo hidrógeno a presión atmosférica y temperatura ambiente durante una hora. La mezcla se filtró sobre una almohadilla de celita y el filtrado se concentró a sequedad a presión reducida, obteniéndose 2,95 gramos (99 %) de producto **VI**

- Del aldehído a la oxima



5 A una solución agitada de 2,7g de compuesto **VI** en 90 ml de dioxano, se añadieron 670mg de hidrocloreto de hidroxilamina y 22,5 ml de NaOH 1M. La mezcla se agitó durante 90 minutos a temperatura ambiente, se eliminó el disolvente a presión reducida y se extrajo con CHCl_3 . La fase orgánica se concentró a sequedad a presión reducida obteniéndose 3,1g (99 %) de producto **VII**

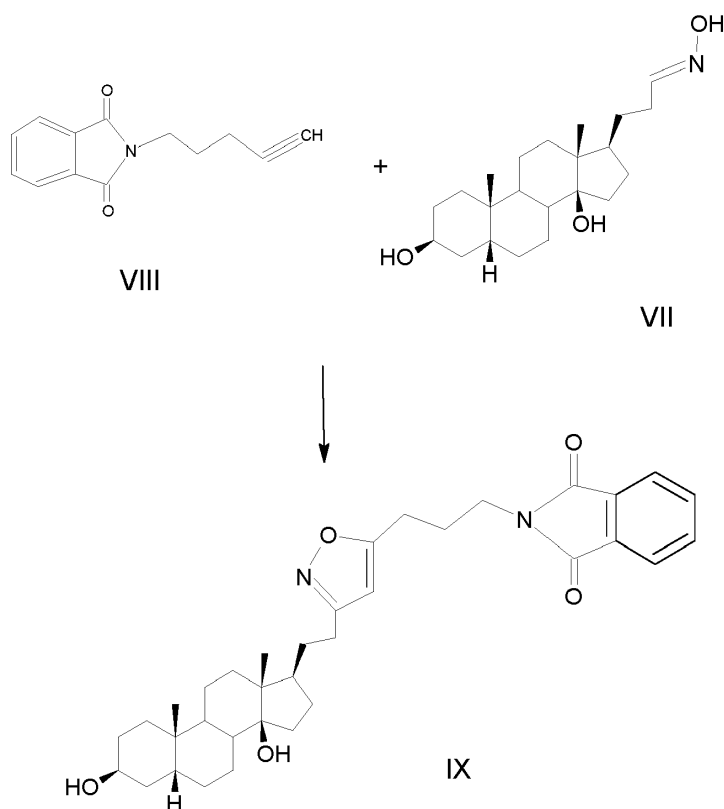
- Síntesis de alquinos



10 A una solución agitada de 1 ml de 4-propin-1-ol en 40 ml de THF seco, se añadieron 5,63 gramos de PPh_3 y 3,16 gramos de ftalimida, a 0°C . Se añadieron gota a gota 3,35 ml de solución de 1,2-etoxicarbonil diazeno (DEAD) a la solución anterior y la mezcla se agitó durante 16 horas, después se eliminó el THF a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía instantánea (SiO_2) (Heptano/éter dietílico 9/1 como eluyente) para dar 1,92 gramos de producto puro **VIII** (84 %)

- Acoplamiento de alquino a oxima

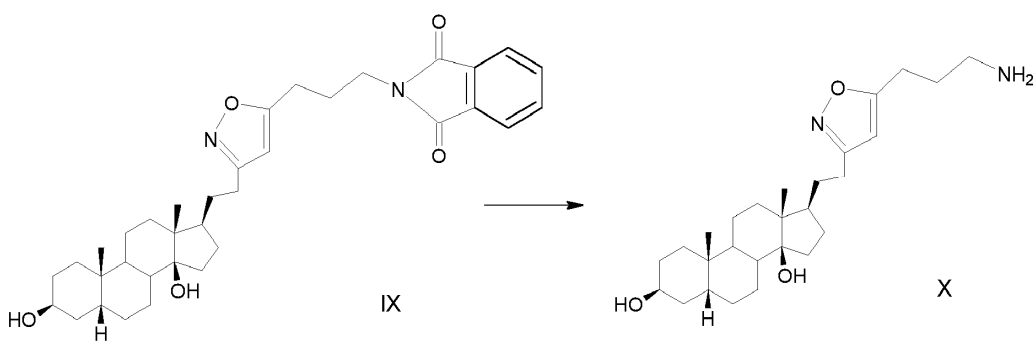
15



A una suspensión de 600 mg del producto **VII** en 8 ml de cloroformo que contenía 0,5 % de piridina, se añadieron 220 mg de N-clorosuccinimida y la mezcla se agitó durante 10 minutos en atmósfera de N_2 .

- 5 Se añadió gota a gota una solución de 240 mg de alquino **VIII** en 4 ml de cloroformo que contenía 0,24 ml de TEA, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 6 horas, se diluyó con $CHCl_3$ y se lavó con agua. El disolvente se eliminó hasta sequedad a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía instantánea (SiO_2) (Heptano/Acetona/acetato de etilo 7/2/2 como eluyente) para dar 260 mg de producto **IX** puro (35 %)

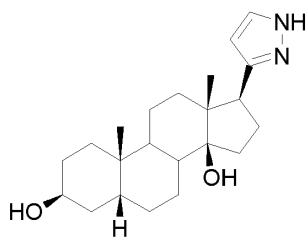
- Restauración de la amina



10 La mezcla de 350 mg del compuesto **IX** y 0,70 ml de clorhidrato de hidracina en 22 ml de etanol se sometió a reflujo durante una hora. La mezcla se diluyó con agua, el etanol se eliminó a presión reducida y la parte acuosa residual se extrajo con CH_2Cl_2 . La fase orgánica se eliminó a sequedad a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía instantánea (SiO_2) (CH_2Cl_2 /MeOH/ NH_3 9/1/0,1 como eluyente) para dar 125 mg (44 %) de producto **X** puro (**CVie 108**).

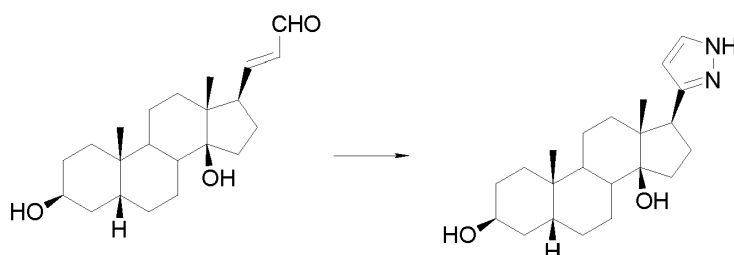
Ejemplo 7

3β-hidroxi-5β-10β-metil-13β-metil-14β-hidroxi-17β-(pirazol-3-il)androstano (Cvie 103)



Se repite el Ejemplo 6 hasta el intermedio **V**.

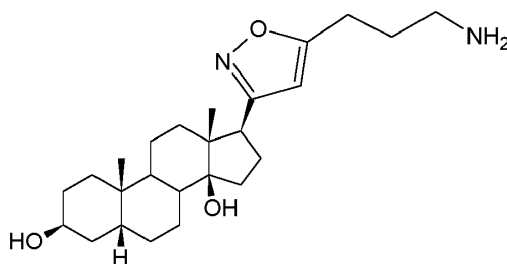
- Construcción del anillo de pirazol



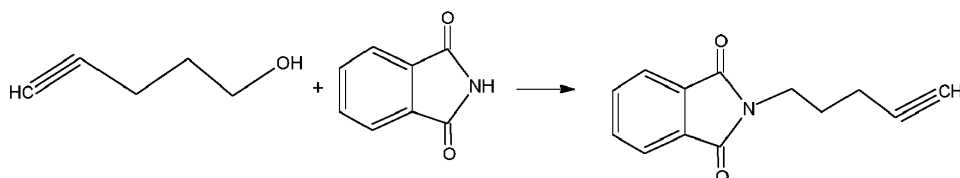
A una solución agitada de 1 gramo de producto **V** en 6 ml de ácido acético, se añadieron 0,58 gramos de p-toluenosulfonil hidrazida. La mezcla se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente y se diluyó con una solución de Na_2HPO_4 (5 % en agua). La suspensión se filtró, el sólido se secó a presión reducida y se solubilizó en 30 ml de DMF, añadiendo 400 mg de *terc-butóxido de potasio*. La mezcla se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente, se calentó a 80°C durante 1,5 horas, se vertió en agua y se extrajo tres veces con éter dietílico. Las fases orgánicas agrupadas se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía instantánea (SiO_2) (CH_2Cl_2 /Acetona 7/3 como eluyente) para dar 296 mg (29 %) de producto puro (**Cvie 103**).

Ejemplo 8

3β-hidroxi-5β-10β-metil-13β-metil-14β-hidroxi-17β-((5-(3-aminopropil)-isoxazol-3-yl))androstano (Cvie 107)



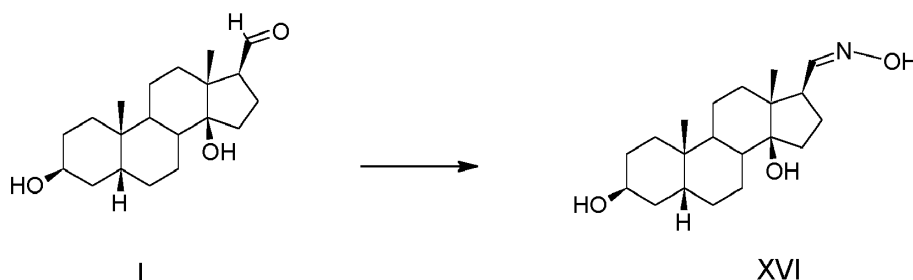
- Preparación del alquino



VIII

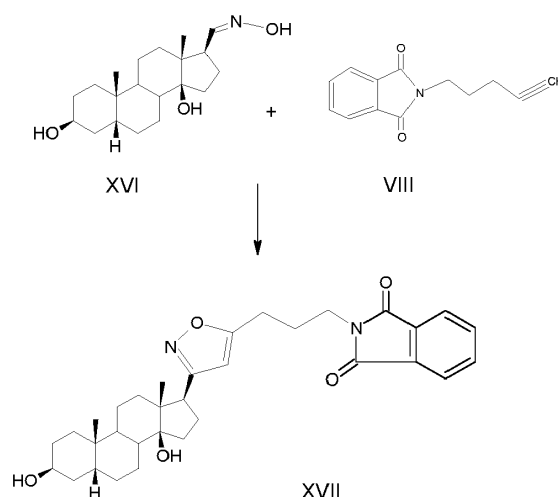
A una solución agitada de 1l de 4-propin-1-ol en 40 ml de THF seco, se añadieron 5,63 gramos de PPh_3 y 3,16 gramos de ftalimida, a 0°C. Se añadieron gota a gota 3,35 ml de solución de 1,2-etoxicarbonil diazeno (DEAD) a la solución anterior y la mezcla se agitó durante 16 horas, después se eliminó el THF a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía instantánea (SiO_2) (Heptano/éter dietílico 9/1 como eluyente) para dar 1,92 gramos de producto puro **VIII** (84 %)

