



(12) PATENT

(19) NO

(11) 340030

(13) B1

NORGE

(51) Int Cl.

*C07D 401/12 (2006.01)*

*C07C 275/32 (2006.01)*

*A61K 31/44 (2006.01)*

*A61K 31/17 (2006.01)*

*A61P 9/04 (2006.01)*

## Patentstyret

---

(21)	Søknadsnr	20070257	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2005.06.16 PCT/US2005/21100
(22)	Inng.dag	2007.01.15	(85)	Videreføringssdag	2007.01.15
(24)	Løpedag	2005.06.16	(30)	Prioritet	2004.06.17, US, 60/581,197
(41)	Alm.tilgj	2007.01.16			
(45)	Meddelt	2017.02.27			
(73)	Innehaver	Cytokinetics Inc, 280 East Grand Avenue, US-CA94080 SAN FRANCISCO, USA			
(72)	Oppfinner	Bradley P Morgan, 1206 Rimer Drive, US-CA94556 MORAGA, USA Alex Muci, 2025 Stockton Street, #3, US-CA94133 SAN FRANCISCO, USA Pu-Ping Lu, 1110 Polynesia Drive, #108, US-CA94404 FOSTER CITY, USA Erica Kraynack, 2 Ridgewood Court, US-CA94002 BELMONT, USA Todd Tochimoto, 1016 Gull Avenue, US-CA94404 FOSTER CITY, USA David J Morgans Jr, 781 Vista Grande Avenue, US-CA94024 LOS ALTOS, USA			
(74)	Fullmektig	Bryn Aarflot AS, Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO, Norge			

---

(54)	Benevnelse	<b>Substituerte urinstoff-derivater, farmasøytiske preparater omfattende samme samt anvendelse av forbindelsene og preparatene for behandling av sykdom</b>		
(56)	Anførte publikasjoner	US 5962455 A US 5547966 A		
(57)	Sammendrag			

Visse substituerte urinstoff-derivater modulerer selektivt hjerte-sarkomere, for eksempel ved å forsterke hjerte-myosin og er anvendelige ved behandling av systolisk hjertesvikt omfattende kongestiv hjertesvikt.

[0001] Oppfinnelsen angår substituerte urinstoff-derivater, spesielt kjemiske enheter som selektivt modulerer hjerte-sarkomere og spesifikt kjemiske enheter, farmasøytiske preparater samt forbindelser og preparater for anvendelse ved behandling av hjertesykdom.

[0002] "Sarkomere" er en elegant organisert cellulær struktur funnet i hjerte- og skjelettmuskel bestående av interdigiterende tynne og tykke filamenter; den omfatter nesten 60% av hjertecelle volum. De tykke filamenter er sammensatt av "myosin," proteinet ansvarlig for omforming av kjemisk energi (ATP-hydrolyse) til kraft og styrt bevegelse. Myosin og dens funksjonelt relaterte slektninger er betegnet motor-proteiner. De tynne filamenter er sammensatt av et kompleks av proteiner. Ett av disse proteiner, "aktin" (en filamentøs polymer) er substratet på hvilket myosin trekker under kraftdannelse. Bundet til aktin er et sett av regulatoriske proteiner, "troponin-kompleks" og "tropomyosin," som gjør aktin-myosin interaksjon avhengig av endringer i intracellulære  $Ca^{2+}$ -nivåer. Ved hvert hjerteslag stiger og faller  $Ca^{2+}$ -nivåer, hvilket initierer hjertemuskel-kontraksjon og deretter hjertemuskel-relaksasjon. Hver av komponentene av sarkomere bidrar til dens kontraktile respons.

[0003] Myosin er det mest omfattende studerte av alle motor-proteiner. Av de tretten distinkte klasser av myosin i humane celler, er myosin-II-klassen ansvarlig for kontraksjon av skjelett-, hjerte- og glattmuskel. Denne klassen av myosin er betydelig forskjellig i aminosyre-sammensetning og i total struktur fra myosin i de andre tolv distinkte klasser. Myosin-II består av to globulære hode-domener bundet sammen av en lang alfa-helisk "coiled-coiled" hale som sammenføres med andre myosin-II for å danne kjernen av sarkomeres tykke filament. De globulære hoder har et katalytisk domene hvor aktin-binding og ATP-funksjoner av myosin finner sted. Når bundet til et aktin-filament, fører frigjøring av fosfat (kfr. ATP til ADP) til en forandring i strukturell konformasjon av det katalytiske domenet som så endrer orienteringen av lett-kjede-binding arm-domenet som strekker seg fra det globulære hode; denne bevegelse er betegnet "powerstroke". Denne forandring i orientering av myosinhodet i relasjon til aktin forårsaker at det tykke filament som det er en del av beveger seg med hensyn til det tynne aktin-filament som det er bundet til. Løsning av det globulære hode fra aktin-filamentet (også  $Ca^{2+}$  modulert) koblet med retur av det katalytiske domenet og lettkjeden til deres start-konformasjon/orientering fullfører kontraksjons- og relaksasjons-zyklusen.

[0004] Pattedyr-hjertemuskel består av to former av hjerte-myosin, alfa og beta og de er godt karakterisert. Betaformen er den dominerende form (> 90 prosent) i voksen human

hjertermuskel. Begge er observert å være regulert ved humane hjertesvikt-tilstander på både transkripsjonelle og translasjonelle nivåer, idet alfa-formen er ned-regulert ved hjertesvikt.

[0005] Sekvensene av alle de humane skjelett-, hjerte- og glattmuskel-myosiner er bestemt. Mens hjerte alfa- og beta-myosiner er meget lignende (93% identitet), er de begge betraktelig forskjellige fra human glattmuskel (42% identitet) og mer nær relatert til skjelett-myosiner (80% identitet). Hensiktsmessig er hjertermuskel-myosiner utrolig konserverte på tvers av pattedyr-arter. For eksempel er både alfa og beta hjertemyosiner > 96% konserverte mellom mennesker og rotter og den tilgjengelige 250-rest sekvens av svinehjerte-beta-myosin er 100% konserverte med den tilsvarende humane hjerte-beta-myosin-sekvens. Slik sekvens-konservering bidrar til forutsigbarheten ved undersøkelse av myosin-baserte terapeutiske midler i dyrebaserte modeller av hjertesvikt.

[0006] Komponentene av hjerte-sarkomeren presenterer mål for behandling av hjertesvikt, for eksempel ved å øke kontraktilitet eller lette fullstendig relaksasjon for å modulere henholdsvis systolisk og diastolisk funksjon.

[0007] Kongestiv hjertesvikt ("CHF") er ikke en spesifikk sykdom, men heller en konstellasjon av tegn og symptomer, som alle er forårsaket av en manglende evne til hjertet til tilstrekkelig å respondere på anstrengelse ved å øke minuttvolumet. Den dominerende patofysiologi forbundet med CHF er systolisk dysfunksjon, en svekkelse av hjerte-kontraktilitet (med påfølgende reduksjon av mengde blod utstøtt ved hvert hjerteslag). Systolisk dysfunksjon med kompenserende dilatasjon av de ventrikulære hulrom resulterer i den mest vanlige form av hjertesvikt, "dilatert kardiomyopati," som ofte er betraktet å være samme som CHF. Motpunktet til systolisk dysfunksjon er diastolisk dysfunksjon, en svekkelse av evnen til å fylle ventriklene med blod, som også kan resultere i hjertesvikt selv med bevart venstre ventrikulære funksjon. Kongestiv hjertesvikt er endelig assosiert med feilaktig funksjon av kardiomyocyt selv, som involverer en reduksjon i dens evne til sammentrekning og relaksasjon.

[0008] Mange av samme underliggende tilstander kan gi opphav til systolisk og/eller diastolisk dysfunksjon, så som aterosklerose, hypertensjon, viral infeksjon, valvulær dysfunksjon og genetiske lidelser. Pasienter med disse lidelser presenterer typisk samme klassiske symptomer: kortpustethet, ødem og overveldende tretthet. Hos omtrent halvparten av pasientene med dilatert kardiomyopati, er årsaken til deres hjerte-dysfunksjon ischemisk hjertesykdom på grunn av koronar aterosklerose. Disse pasienter har enten hatt et enkelt myokardialt infarkt eller multiple myokardiale infarkter; her resulterer den påfølgende arrdannelse og remodellering i utvikling av et dilatert og hypokontraktilt hjerte. Noen ganger

kan det forårsakende agens ikke identifiseres, så sykdommen er referert til som “idiopatisk dilatert kardiomyopati”. Uavhengig av ischemisk eller annen opprinnelse, har pasienter med dilatert kardiomyopati en elendig prognose, meget sykdom og høy dødelighet.

**[0009]**           Utbredelsen av CHF har vokst til epidemiske proporsjoner ettersom populasjonen eldes og ettersom kardiologer har blitt flinkere til å redusere dødelighet fra ischemisk hjertesykdom, den mest vanlige opptakt til CHF. Grovt 4,6 millioner mennesker i USA er diagnostisert med CHF; forekomsten av slik diagnose nærmer seg 10 pr. 1000 etter 65 års alder. Hospitalisering for CHF er vanligvis resultat av utilstrekkelig utepasient-terapi. Hospital-utskrivning for CHF steg fra 377.000 (i 1979) til 970.000 (i 2002) hvilket gjør CHF til den mest vanlige utskrivings-diagnose for mennesker med alder 65 og over. Fem-år dødelighet fra CHF nærmer seg 50%. Således, mens terapier for hjertesykdom er sterkt forbedret og levetid er forlenget over de siste år, er nye og bedre terapier fortsatt søkt, spesielt for CHF.

**[0010]**           “Akutt” kongestiv hjertesvikt (også kjent som akutt “dekompensert” hjertesvikt) involverer et brått fall i hjertefunksjon som er et resultat av en rekke årsaker. For eksempel hos en pasient som allerede har kongestiv hjertesvikt kan et nytt myokardialt infarkt, avbrudd av medisiner og diettære feiltrinn alle føre til akkumulering av ødemvæske og metabolsk insuffisiens selv i hviletilstand. Et terapeutisk middel som øker hjertefunksjon under en slik akutt episode kan assistere i å lindre denne metabolske insuffisiens og påskynde fjerning av ødem, hvilket letter returnering til den mer stabile “kompenserte” kongestiv hjertesvikt-tilstand. Pasienter med meget fremskreden kongestiv hjertesvikt spesielt de på sluttstadiet av sykdommen kan også ha fordel av et terapeutisk middel som øker hjertefunksjon, for eksempel for stabilisering mens de venter på et hjertetransplantat. Andre potensielle fordeler kan gis til pasienter som kobles fra bypass-pumpe, for eksempel ved administrering av et middel som hjelper det stansede eller sinkede hjerte til å gjenoppta normal funksjon. Pasienter som har diastolisk dysfunksjon (utilstrekkelig relaksasjon av hjertemuskelen) kan ha fordel av et terapeutisk middel som modulerer relaksasjon.