- De aldehído a oxima



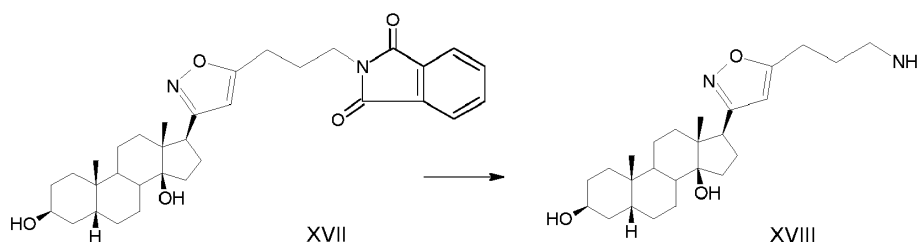
El aldehído **I** se preparó como se divulgó anteriormente en el Ejemplo 6. A una solución agitada de 24 ml de tampón acetato (pH 4,7) y 24 ml de dioxano, se añadieron 1,3 gramos de hidroxilamina y se corrigió el pH con HCl 1N (de 5,75 a 4,8). La solución se diluyó con 15 ml de dioxano y se añadió gota a gota una solución de 5 gramos de aldehído **I** en dioxano y agua (40 y 16 ml respectivamente). Después de 30 minutos se añadió NaHCO_3 sólido hasta que la solución alcanzó pH 7, la solución se extrajo con EtOAc, la fase orgánica se lavó con agua, se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró y el disolvente se eliminó a presión reducida, dando 5,4g (99 %) del intermedio **XVI**

- Acoplamiento de alquino a oxima



A una solución agitada de 480 mg de N-clorosuccinimida en 15 ml de cloroformo que contenía 0,5 % de piridina, se añadieron porciones de 1,2 gramos del producto sólido **XVI**. Se añadió gota a gota, bajo atmósfera de nitrógeno, una solución de alquino de 780 mg de **VIII** en 12 ml de cloroformo que contenía 0,5 % de piridina y 0,53 ml de TEA, y se calentó a 45 °C. La mezcla se agitó durante 18 horas, se diluyó en CHCl_3 y se lavó con agua. La mezcla se agitó durante 18 horas, se diluyó con CHCl_3 y se lavó con agua. El disolvente se eliminó hasta sequedad a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía instantánea (SiO_2) ($\text{CHCl}_3/\text{Et}_2\text{O}$ 8/2 como eluyente) para dar 900 mg de producto **XVII** puro (45 %).

- Desprotección con hidracina

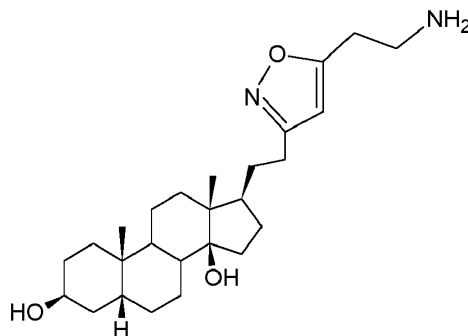


La mezcla de 350 mg del compuesto **XVII** y 1,90 ml de hidrocloreto de hidracina en 60 ml de etanol se sometió a reflujo durante 7 horas. La mezcla se diluyó con agua, el etanol se eliminó a presión reducida y la parte acuosa residual se

extrajo con CH_2Cl_2 . La fase orgánica se eliminó a sequedad a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía instantánea (SiO_2) ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ 9/1/0,1 como eluyente) para dar 400 g (60 %) de producto **XVIII** puro (**CVie 107**).

Ejemplo 9

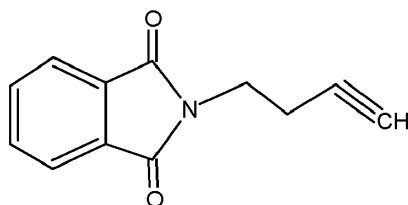
5 **3 β -hidroxi-5 β -10 β -metil-13 β -metil-14 β -hidroxi-17 β -(5-(2-aminoetil)-isoxazol-3-il)-etil)androstano (Cvie 109)**



Se repite el Ejemplo 6 hasta el intermedio **VII**.

- Síntesis de alquinos

10

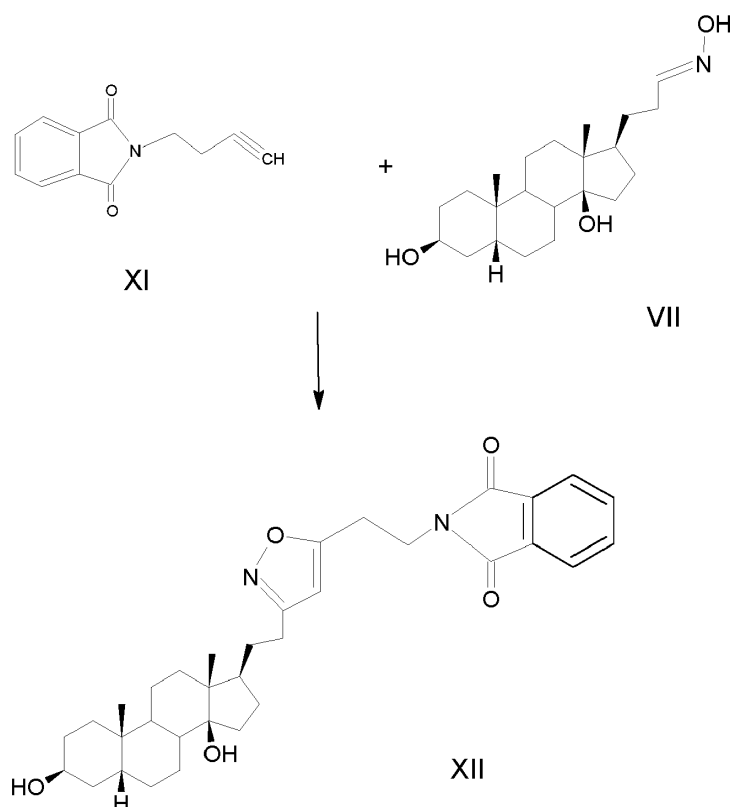


XI

15

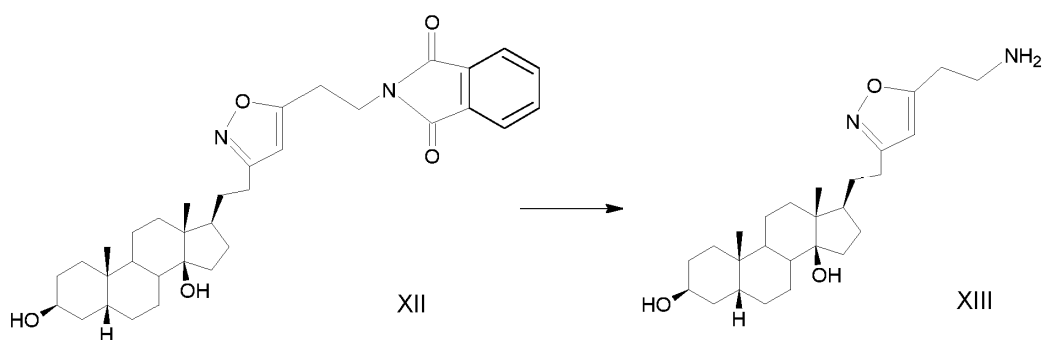
A una solución agitada de 0,70 ml de 3-butil-1-ol en 34 ml de THF seco, se añadieron 4,85 gramos de PPh_3 y 2,72 gramos de Ftalimida, a 0°C . 2,89 ml de solución de 1,2-Etoxycarbonil diazeno (DEAD) se añadieron gota a gota a la solución anterior y la mezcla se agitó durante 18 horas, después se eliminó el THF a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía instantánea (SiO_2) (Heptano/éter dietílico 9/1 como eluyente) para dar 400mg de producto puro **XI** (21 %)

- Acoplamiento de alquino a oxima



5 A una suspensión de 950mg del producto **VII** en 12 ml de cloroformo que contenía 0,5 % de piridina, se añadieron 348mg de N-clorosuccinimida y la mezcla se agitó durante 10 minutos bajo atmósfera de N₂. Se añadió gota a gota una solución de 600 mg de alquino **XI** en 6 ml de cloroformo que contenía 0,38 ml de TEA, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 6 horas, se diluyó con CHCl₃ y se lavó con agua. El disolvente se eliminó hasta sequedad a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía instantánea (SiO₂) (ciclohexano/acetona/cloroformo 7/2/2 como eluyente) para dar 330 mg de producto puro **XII** (35 %).

- Desprotección con hidracina

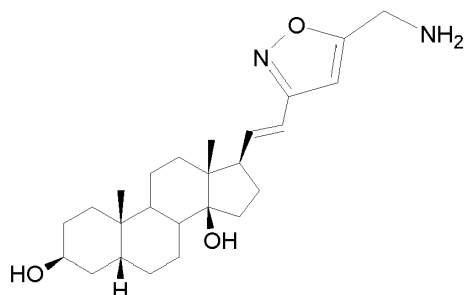


10 La mezcla de 480 mg del compuesto **XII** y 0,90 ml de hidroclicuro de hidracina en 27 ml de etanol se sometió a reflujo durante una hora. La mezcla se diluyó con agua, el etanol se eliminó a presión reducida y la parte acuosa residual se extrajo con CH₂Cl₂. La fase orgánica se eliminó hasta sequedad a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía instantánea (SiO₂) (CHCl₃/MeOH/NH₃ 95/5/0,5 como eluyente) para dar 130 mg (36 %) de producto **XIII** puro (**CVie 109**).

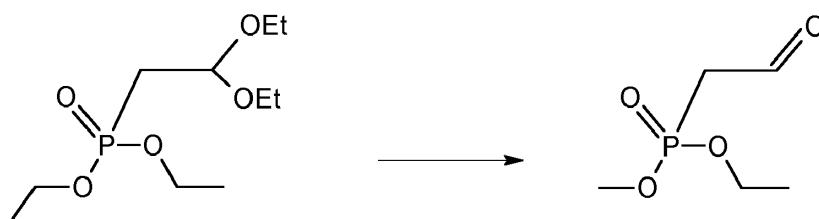
- Preparación de una sal farmacéuticamente aceptable

A una solución agitada de 36mg del producto **XIII** en 1 ml de EtOH, se añadió una solución de 4,7mg de Ácido Fumárico en 0,2 ml de EtOH. La cristalización se realizó en 3 ml de éter dietílico y el sólido obtenido se filtró obteniéndose 25 mg de sal de fumarato.