**[0011]**           Inotroper er medikamenter som øker den kontraktile evne til hjertet. Som en gruppe, har alle nåværende inotroper mislykkes i å møte gullstandarden for hjertesvikt-terapi, dvs. forlenge pasientoverlevelse. I tillegg er nåværende midler lite selektive for hjerte-vev, som til dels fører til kjente ugunstige effekter som begrenser anvendelse av dem. Til tross for dette faktum, er intravenøse inotroper fortsatt utstrakt anvendt ved akutt hjertesvikt (f.eks. for å tillate gjenopptagelse av oral medisiner eller hjelpe pasienter frem til hjerte-

transplantasjon) mens ved kronisk hjertesvikt, oralt gitt digoxin blir anvendt som en inotrop for å lindre pasientens symptomer, forbedre livskvaliteten og redusere sykehus-innleggelse.

**[0012]** Nåværende inotrop-terapier forbedrer kontraktilitet ved å øke kalsium transient via adenylyl-cyklase-banen eller ved å forsinke cAMP-nedbrytning gjennom hemning av fosfodiesterase (PDE), som kan være skadelig for pasienter med hjertesvikt.

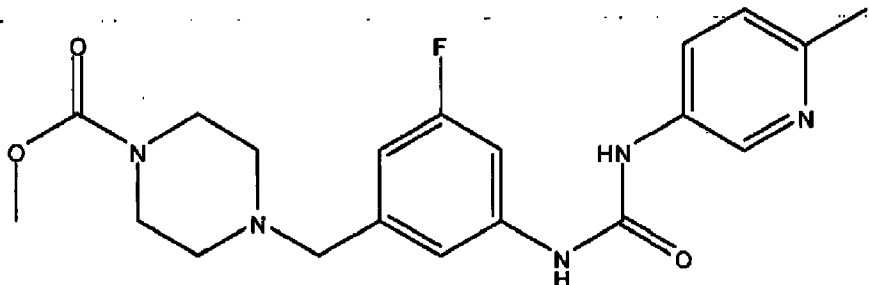
**[0013]** Gitt begrensningene ved nåværende midler, er nye metoder nødvendige for å forbedre hjertefunksjon ved kongestiv hjertesvikt. Det nyeste godkjente korttid intravenøse middel, milrinon, er mer enn femten år gammelt. Eneste tilgjengelige orale medikament, digoxin, er over 200 år gammelt. Det er fortsatt et stort behov for midler som utnytter nye virkningsmekanismer og kan gi bedre resultater når det gjelder lindring av symptomer, sikkerhet og pasient-dødelighet, både kortvarige og langvarige. Nye midler med en forbedret terapeutisk indeks fremfor nåværende midler vil gi metoder for å oppnå disse kliniske resultater.

**[0014]** Selektiviteten av midler rettet mot hjerte-sarkomere (for eksempel ved målsøking av hjerte-betamyosin) er identifisert som en viktig metode for å oppnå denne forbedrede terapeutiske indeks. Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer slike midler (spesielt sarkomere-aktiverende midler) og metoder for deres identifikasjon og anvendelse.

**[0015]** En annen metode kan være direkte å aktivere hjerte-myosin uten å endre kalsium transient for å forbedre hjerte-kontraktilitet. Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer slike midler (spesielt myosin-aktiverende midler) og metoder for deres identifikasjon og anvendelse.

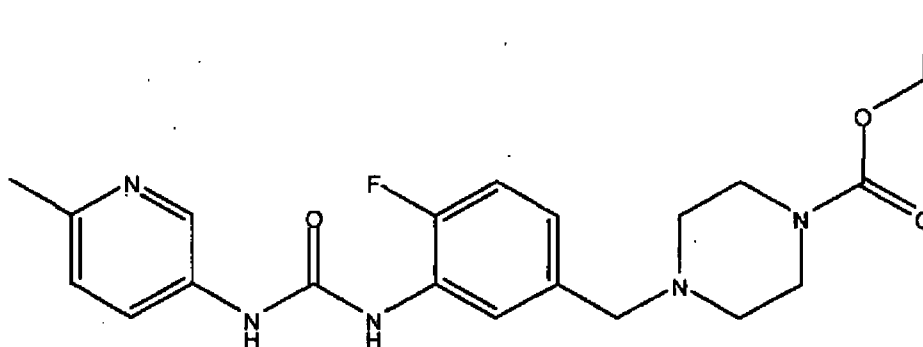
**[0016]** Foreliggende oppfinnelse angår forbindelse valgt fra:

i) metyl 4-[(3-fluor-5-[(6-metyl(3-pyridyl))amino]karbonylamino}-fenyl)metyl]piperazinekarboksylat



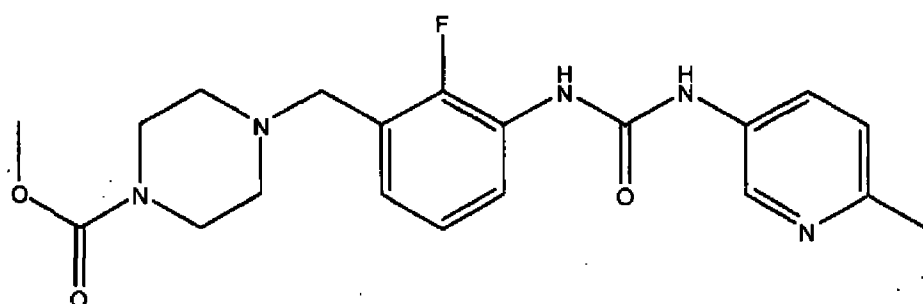
eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav;

ii) etyl 4-[(4-fluor-3-[(6-metyl(3-pyridyl))amino]karbonylamino}fenyl)-metyl]piperazinekarboksylat