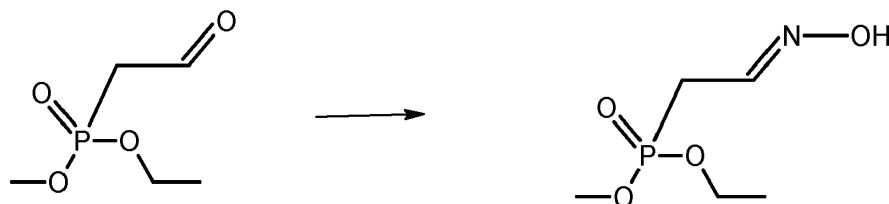
Ejemplo 10

3 β -hidroxi-5 β -10 β -metil-13 β -metil-14 β -hidroxi-17 β -(5-(2-aminometil)-isoxazol-3-il)-etenil)androstando (Cvie 110)**- Preparación del fosfonato**

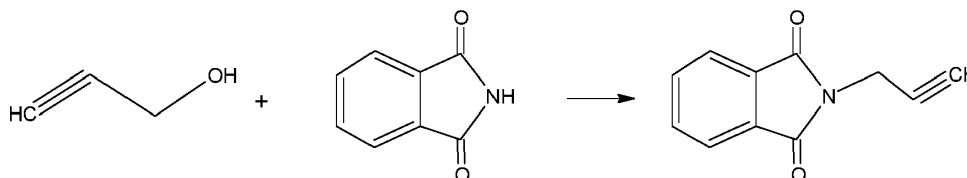
5



10 1 paso: Una solución de fosfonato (Acetale) en 45 ml de HCl (2 % en agua) se sometió a reflujo durante 10 minutos y se enfrió a temperatura ambiente. Se añaden 17 gramos de NaCl y se extrae la mezcla con CH₂Cl₂, se lava la fase orgánica con NaHCO₃ (5 % en agua) y con Salmuera, se seca sobre Na₂SO₄, se filtra y se elimina el disolvente a presión reducida, obteniéndose 10,6 gramos de aldehído.

II paso:

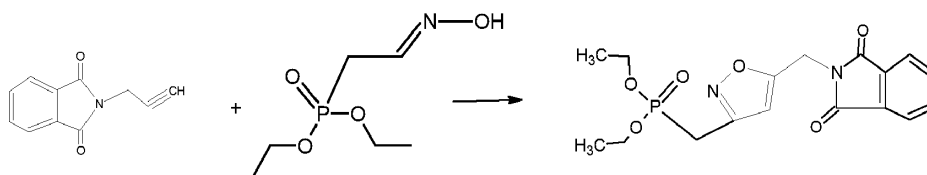
15 Una solución de 5 gramos de hidrocloreuro de hidroxilamina y 5,8 gramos de Na₂CO₃ decahidratado en 45 ml de agua se agitó a 0°C y se añadió gota a gota una solución de 10 gramos de aldehído en 30 ml de agua. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas, después se saturó con NaCl y se extrajo con CH₂Cl₂. La fase orgánica se lavó con 10 ml de agua y el disolvente se eliminó a presión reducida, obteniéndose 10 gramos de oxima

- Preparación de alquinos

20 A una solución agitada de 4 ml de 2-propin-1-ol en 250 ml de THF seco, se añadieron 36,5 gramos de PPh₃ y 20,5 gramos de Ftalimida a 0°C bajo atmósfera de nitrógeno, después se añadieron gota a gota 22 ml de DEAD y la mezcla se agitó durante 16 horas. El sólido obtenido se filtró y purificó por cromatografía instantánea (SiO₂) (Ciclohexano/AcOEt 95/5 como eluyente) y se cristalizó con MeOH para dar 3,8 gramos (30 %) de alquino.

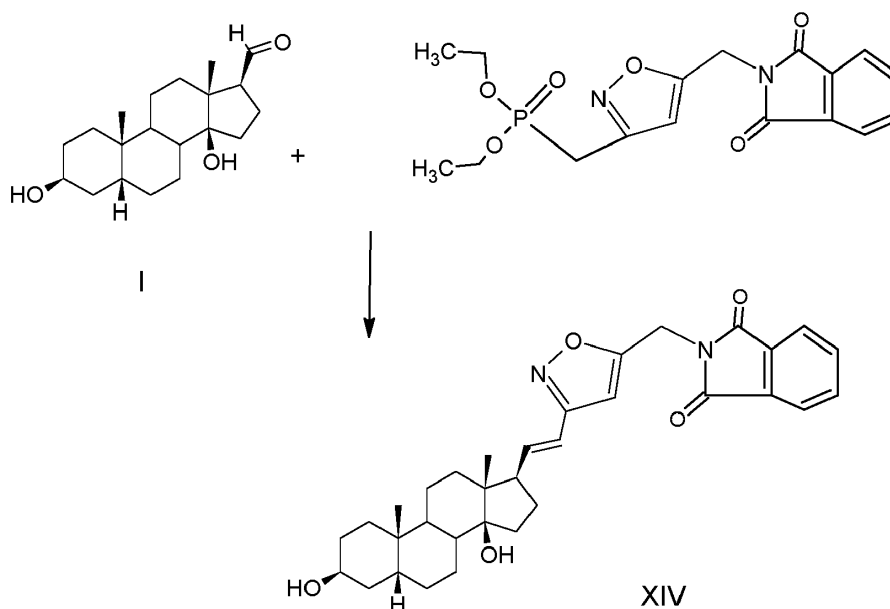
- Acoplamiento de oxima con alquino

25



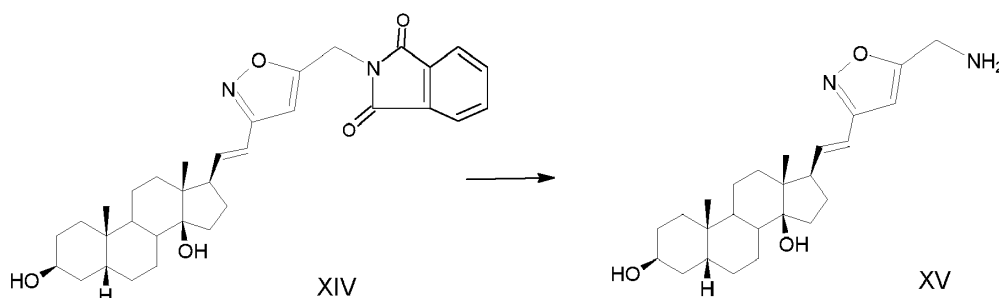
A una suspensión de 1,26 gramos de N-cloro succinimida en 15 ml de CHCl_3 , se añadieron 6 microlitros de piridina y una solución de oxima en 15 ml de CHCl_3 , y después de 5 minutos se añadieron en porción 2 gramos de alquino sólido, previamente preparado. La mezcla se calentó a 50°C y se añadieron gota a gota 1,4 ml de TEA en 5 ml de CHCl_3 en una hora. Tras agitar durante 8 horas, la reacción se apagó con agua y las fases orgánicas se separaron, el disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo crudo se purificó mediante cromatografía instantánea (SiO_2) (CH_2Cl_2 / Dietil Éter 1/1 como eluyente) para dar 1 gramo (20 %) de fosfonato de producto puro.

- Acoplamiento del aldehído I con el fosfonato



A una suspensión de 290 mg de NaH (55 % dispersado en aceite mineral) en 14 ml de THF seco, se añadió gota a gota una solución de 2,5 gramos de fosfonato en 30 ml de THF seco, a 0°C , bajo atmósfera de nitrógeno. La suspensión se dejó a temperatura ambiente durante 30 minutos y después se enfrió a 0°C . Se añadieron 1,0 gramos del compuesto I, preparado como en el Ejemplo 6, en pequeñas porciones y se dejó la mezcla en agitación durante 6 horas a temperatura ambiente. La solución se trató con NaH_2PO_4 (5 % en agua) y se extrajo con CHCl_3 . La fase orgánica se eliminó hasta sequedad a presión reducida y 2,6 gramos de residuo crudo se purificaron mediante cromatografía instantánea (SiO_2) (Heptano/Dietil Éter/ Acetona 6/3/1 como eluyente) para dar 370 mg (10 %) de producto XIV puro.

- Desprotección con hidracina



La mezcla de 370 mg del compuesto **XIV** y 0,70 ml de hidrocloreto de hidracina en 22 ml de etanol se sometió a reflujo durante 90 minutos. La mezcla se diluyó con agua, el etanol se eliminó a presión reducida y la parte acuosa residual se extrajo con CH_2Cl_2 . La fase orgánica se eliminó a sequedad a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía instantánea (SiO_2) ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ 95/5/0,5 como eluyente) para dar 150 mg (54 %) de producto puro **XV** (Cvie 110).

- Preparación de una sal farmacéuticamente aceptable

A una solución agitada de 153mg del producto **XV** en 6 ml de EtOH, se añadió una solución de 21,5mg de Ácido Fumárico en 1,5 ml de EtOH. Se añadieron 10 ml de hexano y se eliminaron los disolventes, obteniéndose un sólido vítreo en rendimiento cuantitativo.

Actividad biológica

Ejemplo 11

- Procedimientos

Cuidado de los animales

La investigación se ajusta a la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio publicada por el National Institute of Health (NIH publicación n° 85-23, revisada en 1996) y a las directrices para el cuidado de animales aprobadas por las instituciones participantes.

Mediciones bioquímicas en preparaciones sin células

Purificación de la Na,K-ATPasa renal canina y ensayo de la actividad Na,K-ATPasa

La purificación de la Na,K-ATPasa renal se realizó según el procedimiento de Jørgensen (Methods Enzymol. 1988;156:29-43). Se extirparon riñones de perros beagle machos de 1-3 años (WuXi AppTec, Suzhou Co., Ltd., 1318 Wuzhong Ave. 1318 Wuzhong Ave., Wuzhong District Suzhou, 215104 P.R. China) bajo anestesia de pentobarbital (Autorización de importación del Ministerio de Sanidad italiano 0009171-09/04/2015-DGSAF-COD_UO-P, 2015). Se cortaron los riñones y se diseccionó la médula externa, se agrupó y se suspendió (1g/10 ml) en una solución de sacarosa-histidina, que contenía 250 mM de sacarosa, 30 mM de histidina y 5 mM de EDTA, pH 7,2, y se homogeneizó. El homogeneizado se centrifugó a 6.000 g durante 15 min, el sobrenadante se decantó y se centrifugó a 48.000 g durante 30 min. El precipitado se suspendió en el tampón sacarosa-histidina y se incubó durante 20 min con una solución de sodio-decil-sulfato (SDS) disuelta en un tampón gradiente, que contenía 25 mM de imidazol y 1 mM de EDTA, pH 7,5. La muestra se colocó en la parte superior de un gradiente discontinuo de sacarosa (10, 15 y 29,4 %) y se centrifugó a 60.000 g durante 115 min. La pellase suspendió en el tampón del gradiente.

La actividad Na,K-ATPasa se ensayó "in vitro" midiendo la liberación de ^{32}P -ATP, como se describe (Ferrandi M. et al. Hypertension 1996;28(6):1018-25). Se incubaron concentraciones crecientes del ouabaína estándar, o del compuesto probado, con 0,3 μg de enzima de riñón de perro purificada durante 10 min a 37°C en 120 μl de volumen final de un medio, que contenía 140 mM NaCl, 3 mM MgCl_2 , 50 mM Hepes-Tris, 3 mM ATP, pH 7,5. A continuación, se añadieron 10 μl de solución de incubación que contenía 10 mM de KCl y 20 nCi de ^{32}P -ATP (3-10 Ci/mmol, Perkin Elmer), la reacción continuó durante 15 min a 37°C y se detuvo mediante acidificación con ácido perclórico helado al 20 % v/v. El ^{32}P se separó por centrifugación con carbón activado (Norit A, Serva) y se midió la radiactividad. La actividad inhibitoria se expresó como porcentaje de las muestras de control realizadas en ausencia de ouabaína o del compuesto ensayado. La concentración del compuesto que causa la inhibición del 50 % de la actividad de la Na,K-ATPasa (IC_{50}) se calculó utilizando un programa de regresión no lineal de múltiples parámetros (KaleidagraphTM, Sinergy Software).