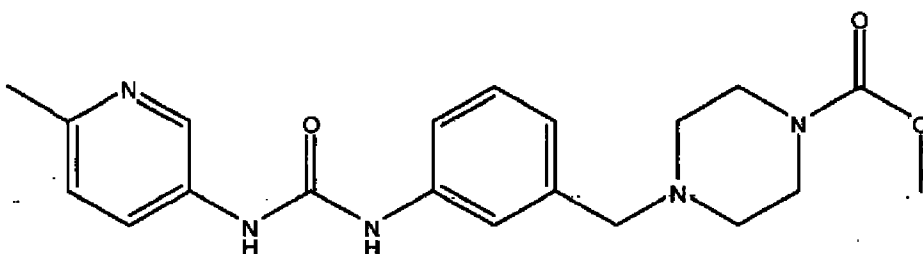
eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav;

iii) metyl 4-[(2-fluor-3-[(6-metyl(3-pyridyl))amino]karbonylamino)-fenyl]metyl]piperazinekarboksylat



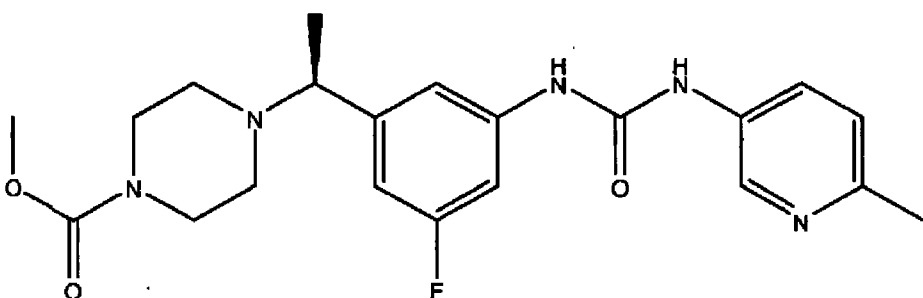
eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav;

iv) metyl 4-[(3-[(6-metyl(3-pyridyl))amino]karbonylamino)fenyl]-metyl]piperazinekarboksylat



eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav;

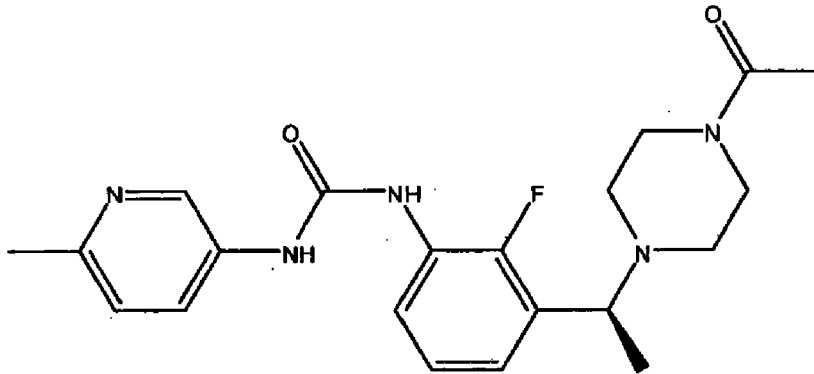
v) metyl 4-[(1S)-1-(5-fluor-3-[(6-metyl(3-pyridyl))amino]karbonylamino)-fenyl]etyl]piperazinekarboksylat



eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav; og

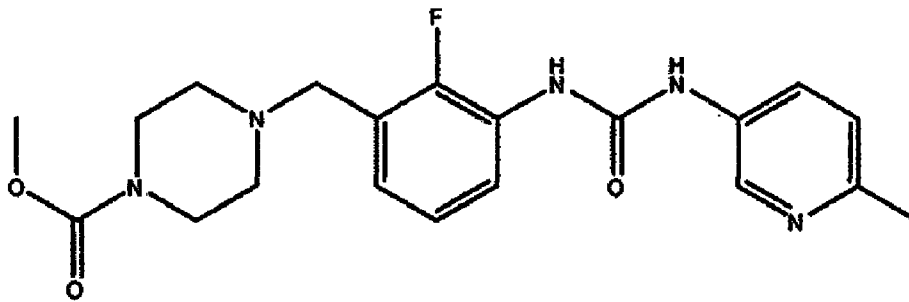
6

vi) N-{3-[(1S)-1-(4-acetylpiperazinyl)etyl]-2-fluorfenyl}[(6-metyl(3-pyridyl))amino]karboksamid



eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav.

Foretrukket er forbindelsen over, som er metyl 4-[(2-fluor-3-{[(6-metyl(3-pyridyl))amino]karbonylamino}-fenyl)metyl]piperazinekarboksylat



eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav.

Oppfinnelsen angår også farmasøytisk preparat omfattende et farmasøytisk akseptabelt tilsetningsmiddel, bærer eller adjuvans og forbindelsene over

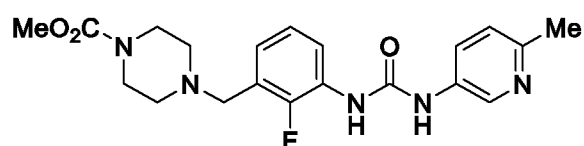
Også omfattet av oppfinnelsen er forbindelse eller farmasøytiske preparat som definert over for anvendelse ved en metode for behandling av hjertesykdom hos et pattedyr hvilken metode omfatter administrering til et pattedyr med behov for dette en terapeutisk effektiv mengde av forbindelsen eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav som definert over eller et farmasøytisk preparat som definert over.