Medición de la actividad SERCA2a en microsomas de retículo sarcoplásmico (RS) cardíaco

Los tejidos del ventrículo izquierdo fueron disecados, homogeneizados en 4 volúmenes de 10 mM NaHCO_3 , pH 7, 1 mM PMSF, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Aprotinina y Leupeptina y centrifugados a 12.000 g durante 15 minutos, como se publicó (Nediani C. et al. J Biol Chem. 1996;271:19066-73). Los sobrenadantes se filtraron y se centrifugaron a 100.000g durante 30 min. Las proteínas contráctiles se extrajeron suspendiendo los pellets con 0,6 M KCl, 30 mM Histidina, pH 7 y centrifugando de nuevo a 100.000 g durante 30 min. Las pellas finales se reconstituyeron con 0,3 M de sacarosa, 30 mM de histidina, pH 7.

La actividad de SERCA2a se midió "in vitro" como hidrólisis de ^{32}P -ATP a diferentes concentraciones de Ca^{2+} (100-4000 nM) en ausencia y presencia de los compuestos probados, como se describe (Micheletti R. et al. Am J Card 2007;99:24A-32A). Se preincubaron concentraciones crecientes de cada compuesto (de 1 a 100 nM) con 2 μg de microsomas durante 5 min a 4° C en 80 μl de una solución que contenía 100 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 1 μM A23187, 20 mM Tris, pH 7,5. A continuación, se añadieron 20 μl de Tris-ATP 5 mM que contenían 50 nCi de ^{32}P -ATP (3-10 Ci/mmol, Perkin Elmer). La hidrólisis de ATP continuó durante 15 min a 37°C y la reacción se detuvo mediante acidificación con 100 μl de ácido perclórico al 20 % v/v enfriado en hielo. El ^{32}P se separó por centrifugación con carbón activado (Norit A, SERVA) y se midió la radiactividad. La actividad dependiente de SERCA2a se identificó como la porción de la

actividad hidrolítica total inhibida por 10 μM de ácido ciclopiazónico (Seidler NW. et al. J Biol Chem. 1989;264:17816-23).

Las curvas dosis-respuesta se ajustaron utilizando un software de ajuste de curvas sigmoidales y se calcularon la actividad de velocidad máxima ($V_{\text{máx}}$) y la K_d Ca^{2+} (Synergy Software KaleidaGraph 3.6).

5 **Mediciones en cardiomiocitos ventriculares aislados**

Los compuestos se caracterizaron por su efecto sobre (i) la función de captación de Ca^{2+} por el RS, (ii) el potencial de acción (PA) en miocitos recién disociados de ventrículos de cobaya mediante perfusión coronaria retrógrada con solución enzimática (Rocchetti M et al. J Pharmacol Exper Therap 2005;313(1):207-215).

Función de captación de Ca^{2+} del RE (el "protocolo de carga")

- 10 Los efectos de los fármacos sobre la tasa de captación de Ca^{2+} del RE se evaluaron con un "protocolo de carga" del RE específicamente diseñado para descartar la contribución del intercambiador Na/Ca (NCX) y para evaluar la tasa de captación comenzando con niveles bajos de carga de Ca^{2+} del RE. En condiciones de pinzamiento de voltaje, la concentración intracelular de Ca^{2+} se midió dinámicamente mediante epifluorescencia (Fluo4-AM). Simultáneamente se registró la corriente de membrana, cuyo componente dependiente del tiempo reflejaba principalmente la ICaL . El
- 15 protocolo de carga del RE consistió en vaciar el RE (mediante un breve pulso de cafeína) y luego rellenarlo progresivamente mediante pasos de voltaje que activaban el influjo de Ca^{2+} a través del canal de Ca^{2+} sarcolemal (ICaL). La NCX se bloqueó omitiendo el Na^+ de las soluciones intracelular y extracelular. El procedimiento coincide con los procedimientos publicados, con pequeñas modificaciones (Rocchetti M et al. J Pharmacol Exper Therap 2005;313(1):207-215).
- 20 Los efectos de los fármacos sobre la captación de Ca^{2+} por el RS se analizaron considerando múltiples parámetros: 1) la velocidad a la que aumentó la amplitud del transitorio de Ca^{2+} (CaT) durante el protocolo de carga, que refleja la velocidad a la que se rellena el RE y 2) la constante de tiempo del decaimiento del Ca^{2+} citosólico ($T_{\text{decaimiento}}$) dentro de cada pulso, que refleja la velocidad neta de transporte de Ca^{2+} (por SERCA2a) a través de la membrana del RE (una disminución de $T_{\text{decaimiento}}$ corresponde a una mayor captación de Ca^{2+} por el RE).
- 25 La especificidad del "protocolo de carga" para detectar la activación de SERCA2a está respaldada por la observación de que no detectó ningún efecto de la digoxina, un agente inotrópico que bloquea la bomba de Na^+/K^+ , pero carece de efecto estimulante de SERCA2a (Rocchetti M et al. J Pharmacol Exp Ther 2005;313:207-215; Alemanni M et al. JMCC 2011; 50:910-918).

Mediciones del potencial de acción

- 30 El contorno del potencial de acción (PA) proporciona una estimación de primera línea de la función integrada de los canales iónicos de membrana y sus cambios pueden divulgar acciones auxiliares, que potencialmente resulten en efectos adversos del compuesto. Para aumentar la sensibilidad del contorno AP como informador, también se probaron los efectos sobre la dependencia de la velocidad de los parámetros AP, proporcionando así un enfoque multiparamétrico (más estricto).
- 35 Los PA se registraron en solución de Tyrode normal a $36,5^\circ\text{C}$. Se midieron los siguientes parámetros a 4 velocidades de estimulación (0,5-1-2-4 Hz): potencial diastólico de membrana (E_{diast}), velocidad máxima de despolarización ($dV/dt_{\text{máx}}$), duración del potencial de acción (DPA al 90 %, 50 % y 20 % de la repolarización), constante de tiempo (τ) de adaptación de la DPA tras un cambio escalonado de la velocidad de estimulación. La variabilidad de la DPA a corto plazo (VCP) durante la estimulación en estado estacionario, un índice de estabilidad de la repolarización, se midió como la suma de las desviaciones ortogonales absolutas de la línea de identidad en el gráfico $\text{APD}_n/\text{APD}_{n+1}$ (gráfico de Poincaré) (Altomare C et al, Circulation A&E 2015; 8:1265-1275).
- 40

Estudios de biodisponibilidad del fármaco en ratas

- La biodisponibilidad ha sido medida en ratas por Sundia MediTech Service, China. El compuesto ensayado CVie 101 se infundió por vía intravenosa a 1 mg/kg y se administró por vía oral a 10 mg/kg. Las concentraciones plasmáticas
- 45 del compuesto ensayado se midieron a intervalos desde el tiempo 0 hasta el tiempo 24h y se detectaron mediante el procedimiento LC-MS. Se calculó F (%).

Estudios de toxicidad de fármacos en ratones

194. Se ha determinado la toxicidad aguda en el ratón (Albino Swiss CD-1, peso corporal 30 g). Los ratones fueron tratados por vía oral, o inyectados por vía intravenosa, con la administración única de dosis crecientes de la sustancia
- 50 de ensayo para identificar la dosis que causa el 50 % de mortalidad. La mortalidad se produjo a los 30 minutos de la administración y la supervivencia a las 24h. A continuación se evaluó la toxicidad aguda (DL_{50}).

Estudios hemodinámicos para la determinación de dosis inotrópicas y letales en cobaya

Se anestesiaron cobayas (400-450 g) con uretano (1,5 g/kg ip). Se introdujo un transductor de presión de micropunta en el ventrículo izquierdo a través de la arteria carótida derecha para medir la presión ventricular (PVI); el transductor se acopló a un amplificador de transductor. Las grabaciones se introdujeron en un polígrafo y se analizaron. Se insertó una cánula de polietileno en una vena yugular para la infusión del fármaco. Tras un período de estabilización, se inyectó la sustancia de ensayo a razón de 0,16 ml/min durante 90 min (Micheletti R et al. J Pharmacol Exp Ther 2002; 303:592-600).

Se obtuvieron los siguientes parámetros: frecuencia cardiaca (FC), presión ventricular izquierda (PVI), velocidad máxima de aumento (+dP/dtmáx) y decaimiento (-dP/dtmáx) de la presión, ECG. Para la inotropía, se identificó el tiempo transcurrido hasta que la +dP/dtmáx aumentó en un 80 % para determinar la ED80 (dosis que aumenta la +dP/dtmáx basal en un 80 %). También se identificó el tiempo transcurrido hasta el aumento máximo de +dP/dtmáx para determinar la dosis máxima eficaz, EDmáx. La lusitropía se caracterizó por la dosis que inducía la máxima disminución de -dP/dtmáx, (EDmáx). Como índices de toxicidad, se calcularon la dosis administrada hasta la aparición de arritmias y la dosis que induce la muerte (LD). También se calculó el coeficiente de seguridad del compuesto ensayado como la relación entre LD y ED80.

CVie 101 fue infundido iv a 0,2 y 0,4 mg/kg/min en comparación con el compuesto de referencia Digoxin, administrado a 0,016 mg/kg/min durante 90 min.

Estudios hemodinámicos en rata diabética con estreptozotocina (ecocardiografía 2M-Doppler-Doppler tisular)

Se hizo diabéticas a ratas macho Sprague Dawley (150-175 g) mediante una única inyección en la vena de la cola de una solución de estreptozotocina (STZ, 50 mg/kg, Sigma-Aldrich), recién preparada en tampón citrato sódico 0,1 M, pH 4,5. Las ratas de control recibieron tampón citrato. La glucemia en ayunas se midió al cabo de 1 semana y las ratas con valores > 400 mg/dl se consideraron diabéticas.

Ocho-nueve semanas después de la inyección de STZ, las ratas fueron sometidas a una evaluación ecocardiográfica transtorácica y Doppler realizada bajo anestesia pentobarbital. Se utilizaron registros en modo M guiados bidimensionalmente para obtener mediciones en el eje corto del diámetro telediastólico del ventrículo izquierdo (DTSVI), el diámetro telesistólico del ventrículo izquierdo (DTSVI) y el grosor de la pared diastólica posterior (PW) y septal (SW) según las directrices de la American Society of Echocardiography (Lang RM et al. Eur J Echocardiography 2006; 7:79-108). El acortamiento fraccional se calculó como $FS = (LVEDD - LVESD) / LVEDD$. El grosor relativo de la pared se calculó como $PWTd + IVSTd / LVEDD$.

El flujo de entrada mitral fue medido por Doppler pulsado en las puntas de las valvas mitrales desde una vista apical de 4 cámaras para obtener las velocidades de llenado temprano y tardío (E, A) y el tiempo de desaceleración de la velocidad de llenado temprano (DT). La pendiente de desaceleración se calculó como la relación E/DT. El índice de desaceleración mitral se calculó como la relación DT/E.

La Imagen Doppler Tisular (TDI) fue evaluada desde la vista apical de 4 cámaras para registrar los movimientos anulares mitrales septales, es decir, el pico sistólico miocárdico (s') y la velocidad diastólica temprana y tardía (e' y a').

El compuesto CVie 101 fue administrado oralmente a ratas inyectadas con STZ a la dosis de 20 mg/kg y los parámetros ecocardiográficos fueron medidos después de 1h. La digoxina, a 20 mg/kg os, se utilizó como fármaco de referencia.

Análisis estadístico

Experimentos con animales enteros: Los datos se expresan como media $\pm$ DE. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t de Student (prueba t pareada).

Experimentos con miocitos aislados: Los datos se expresan como media $\pm$ SE. Las curvas que incluían múltiples medias se compararon mediante ANOVA de dos vías para medidas repetidas; los cambios inducidos por fármacos en la inclinación global de la curva se definieron según la significación de la interacción "factor X grupo". Debido a un ajuste monoexponencial inadecuado del decaimiento del Ca^{2+} , el $T_{decaimiento}$ no se estimó en unas pocas células para las que se informan datos de CaT ; el tamaño de la muestra (N) informado en la Figura 1 ($N \geq 13$ para CVie 101 y $N \geq 11$ para CVie 102) se refiere a células para las que se disponía de todos los parámetros. La dependencia de la VCP de la DPA media se cuantificó mediante regresión lineal.

$P < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo en todas las comparaciones.

Resultados biológicos

- Cribado in vitro

Inhibición de la actividad de la Na,K-ATPasa renal canina

Los compuestos probados inhibieron la actividad enzimática de la Na,K-ATPasa purificada con IC_{50} , expresada en μM , como se muestra en la Tabla 1. Los compuestos se han comparado con los fármacos de referencia Digoxina y Digoxigenina (Tabla 1).

Tabla 1 Inhibición de la Na,K-ATPasa renal canina

Compuesto	IC ₅₀ , μ M
DIGOXINA	0,3
DIGOXIGENINA	0,23
CVie 101	0,71
CVie 102	1,7
CVie 103	4,0
CVie 104	1,61
CVie 105	0,53
CVie 106	10,0
CVie 107	0,15
CVie 108	3,3
CVie 109	1,0
CVie 110	0,33

Actividad de la ATPasa SERCA2a en microsomas RS derivados de corazón de perro normal

5 Los compuestos han sido probados en la actividad SERCA2a en un intervalo de concentraciones de 1-100 nM. Para las mediciones en preparaciones caninas normales, el efecto de los compuestos se ha expresado como % de aumento de la actividad V_{máx} de SERCA2a de una muestra de control realizada en ausencia del compuesto (Tabla 2). Los datos son la media $\pm$ DE, n = número de experimentos, *al menos $p < 0,05$.

10 A concentraciones nanomolares, los compuestos probados estimularon la actividad V_{máx} de SERCA2a de preparaciones de corazón de perro normal (Tabla 2). Estos resultados indican un efecto lusitrópico de los compuestos ensayados. A diferencia de éstos, la digoxina no estimuló la actividad de SERCA2a (Rocchetti M et al. J Pharmacol Exp Ther 2005;313:207-215; Ferrandi M et al. Br J Pharmacol 2013;169:1849-61).

Tabla 2 Actividad de la ATPasa SERCA2a en microsomas RS derivados de corazón de perro normal

Compuesto	Concentración nM	V _{máx} (μ mol/min/ mg prot) media $\pm$ SD	% de aumento frente a Control * $p < 0,05$
CVie 101	0	2,373 $\pm$ 0,079 (n=7)	0
	10 nM	2,737 $\pm$ 0,336 (n=7)	15 %*
	100 nM	2,832 $\pm$ 0,198 (n=7)	19 %*
CVie 102	0	2,359 $\pm$ 0,192 (n=11)	0
	1 nM	2,949 $\pm$ 0,321 (n=6)	25 %*
	10 nM	2,660 $\pm$ 0,232 (n=12)	13 %*
CVie 103	0	2,320 $\pm$ 0,149 (n=7)	0

Compuesto	Concentración nM	V _{máx} (μmol/min/ mg prot) media ± SD	% de aumento frente a Control *p<0,05
	10 nM	2,569 ± 0,278 (n=7)	11 %*
	100 nM	2,688 ± 0,285 (n=7)	16 %*
CVie 104	0	1,290 ± 0,138 (n=4)	0
	1 nM	1,437 ± 0,158 (n=4)	11 %*
	10 nM	1,551 ± 0,275 (n=4)	20 %*
CVie 106	0	2,553 ± 0,216 (n=6)	0
	1 nM	3,113 ± 0,157 (n=3)	22 %*
	10 nM	2,935 ± 0,403 (n=3)	15 %
CVie 107	0	2,346 ± 0,109 (n=3)	0
	10 nM	2,508 ± 0,339 (n=3)	7 %
	100 nM	2,751 ± 0,171 (n=3)	17 %*
CVie 108	0	2,562 ± 0,214 (n=8)	0
	1 nM	2,94 ± 0,306 (n=3)	15 %
	10 nM	2,980 ± 0,441 (n=4)	16 %*
CVie 109	0	2,518 ± 0,244 (n=4)	0
	10 nM	2,859 ± 0,504 (n=4)	14 %
	100 nM	2,889 ± 0,305 (n=4)	15 %*
CVie 110	0	2,457 ± 0,198 (n=5)	0
	1 nM	2,924 ± 0,549 (n=3)	19 %
	10 nM	2,903 ± 0,188 (n=3)	18 %*

- Estudios en cardiomiocitos intactos

Evaluación funcional en cardiomiocitos aislados de cobaya

Función de captación de Ca²⁺ de RS (el "Protocolo de Carga")

- 5 El CVie 101 (100 nM) aumentó la tasa de incremento del transitorio de Ca²⁺ (CaT) durante la recarga del RS (Fig. 1A) y, una vez que la amplitud del CaT alcanzó un valor umbral (en el 5º pulso), disminuyó la constante de tiempo del decaimiento del Ca²⁺ citosólico dentro de cada pulso (T_{decaimiento}, Figura 1B).

Similarmente, CVie 102 (100 nM) incrementó la tasa de incremento de CaT durante el protocolo (Fig. 1C) y redujo el T_{decaimiento} dentro de cada pulso (Fig. 1D).

- 10 Estos resultados convergen para indicar que el CVie 101 y el CVie 102 aumentaron significativamente la captación de Ca²⁺ por el RS. Bajo las condiciones experimentales aplicadas, la captación de Ca²⁺ por el RS fue totalmente apoyada por la SERCA2a; por lo tanto, los resultados son consistentes con la activación de la SERCA2a por los dos agentes.

Mediciones del potencial de acción

El contorno del potencial de acción (PA) proporciona una estimación de la función integrada de los canales iónicos de membrana y sus cambios pueden revelar acciones auxiliares que potencialmente pueden resultar en efectos adversos de los compuestos. Para ello, se evaluaron los efectos de los fármacos sobre los parámetros de la PA. A la misma concentración que ejerce un efecto significativo sobre SERCA2a (100 nM), CVie 101 no afectó al potencial de membrana diastólico (E_{diast} , Fig. 2A), a la velocidad máxima de despolarización ($dV/dt_{máx}$, Fig. 2B), la duración del potencial de acción (DPA al 90 %, 50 % y 20 % de la repolarización) y su dependencia de la longitud del ciclo en estado estacionario (Fig. 2C). La constante de tiempo (τ) de la adaptación de la DPA tras un cambio escalonado en la longitud del ciclo no fue acortada por el fármaco (Fig. 2D). La variabilidad a corto plazo de la DPA (VCP), medida en 4 frecuencias diferentes por separado (0,5-1-2-4 Hz) (Fig. 3A-B-C-D), o agrupada (Fig. 3E), tampoco se vio afectada por el CVie 101. Estos resultados indican que el CVie 101 no influyó en la actividad eléctrica de los miocitos.

CVie 102 es un compuesto estructuralmente relacionado con CVie 101 y por lo tanto CVie 102 no ha sido probado en parámetros AP porque se esperaba que fuera inactivo.

Colectivamente, el enfoque multiparamétrico utilizado para el análisis AP demuestra claramente la ausencia de efectos indeseados del medicamento CVie 101 sobre la actividad eléctrica cardíaca. Lo mismo ocurre con la CVie 102. Por lo tanto, estas dos moléculas son compuestos selectivos para la modulación de SERCA2a (fármaco lusitrópico positivo).

- Estudios in vivo

Biodisponibilidad en ratas

La biodisponibilidad del CVie 101 ha sido medida en ratas tras una inyección intravenosa (i.v.) de 1 mg/kg y una administración oral (os) a 10 mg/kg por Sundia MediTech Service, China. Las concentraciones plasmáticas del compuesto ensayado CVie 101 se midieron a intervalos desde el tiempo 0 hasta el tiempo 24h y se detectaron por el procedimiento LC-MS (Fig. 4). Se ha calculado el valor F (%) y ha resultado ser del 66,3 % (Tabla 3).

Tabla 3 Parámetros de biodisponibilidad de CVie 101 en ratas

Parámetros de biodisponibilidad		
	Media	SD
HL_Lambda_z (T1/2.h)	2,21	0,72
T _{máx} (h)	0,50	0,00
C _{máx} (ng/mL)	1020,9	340,4
AUC _{last} (h*ng/mL)	2428,5	1540,3
AUC _{INF_pred} (h*ng/mL)	2493,7	1494,0
MRT _{last} (h)	2,03	0,56
V _{z_F_pred} (L/kg)	14,29	5,03
Cl _{F_pred} (L/h/kg)	4,88	2,19
λ_z Intervalo de tiempo de cálculo (h)	NA	NA
F (%)	66,3	42,07

Toxicidad aguda en el ratón

La toxicidad aguda del compuesto ensayado CVie 101 se ha determinado en el ratón (Albino Swiss CD-1, peso corporal 30 g). El CVie 101 se ha administrado por vía oral o se ha inyectado por vía intravenosa a dosis crecientes para identificar la dosis que causa un 50 % de mortalidad. La mortalidad se produjo a los 30 minutos de la administración y la supervivencia a las 24h.

Los resultados para la toxicidad aguda de CVie 101 se reportan en la Tabla 4. Como comparación, también se ha incluido la toxicidad aguda para el compuesto de referencia Digoxina, según los datos de la literatura (www.lookchem.com, Reference for Digoxin i.v.: Afifi AM, Ammar EM. Comunicaciones sobre investigación farmacológica. Vol. 6, Pg. 417, 1974, Referencia para Digoxina os: Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie. Vol. 153, Pg. 436, 1965) (Tabla 4).