Oppfinnelsen angår også forbindelse eller farmasøytiske preparat for anvendelse som nevnt over, hvor hjertesykdommen er akutt eller dekompensert kongestiv hjertesvikt eller kronisk

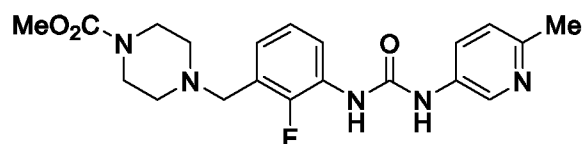
kongestiv hjertesvikt.

Oppfinnelsen angår også forbindelse eller farmasøytiske preparat for anvendelse som nevnt over, hvor hjertesykdommen er systolisk hjertesvikt.

Oppfinnelsen angår også forbindelse som nevnt over for anvendelse ved en metode for å forbedre hjerte- kontraktilitet i hjertevev uten å endre kalsiumtransienten, hvor forbindelsen er:

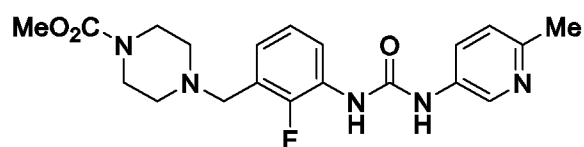


eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, som nevnt over for anvendelse ved en metode for å stabilisere hjertefunksjonen hos en pasient i påvente av et hjerte transplantat, hvor forbindelsen er:



eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav.

Oppfinnelsen angår også forbindelse som nevnt over for anvendelse ved en metode for behandling av hjertesvikt gjennom økende kontraktilitet for å modulere systolisk funksjon eller gjennom å bevirke total relaksasjon av moderat diastolisk funksjon, hvor forbindelsen er:



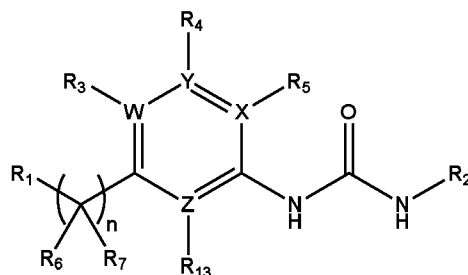
eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav.

Oppfinnelsen angår også farmasøytisk preparat omfattende forbindelse som nevnt over og et farmasøytisk akseptabelt tilsetningsmiddel, bærer eller adjuvans, for anvendelse som tidligere definert.



Oppfinnelsen angår også preparatet for anvendelse som nevnt over, formulert i en form valgt fra gruppen bestående av et injiserbar fluid, en aerosol, en tablett, en pille, en kapsel, en sirup, en krem, en gel og et transdermalt plaster.

[0017] Også beskrevet er en metode for fremstilling av en forbindelse med formel I.



Formel I

hvor  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$  og  $R^{13}$  er som definert under.

W, X, Y og Z uavhengig er  $-C=$  eller  $-N=$ , forutsatt at ikke mer enn to av W, X, Y og Z er  $-N=$ ;

n er én, to eller tre;

$R_1$  er eventuelt substituert amino eller eventuelt substituert heterocykloalkyl;

$R_2$  er eventuelt substituert aryl, eventuelt substituert aralkyl; eventuelt substituert cykloalkyl, eventuelt substituert heteroaryl, eventuelt substituert heteroaralkyl eller eventuelt substituert heterocykloalkyl,

$R_3$  er hydrogen, halogen, cyano, eventuelt substituert alkyl, eventuelt substituert heterocykloalkyl eller eventuelt substituert heteroaryl når W er  $-C=$  og  $R_3$  er fraværende når W er  $-N=$ ;

$R_4$  er hydrogen, halogen, cyano, eventuelt substituert alkyl, eventuelt substituert heterocykloalkyl eller eventuelt substituert heteroaryl når Y er  $-C=$  og  $R_4$  er fraværende når Y er  $-N=$ ; og

$R_5$  er hydrogen, halogen, cyano, eventuelt substituert alkyl, eventuelt substituert heterocykloalkyl eller eventuelt substituert heteroaryl når X er  $-C=$  og  $R_5$  er fraværende når X er  $-N=$ ;

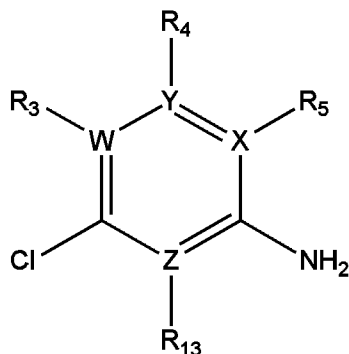
$R_{13}$  er hydrogen, halogen, cyano, hydroksyl, eventuelt substituert alkyl, eventuelt substituert heterocykloalkyl eller eventuelt substituert heteroaryl når Z er  $-C=$  og  $R_{13}$  er fraværende når Z er  $-N=$ ; og;

$R_6$  og  $R_7$  er uavhengig hydrogen, aminokarbonyl, alkoksykarbonyl, eventuelt substituert alkyl eller eventuelt substituert alkoksy eller  $R_6$  og  $R_7$ , sammen

9

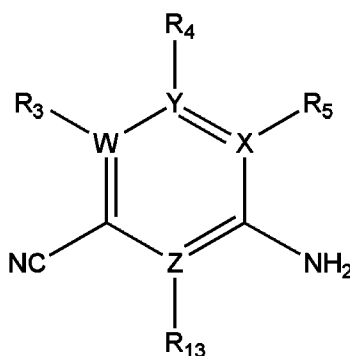
med karbonet som de er bundet til, danner en eventuelt substituert 3- til 7-leddet ring som eventuelt omfatter ett eller to ytterligere heteroatomer, valgt fra N, O og S i ringen,

omfattende omdannelse av en forbindelse med formel 400



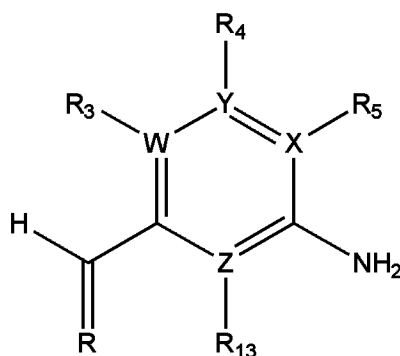
400

til en forbindelse med formelen 401;



401

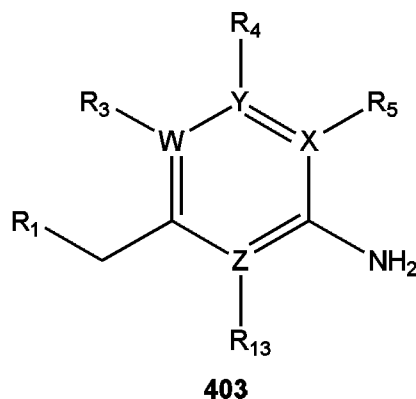
hydrolysering av forbindelsen med formel 401 til en forbindelse med formel 402



402

hvor R er valgt fra O og NH;

kontakting av en forbindelse med formel 402 med en forbindelse med formelen R<sub>1</sub>-H hvor R<sub>1</sub> er eventuelt substituert amino eller eventuelt substituert heterocykloalkyl for å danne en forbindelse med formel 403; og



kontakting av en forbindelse med formel 403 med en forbindelse med formelen R<sub>2</sub>-NCO, hvilket gir en forbindelse med formel I.

**[0018]** Andre aspekter og utførelsesformer vil bli klare for fagfolk på området fra den følgende detaljerte beskrivelse.

**[0019]** Som anvendt i foreliggende spesifikasjon er de følgende ord og fraser generelt ment å ha betydningene angitt nedenfor, bortsett fra i den grad sammenhengen hvor de blir anvendt indikerer noe annet. De følgende forkortelser og betegnelser har de angitte betydninger gjennom hele beskrivelsen:

Ac	=	acetyl
Boc	=	t-butyloksy-karbonyl
c-	=	cyklo
CBZ	=	karbobenzoksy = benzyloksykarbonyl
DCM	=	diklormetan = metylenklorid = CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
DIBAL-H	=	Diisobutylaluminiumhydrid
DIEA eller DIPEA	=	N,N-diisopropyletylamin
DMF	=	N,N-dimetylformamid
DMSO	=	dimetylsulfoksid
ekv	=	ekvivalent
Et	=	etyl
EtOAc	=	etylacetat
EtOH	=	etanol
g	=	gram

GC	=	gasskromatografi
h, hr, hrs	=	time eller timer
Me	=	metyl
min	=	minutt
ml	=	milliliter
mmol	=	millimol
Ph	=	fenyl
PyBroP	=	brom-tris-pyrrolidinofosfonium- heksafluorofosfat
RT	=	romtemperatur
s-	=	sekundær
t-	=	tertiær
TFA	=	trifluoreddiksyre
THF	=	tetrahydrofuran
TLC	=	tynnskikt-kromatografi
Volum	=	ml/g av materiale basert på det begrensende reagens hvis ikke spesifisert på annen måte

**[0020]** Som anvendt i foreliggende beskrivelse er de følgende ord og fraser generelt ment å ha betydningene angitt nedenfor, bortsett fra i den grad sammenhengen hvor når de blir anvendt eller definert i kravene indikerer noe annet.

**[0021]** Som anvendt her, når hvilken som helst variabel forekommer mer enn én gang i en kjemisk formel, er dens definisjon ved hver forekomst uavhengig av dens definisjon ved hver annen forekomst.

**[0022]** En strek (“-“) som ikke er mellom to bokstaver eller symboler blir anvendt for å angi bindingspunktet for en substituent. For eksempel er -CONH<sub>2</sub> tilknyttet gjennom karbonatomet.

**[0023]** Ved “eventuell” eller “eventuelt” menes at den deretter beskrevne hendelse eller omstendighet kan forekomme eller ikke, og at beskrivelsen omfatter tilfeller hvor hendelsen eller omstendigheten forekommer og tilfeller hvor den ikke forekommer. For eksempel omfatter “eventuelt substituert alkyl” både “alkyl” og “substituert alkyl” som definert nedenfor. Det vil forstås av fagfolk på området, med hensyn til hvilken som helst gruppe inneholdende én eller flere substituent, at slike grupper ikke er ment å innføre noen som helst substitusjon eller substitusjonsmønstre som er sterisk upraktiske, syntetisk ikke-gjennomførbare og/eller iboende ustabile.