Tabla 4 Toxicidad aguda (DL₅₀) de Digoxina y CVie 101 en ratón

Compuesto	DL ₅₀ mg/kg
CVie 101 i.v.	20
CVie 101 os	350
Digoxina i.v. <i>datos de la literatura</i>	7,7
Digoxin os <i>datos de la literatura</i>	17,8

Dosis inotrópica y letal en cobaya

Los parámetros hemodinámicos se han medido en cobayos después de 90 min de una infusión i.v. lenta de Digoxina a 0,016 mg/kg/min, CVie 101 a 0,2 y 0,5 mg/kg/min y CVie 102 a 0,3 mg/kg/min. La Tabla 5 resume los parámetros. El CVie 101 produjo un aumento de la dP/dtmáx que alcanzó el 80 % (ED₈₀) a la dosis acumulada de 1,6 y 2,34 mg/kg y un pico de 163,6 % y 278,7 % sobre la basal, respectivamente, a la dosis (EDmáx) de 3,73 y 7,49 mg/kg. El CVie 102 produjo un aumento de la dP/dtmáx con una ED₈₀ a la dosis acumulada de 3,8 mg/kg y un pico del 138,3 % sobre la basal a la dosis (EDmáx) de 8,6 mg/kg. La digoxina produjo un aumento del 128 % a la dosis acumulada (EDmáx) de 0,96 mg/kg y una ED₈₀ de 0,69 mg/kg. El perfil de seguridad de CVie 101 y CVie 102 pareció sistemáticamente mejor que el de Digoxina en términos de dosis letal (DL), número de animales muertos/tratados y relación DL/ED₈₀ (Tabla 5).

Tabla 5 Hemodinámica de Digoxina, CVie 101 y CVie 102 en cobaya

Compuesto	Dosis mg/kg/min	E máx % de aumento dP/dtmáx	ED máx mg/kg	ED ₈₀ mg/kg	Dosis letal mg/kg	Número de muertos/tratados	LD/ED ₈₀
Digoxina	0,016	128,04	0,96	0,69	1,20	5/7	2,41
CVie 101	0,2	163,6	3,73	1,60	> 18	1/8	s.f.
	0,5	216,8	5,08	2,74	28,2	8/8	11,32
CVie 102	0,3	138,3	8,6	3,8	12,57	11/11	5,42

Hemodinámica en ratas diabéticas con estreptozotocina (ecocardiografía 2M-Doppler-Doppler tisular)

La Tabla 6 muestra la comparación entre el vehículo (solución salina), CVie 101 y Digoxina, ambos a 20 mg/kg, antes y después de 1h de tratamiento oral sobre los parámetros hemodinámicos en ratas diabéticas STZ. Los datos son la media ± DE; los valores con asterisco son estadísticamente significativos con al menos $p < 0,05$.

Los datos indican que en un modelo animal caracterizado por una disfunción diastólica, como las ratas diabéticas con estreptozotocina, el CVie 101 mejoró la función diastólica con una reducción significativa de la relación E/e', un aumento de e' asociado a un aumento de SV, sin ningún cambio de la frecuencia cardíaca (Tabla 6). Por el contrario, la Digoxina indujo efectos opuestos: aumentó la relación E/e', incrementó la frecuencia cardíaca y no afectó al volumen sistólico. Los diferentes efectos de la CVie 101 y la Digoxina sobre la función cardíaca alterada de las ratas STZ son coherentes con la actividad estimuladora de la SERCA2a de la CVie 101 que, al corregir la relajación cardíaca deprimida, aumenta la cantidad de sangre disponible para la contracción, dando lugar así a un aumento del SV producido por la CVie 101 pero no por la Digoxina.

Tabla 6 Parámetros hemodinámicos después de tratamiento oral con Digoxina y CV101 de ratas diabéticas con STZ

Función	Eco Parámetro	Solución salina antes (n=12)	Solución salina después (n=12)	Cvie101 Antes (n=12)	Cvie101 20 mg/kg después (n=12)	DIGO Antes (n=12)	DIGO 20 mg/kg Después (n=12)
Sistólica	FS	41.7±5.18	40.8±4.28	39.6±4.9	45.1±3.4*	42.6±3.32	47.2±3.24*
	S'	24.0±2.16	23.5±2.71	23.3±2.5	23.8±3.6	24.2±2.53	26.7±2.77*
Diastólica	E	0.98±0.1	0.96±0.1	0.90±0.1	0.96±0.14*	0.92±0.1	1.02±0.13*
	A	0.89±0.16	0.80±0.11*	0.75±0.13	0.76±0.17	0.79±0.18	0.92±0.1*
	E/A	1.11±0.13	1.22±0.16*	1.22±0.15	1.29±0.22	1.19±0.19	1.11±0.16
	DT	46±12.4	50.9±5.99	53.2±4.6	47.7±4.8*	50.2±9.08	39.2±9.34*
	DT/E	47.8±15.1	53.5±8.0	60.2±13.2	51.0±10.2*	55.6 ±12.2	39.2±11.2*
	E/DT	23.2±8.5	19.0±2.8*	17.1±2.6	20.3±4.1*	19.2±6.5	27.9±9.8*
	E/e'	42.2±6.2	40.9±5.7	40.36 ± 4.5	38.0±4.9*	39.4±5.27	43.1±4.9*

Función	Eco Parámetro	Solución salina antes (n=12)	Solución salina después (n=12)	Cvie101 Antes (n=12)	Cvie101 20 mg/kg después (n=12)	DIGO Antes (n=12)	DIGO 20 mg/kg Después (n=12)
	E'	23.3±1.4	23.5±2.0	22.4±1.29	25.2±1.9*	23.4±1.79	23.7±1.35
	A'	30.8±4.0	29.7±4.1	27.3±6.2	28.7±6.6	29.0±6	35.8±5*
GLOBAL	CO	246.1±45.3	238.7±41.6	195.8±61.1	219.0±76.7	215±51.3	246.8±72*
	HR	293±35	298±33	275± 34.6	262±48.1	273.1±29	308±39*
	SV	0.84±0.13	0.80±0.11	0.70±0.16	0.82±0.21*	0.78±0.14	0.80±0.19

Leyenda: FS %: Acortamiento fraccional, función sistólica; E m/s: velocidad de llenado temprano de flujo de entrada mitral; E/A: Índice de función VI; DT ms: pendiente de desaceleración; s' cm/s TDI: velocidad de contracción, e' cm/s TDI: velocidad de relajación temprana; a' cm/s TDI: velocidad de relajación tardía; índice e'/a' de prevalencia de disfunción diastólica; E/e': Índice de presión de llenado de LV; CO ml/min: gasto cardíaco; ritmo FC/min: frecuencia cardíaca; SV ml/ritmo: volumen sistólico.

Ensayo de unión a receptores

- 5 La unión del radioligando a un panel de receptores fue llevada a cabo por Eurofins en preparaciones de membrana cruda de acuerdo con los procedimientos publicados y utilizando el estándar de referencia apropiado (Eurofins, código de compuesto CVie 101 PT # 1207859, estudio # AB76416, cita # 68407-1, para Cvie Therapeutics Limited, Taiwán (R.O.C.) el 05 de marzo de 2017). El CVie 101 se probó a una concentración de 10 µM. No se documentó ninguna interacción significativa, excepto para el Canal de Sodio, sitio 2 de la rata (cat # 279510), donde se observó una respuesta significativa (≥ 50 %) (Tabla 7).

- 10 Tabla 7 Ensayo de unión a receptores para CVie 101

Cat #	Nombre del ensayo	Lote	Especie	Rep.	Conc	% inhib. de
107480	ATPasa, Ca++, músculo esquelético, cerdo	401881	cerdo	2	10 µM	14
118040	CYP450, 19	401501	hum	2	10 µM	36
124010	HMG-CoA Reductasa	401548	hum	2	10 µM	7
Cat #	Nombre del ensayo	Lote	Especie	Rep	Conc	% inhib. de
140010	Monoaminoxidasa MAO-A	401605	hum	2	10 µM	4
140120	Monoaminoxidasa MAO-B	401606	hum	2	10 µM	4

ES 2 949 701 T3

Cat #	Nombre del ensayo	Lote	Especie	Rep.	Conc	% de inhib.
107300	Peptidasa, enzima convertidora de angiotensina	401611	conejo	2	10 μ M	5
164610	Peptidasa, Renina	401717	hum	2	10 μ M	3
152000	Fosfodiesterasa PDE3	401702	hum	2	10 μ M	-16
200510	Adenosina A1	401527	hum	2	10 μ M	-4
200610	Adenosina A2A	401527	hum	2	10 μ M	0
203100	Adrenérgico α 1A	401626	rata	2	10 μ M	1
203200	Adrenérgico α 1B	401528	rata	2	10 μ M	0
203630	Adrenérgico α 2A	401629	hum	2	10 μ M	-7
204010	Adrenérgico β 1	401529	hum	2	10 μ M	-4
204110	Adrenérgico β 2	401638	hum	2	10 μ M	1
204600	Aldosterona	401887	rata	2	10 μ M	6
206000	Andrógenos (testosterona)	401738	hum	2	10 μ M	1
210030	Angiotensina AT1	401493	hum	2	10 μ M	12
210120	Angiotensina AT2	401493	hum	2	10 μ M	-1
214600	Canal de calcio tipo L, Dihidropiridina	401530	rata	2	10 μ M	-8
219500	Dopamina D1	401581	hum	2	10 μ M	-5
219700	Dopamina D2	401582	hum	2	10 μ M	4
219800	Dopamina D3	401573	hum	2	10 μ M	7
226010	Estrógeno ER α	401648	hum	2	10 μ M	14

ES 2 949 701 T3

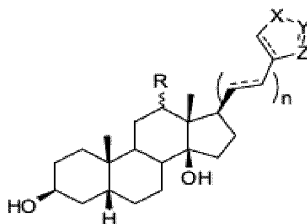
Cat #	Nombre del ensayo	Lote	Especie	Rep.	Conc	% inhib.	de
226050	Estrógeno ER β	401535	hum	2	10 μ M	17	
226600	GABA _A , Flunitrazepam, Central	401654	rata	2	10 μ M	6	
226500	GABA _A , Muscimol, Central	401653	rata	2	10 μ M	-9	
232030	Glucocorticoides	401564	hum	2	10 μ M	10	
233000	Glutamato, NMDA, fenciclidina	401525	rata	2	10 μ M	7	
239610	Histamina H1	401531	hum	2	10 μ M	13	
241000	Imidazolina I2, Central	401657	rata	2	10 μ M	25	
243000	Insulina	401578	rata	2	10 μ M	-7	
252710	Muscarínico M2	401658	hum	2	10 μ M	7	
252810	Muscarínico M3	401659	hum	2	10 μ M	15	
253010	Muscarínico M5	401562	hum	2	10 μ M	21	
258590	Acetilcolina nicotínica	401636	hum	2	10 μ M	2	
260410	Opiáceos μ (OP3, MOP)	401532	hum	2	10 μ M	19	
264500	Éster de forbol	401662	ratón	2	10 μ M	-4	
265600	Canal de potasio (K _{ATP})	401663	ham	2	10 μ M	-6	
265900	Canal de potasio hERG	401868	hum	2	10 μ M	4	
299005	Progesterona PR-B	401590	hum	2	10 μ M	10	
270300	Ryanodina Ry R3	401776	rata	2	10 μ M	8	
271010	Serotonina (5-Hidroxitriptamina) 5-HT1, no selectiva	401498	rata	2	10 μ M	7	

ES 2 949 701 T3

Cat #	Nombre del ensayo	Lote	Especie	Rep.	Conc	% de inhib.
299007	Sigma $\sigma 2$	401500	hum	2	10 μ M	30
278110	Sigma $\sigma 1$	401499	hum	2	10 μ M	23
279510	Canal de sodio, sitio 2	401686	rata	2	10 μ M	50
204410	Transportador, Norepinefrina (NET)	401639	hum	2	10 μ M	2
Nota: El lote representa compuestos probados simultáneamente en el mismo(s) ensayo(s); bov=Vacuno; ham=Hámster; hum=Humano						

REIVINDICACIONES

1. Compuestos de fórmula (I)



donde X, Y, Z son átomos anulares comprendidos en un anillo carbocíclico o heterocíclico de cinco miembros, seleccionado del grupo que consiste en CH, NH, N, O, S; dicho anillo heterocíclico seleccionado del grupo que consiste en imidazolilo, pirazolilo, tiazolilo, isoxazolilo, y los correspondientes dihidro- y tetrahidro; dicho anillo carbocíclico o heterocíclico está opcionalmente sustituido con amino (C₁-C₄) alquilo lineal o ramificado o guanidina o guanidino (C₁-C₄) alquilo lineal o ramificado;

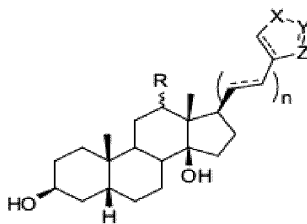
n es 0 o 1;

R es H u OH;

la línea de puntos representa un doble enlace opcional C=C; la línea gruesa representa un enlace en la configuración β; la línea ondulada representa un enlace tanto en la configuración α como en la β; o

sales, solvatos o hidratos farmacéuticamente aceptables de los mismos.

2. Compuestos de fórmula (I)



donde X, Y, Z son átomos anulares comprendidos en un anillo carbocíclico o heterocíclico de cinco miembros, seleccionado del grupo que consiste en CH, NH, N, O, S; dicho anillo carbocíclico o heterocíclico está opcionalmente sustituido con amino (C₁-C₄) alquilo lineal o ramificado o guanidina o guanidino (C₁-C₄) alquilo lineal o ramificado;

con la condición de que el anillo heterociclo no sea furilo;

n es 1 y existe un enlace simple o doble entre el esqueleto de androstano y el anillo 17β-heterociclilo o carbociclilo;

R es H u OH;

la línea de puntos representa un doble enlace opcional C=C; la línea gruesa representa un enlace en la configuración β; la línea ondulada representa un enlace tanto en la configuración α como en la β; o

sales, solvatos o hidratos farmacéuticamente aceptables de los mismos.

3. Compuestos de acuerdo con la reivindicación 2, en los que el grupo heterociclo en posición 17β se selecciona del grupo que consiste en imidazolilo, pirazolilo, tiazolilo, isoxazolilo, los correspondientes dihidro- y tetrahidroderivados, opcionalmente sustituidos por un amino(C₁-C₄) alquilo lineal o ramificado o guanidina o guanidino (C₁-C₄) alquilo lineal o ramificado.

4. Compuestos según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en los que R es beta OH.

5. Compuestos de acuerdo con la reivindicación 1, en los que el símbolo n es 0.

6. Compuestos de acuerdo con la reivindicación 1, en los que el símbolo n es 1 y existe un enlace simple o doble entre el esqueleto de androstano y el anillo 17β-heterociclilo o carbociclilo.

7. Compuestos según las reivindicaciones 1 o 2, seleccionados del grupo que consiste en

- 3 β -hidroxi-5 β -10 β -metil-13 β -metil-14 β -hidroxi-17 β -(imidazol-4-il)androstano;
 - 3 β -hidroxi-5 β -10 β -metil-13 β -metil-14 β -hidroxi-17 β -(2-guanidino-tiazol-4-il)androstano;
 - 3 β -hidroxi-5 β -10 β -metil-12 β -hidroxi-13 β -metil-14 β -hidroxi-17 β -(imidazol-4-il)androstano;
 - 3 β -hidroxi-5 β -10 β -metil-12 β -hidroxi-13 β -metil-14 β -hidroxi-17 β -(2-guanidino-tiazol-4-il)androstano.
 - 5 - 3 β -hidroxi-5 β -10 β -metil-13 β -metil-14 β -hidroxi-17 β -(N-(3-aminopropil)-imidazol-4-il)androstano;
 - 3 β -hidroxi-5 β -10 β -metil-13 β -metil-14 β -hidroxi-17 β -(pirazol-3-il)androstano;
 - 3 β -hidroxi-5 β -10 β -metil-13 β -metil-14 β -hidroxi-17 β -((5-(3-aminopropil)-isoxazol-3-il))androstano;
 - 3 β -hidroxi-5 β -10 β -metil-13 β -metil-14 β -hidroxi-17 β -((5-(3-aminopropil)-isoxazol-3-il)-etil)androstano;
 - 3 β -hidroxi-5 β -10 β -metil-13 β -metil-14 β -hidroxi-17 β -(5-(2-aminoetil)-isoxazol-3-il)-etil)androstano;
 - 10 - 3 β -hidroxi-5 β -10 β -metil-13 β -metil-14 β -hidroxi-17 β -(5-(2-aminometil)-isoxazol-3-il)-etenil)androstano.
8. Compuestos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en los que la sal farmacéuticamente aceptable se selecciona entre cloruro, bromuro, sulfato, fosfato, nitrato, fumarato, succinato, oxalato, malato, tartrato, maleato, citrato, metanosulfonato, benzoato.
9. Una composición farmacéutica que comprende uno o más de los compuestos de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en combinación con al menos un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 15 10. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9, formulada para administración enteral o parenteral o inhalación.
11. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10, formulada para administración oral.
12. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10, formulada para inyección intravenosa o intramuscular.
- 20 13. Una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9-12, que comprende además uno o más principios terapéuticamente activos.
14. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 13, en la que dicho ingrediente terapéuticamente activo adicional se selecciona entre los agentes terapéuticos para tratar la insuficiencia cardíaca.
- 25 15. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 14, en la que dicho ingrediente terapéuticamente activo adicional se selecciona entre inhibidores de la ECA, AIRBs, diuréticos, bloqueadores de los canales de Ca, bloqueadores β , digitálicos, donantes de NO, vasodilatadores, Estimuladores de SERCA2a, inhibidores de la neprilisina (NEP), activadores del filamento de miosina, mediadores de relaxina-2 recombinante, proteína NP recombinante, activadores de la guanilato ciclasa soluble (sGC), ligando de beta-arrestina del receptor de angiotensina II.
- 30 16. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 15, en la que dicho diurético, se selecciona entre furosemida, bumetanida, torasemida, metolazona, un antagonista de la aldosterona, en particular espironolactona y eplerenona; diuréticos tiazídicos, en particular hidroclorotiazida, metolazona, clortalidona.
17. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 15, en la que dicho inhibidor de la ECA se selecciona entre Lisinopril y Ramipril.
- 35 18. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 15, en la que dicho bloqueador del receptor de angiotensina II se selecciona entre valsartán, candesartán, olmesartán, telmisartán y losartán.
19. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 15, en la que dicho inhibidor del receptor de angiotensina/neprilisina es sacubitril.
- 40 20. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 15, en la que dicho betabloqueador se selecciona entre carvedilol y metoprolol.
21. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 15, en la que dicho vasodilatador se selecciona entre hidralazina, opcionalmente combinada con dinitrato de isosorbida, nitratos, en particular nitroglicerina o nitrato de isosorbida, amlodipino, felodipino, no dihidropiridinas, en particular diltiazem o verapamilo.
- 45 22. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 15, en la que dicho agente para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca se selecciona entre Digoxina, entresto, omecantiv, serelaxina, ularitida, levosimendan.

23. Compuestos de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para su uso como medicamentos.

24. Compuestos de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para su uso en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca.

5 25. Compuestos para uso de acuerdo con la reivindicación 24 en combinación con uno o más agentes terapéuticamente activos divulgados en cualquiera de las reivindicaciones 14-22.