**[0024]** “Alkyl” omfatter en lineær eller forgrenet kjede som har det angitte antall karbonatomer. Alkylgrupper er generelt de med  $C_{20}$  eller under, så som  $C_{13}$  eller under, for eksempel  $C_6$  eller under. For eksempel omfatter  $C_1$ - $C_6$ alkyl både lineær og forgrenet alkyl med fra 1 til 6 karbonatomer. Eksempler på alkylgrupper omfatter metyl, etyl, propyl, isopropyl, n-butyl, sek-butyl, tert-butyl, pentyl, 2-pentyl, isopentyl, neopentyl, heksyl, 2-heksyl, 3-heksyl, 3-metylpentyl og lignende. Alkylen er en annen underklasse av alkyl, med henvisning til samme rester som alkyl, men har to bindingspunkter. For eksempel angir  $C_0$  alkylen en kovalent binding og  $C_1$  alkylen er en metylengruppe. Når en alkylrest som har et spesifikt antall karbonatomer er angitt, skal alle geometriske isomerer som har det antall karbonatomer være omfattet; således skal for eksempel "butyl" omfatte n-butyl, sek-butyl, isobutyl og t-butyl; "propyl" omfatter n-propyl og isopropyl. “Lavere alkyl” angir alkylgrupper som har ett til fire karbonatomer.

**[0025]** “Cykloalkyl” angir en mettet hydrokarbon-ring eller kondensert bicyklisk ring som har det spesifiserte antall karbonatomer, vanligvis fra 3 til 12 ring-karbonatomer, mer vanlig 3 til 10 eller 3 til 7. Eksempler på cykloalkylgrupper omfatter syklopropyl, syklobutyl, syklopentyl og sykloheksyl så vel som brodannede og innelukkede mettede ringgrupper så som norbornan. Eksempler på kondenserte bicykliske ringer omfatter oktahydro-1H-inden, oktahydropentalen, 1,2,3,3a,4,5-heksahydropentalen, 1,2,4,5,6,7,7a-heptahydro-2H-inden, 4,5,6,7-tetrahydro-2H-inden.

**[0026]** Med “alkoksy” menes en alkylgruppe tilknyttet gjennom en oksygen-bro så som for eksempel metoksy, etoksy, propoksy, isopropoksy, n-butoksy, sek-butoksy, tert-butoksy, pentoksy, 2-pentyloksy, isopentoksy, neopentoksy, heksoksy, 2-heksoksy, 3-heksoksy, 3-metylpentoksy. Alkylgruppen i en alkoksygruppe er generelt  $C_{20}$  eller mindre, så som  $C_{13}$  eller mindre, for eksempel  $C_6$  eller mindre. “Lavere alkoksy” angir alkoksygrupper som har ett til fire karbonatomer.

**[0027]** Med “cykloalkoksy” menes en cykloalkylgruppe tilknyttet gjennom en oksygen-bro så som for eksempel syklopropoksy, syklobutoksy, syklopentoksy, sykloheksoksy, sykloheptoksy. Cykloalkylgruppen i en cykloalkoksygruppe er generelt  $C_{20}$  eller mindre, så som  $C_{13}$  eller mindre, for eksempel  $C_6$  eller mindre.

**[0028]** “AcyI” angir gruppene (alkyl)-C(O)-; (cykloalkyl)-C(O)-; (aryl)-C(O)-; (heteroaryl)-C(O)-; og (heterocykloalkyl)-C(O)-, hvor gruppen er bundet til moder-strukturen gjennom karbonylfunksjonaliteten og hvor alkyl, cykloalkyl, aryl, heteroaryl og heterocykloalkyl er som beskrevet her. Acylgrupper har det angitte antall karbonatomer, med

karbonet i ketogruppen omfattet i antallet karbonatomer. For eksempel er en C<sub>2</sub> acylgruppe en acetylgruppe som har formelen CH<sub>3</sub>(C=O)-.

[0029] Med "alkoksykarbonyl" menes en estergruppe med formelen (alkoksy)(C=O)-tilknyttet gjennom karbonyl-karbonet hvor alkoksy-gruppen har det angitte antall karbonatomer. Således er en C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>alkoksykarbonylgruppe en alkoksygruppe som har fra 1 til 6 karbonatomer tilknyttet gjennom dens oksygen til en karbonyl-linker.

[0030] Med "amino" menes gruppen -NH<sub>2</sub>.

[0031] Betegnelsen "aminokarbonyl" angir gruppen -CONR<sup>b</sup>R<sup>c</sup>, hvor

R<sup>b</sup> er valgt fra hydrogen, eventuelt substituert C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alkyl, eventuelt substituert aryl og eventuelt substituert heteroaryl; og

R<sup>c</sup> er valgt fra hydrogen og eventuelt substituert C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl; eller

R<sup>b</sup> og R<sup>c</sup> sammen med nitrogenet som de er bundet til, danner en eventuelt substituert 5- til 7-leddet nitrogen-inneholdende heterocykloalkyl som eventuelt omfatter 1 eller 2 ytterligere heteroatomer valgt fra O, N og S i heterocykloalkylringen;

hvor hver substituerte gruppe uavhengig er substituert med én eller flere substituenten uavhengig valgt fra C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl, aryl, heteroaryl, aryl-C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl-, heteroaryl-C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl-, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> halogenalkyl, -OC<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl, -OC<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkylfenyl, -C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl-OH, -OC<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> halogenalkyl, halogen, -OH, -NH<sub>2</sub>, -C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl-NH<sub>2</sub>, -N(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl)(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl), -NH(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl), -N(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl)(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkylfenyl), -NH(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkylfenyl), cyano, nitro, okso (som en substituent for cykloalkyl, heterocykloalkyl eller heteroaryl), -CO<sub>2</sub>H, -C(O)OC<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl, -CON(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl)(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl), -CONH(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl), -CONH<sub>2</sub>, -NHC(O)(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl), -NHC(O)(fenyl), -N(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl)C(O)(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl), -N(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl)C(O)(fenyl), -C(O)C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl, -C(O)C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> fenyl, -C(O)C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> halogenalkyl, -OC(O)C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl, -SO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl), -SO<sub>2</sub>(fenyl), -SO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> halogenalkyl), -SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>NH(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl), -SO<sub>2</sub>NH(fenyl), -NHSO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl), -NHSO<sub>2</sub>(fenyl) og -NHSO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> halogenalkyl).