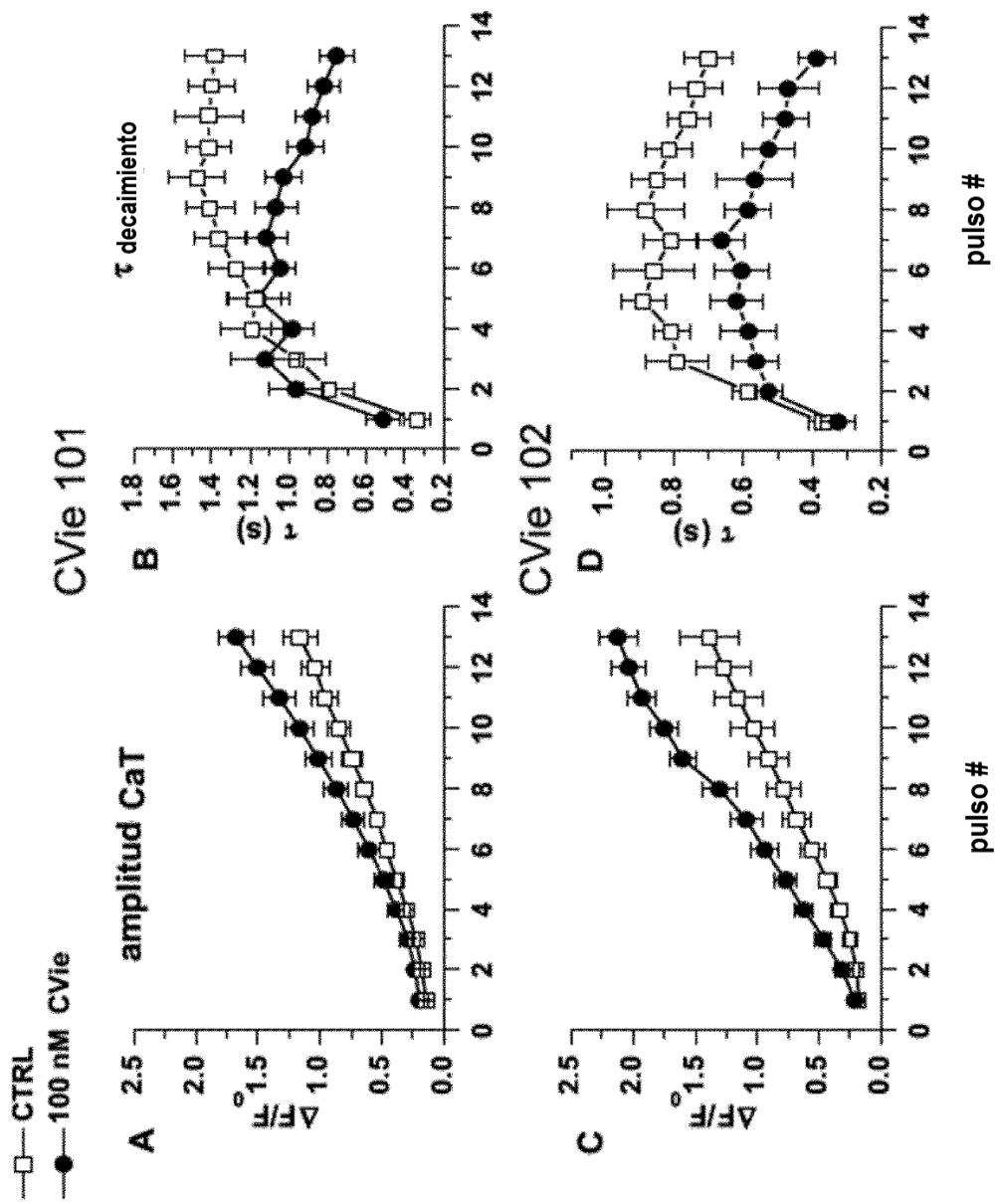


FIG. 1

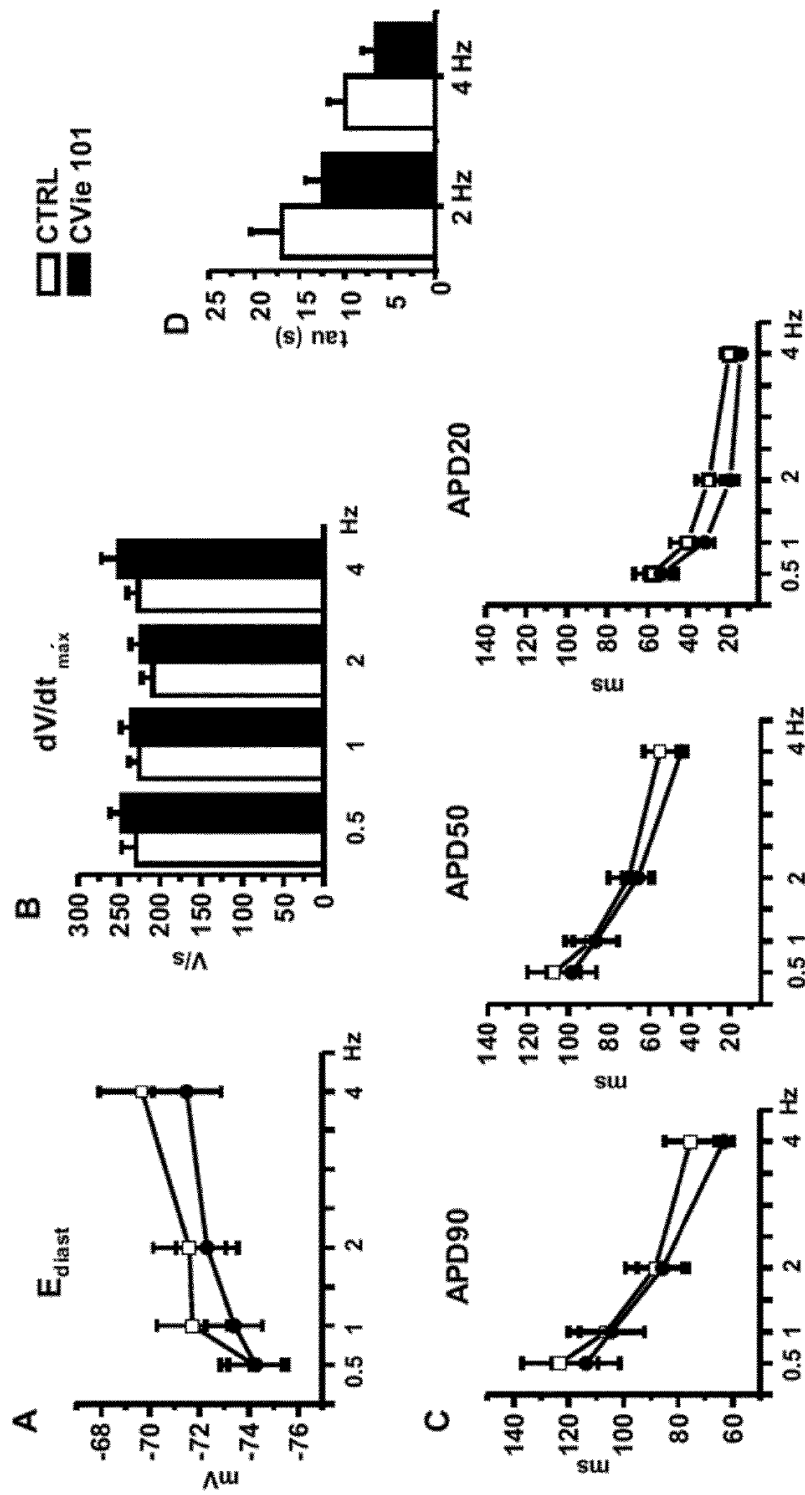


FIG. 2

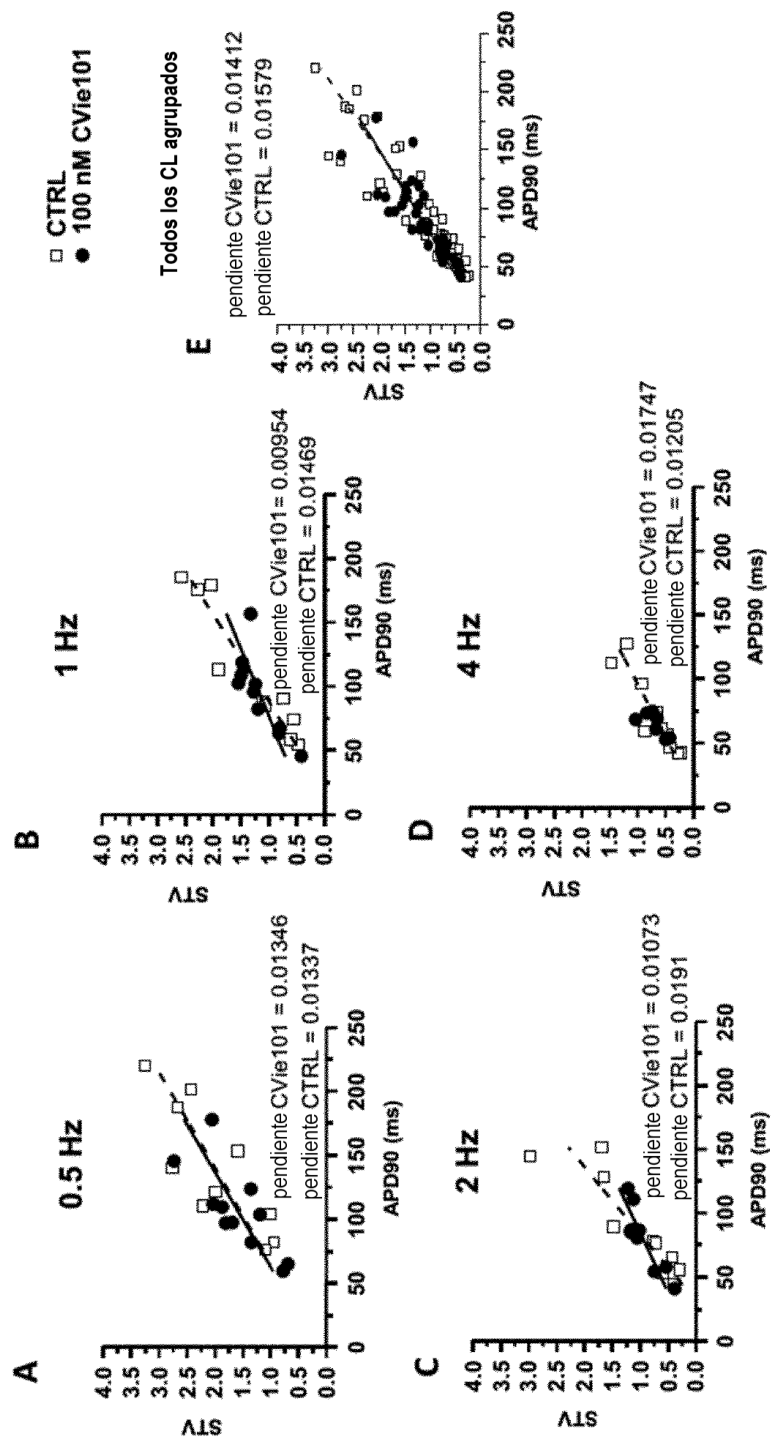


FIG. 3

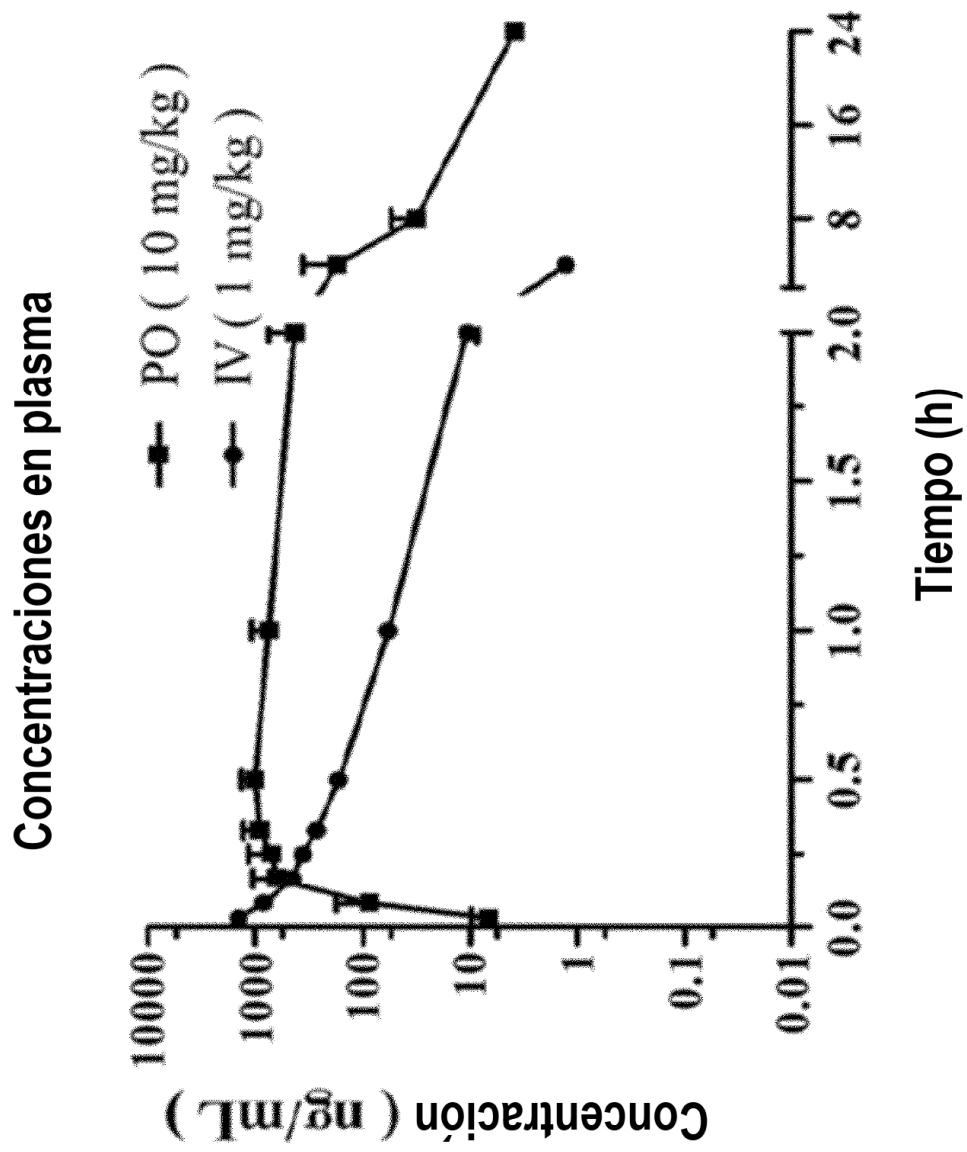


FIG. 4