[0032] "Aryl" omfatter: 5- og 6-leddede karbocykliske aromatiske ringer, for eksempel benzen; bicykliske ringsystemer hvor minst én ring er karbocyklisk og aromatisk, for eksempel naftalen, indan og tetralin; og tricykliske ringsystemer hvor minst én ring er karbocyklisk og aromatisk, for eksempel fluoren.

[0033] For eksempel omfatter aryl 5- og 6-leddede karbocykliske aromatiske ringer kondensert til en 5- til 7-leddet heterocykloalkylring inneholdende 1 eller flere heteroatomer valgt fra N, O og S. For slike kondenserte, bicykliske ringsystemer hvor bare én av ringene

er en karbocyklisk aromatisk ring, kan bindingspunktet være ved den karbocykliske aromatiske ring eller heterocykloalkylringen. Bivalente rester dannet fra substituerte benzenderivater og som har fri valenser ved ringatomer er betegnet som substituerte fenylrester. Bivalente rester avledet fra univalente polycykliske hydrokarbonrester hvis navn ender på "-yl" ved fjerning av ett hydrogenatom fra karbonatomet med den frie valens er betegnet ved tilsetning av "-iden" til navnet til den tilsvarende univalente rest, f.eks. en naftylgruppe med to bindingspunkter er betegnet naftyliden. Aryl omfatter imidlertid ikke eller overlapper på noen som helst måte heteroaryl, separat definert nedenfor. Således, hvis én eller flere karbocykliske aromatiske ringer er kondensert med en heterocykloalkyl aromatisk ring, er det resulterende ringsystem heteroaryl, ikke aryl, som definert her.

**[0034]** Betegnelsen "aryloksy" angir gruppen -O-aryl.

**[0035]** I betegnelsen "arylalkyl" eller "aralkyl", er aryl og alkyl som definert her og bindingspunktet er på alkylgruppen. Denne betegnelsen omfatter, men er ikke begrenset til, benzyl, fenetyl, fenylvinyl, fenylallyl.

**[0036]** Betegnelsen "halo" omfatter fluor, klor, brom og jod og betegnelsen "halogen" omfatter fluor, klor, brom og jod.

**[0037]** "Halogenalkyl" indikerer alkyl som definert ovenfor som har det spesifiserte antall karbonatomer, substituert med 1 eller flere halogenatomer, generelt opptil maksimalt tillatt antall halogenatomer. Eksempler på halogenalkyl omfatter trifluormetyl, difluormetyl, 2-fluoretyl og penta-fluoretyl.

**[0038]** "Heteroaryl" omfatter: 5- til 7-leddede aromatiske, monocykliske ringer inneholdende ett eller flere, for eksempel fra 1 til 4 eller i visse utførelsesformer, fra 1 til 3, heteroatomer valgt fra N, O og S, mens de resterende ringatomer er karbon; og bicykliske heterocykloalkylringer inneholdende ett eller flere, for eksempel fra 1 til 4 eller i visse utførelsesformer, fra 1 til 3, heteroatomer valgt fra N, O og S, mens de resterende ringatomer er karbon og hvor minst ett heteroatom er til stede i en aromatisk ring.

**[0039]** For eksempel omfatter heteroaryl en 5- til 7-leddet heterocykloalkyl, aromatisk ring kondensert til en 5- til 7-leddet cykloalkylring. For slike kondenserte, bicykliske heteroarylringssystemer hvor bare én av ringene inneholder ett eller flere heteroatomer, kan bindingspunktet være ved den heteroaromatiske ring eller cykloalkylringen. Når det totale antall av S- og O-atomer i heteroarylgruppen overstiger 1, er de heteroatomene ikke i nabostilling til hverandre. I visse utførelsesformer er det totale antall av S- og O-atomer i heteroarylgruppen ikke mer enn 2. I visse utførelsesformer er det totale antall av S- og O-atomer i den aromatiske heterocykliske gruppe ikke mer enn 1. Også

omfattet innen definisjonen av heteroaryl er oksid-derivater, for eksempel N-oksider av nitrogen-inneholdende arylgrupper, så som pyridin-1-oxid eller >S(O)- og >S(O)<sub>2</sub>-derivater av svovel-inneholdende grupper. Eksempler på heteroarylgrupper omfatter systemer (som nummerert fra bindings-stillingen gitt prioritet 1), så som 2-pyridyl, 3-pyridyl, 4-pyridyl, 2,3-pyrazinyl, 3,4-pyrazinyl, 2,4-pyrimidinyl, 3,5-pyrimidinyl, 2,3-pyrazolinyl, 2,4-imidazolinyl, isoksazolinyl, oksazolinyl, tiazolinyl, tiadiazolinyl, tetrazolyl, tienyl, benzotiofenyl, furanyl, benzofuranyl, benzoimidazolinyl, indolinyl, pyridizinyl, triazolyl, kinolinyl, pyrazolyl og 5,6,7,8-tetrahydroisokinolin. Bivalente rester avledet fra univalente heteroarylrester hvis navn ender på "-yl" ved fjerning av ett hydrogenatom fra atom med den frie valens er betegnet ved tilføyning av "-iden" til navnet av den tilsvarende univalente rest, f.eks. er en pyridylgruppe med to bindingspunkter pyridyliden. Heteroaryl omfatter ikke eller overlapper aryl som definert ovenfor.

**[0040]** I betegnelsen "heteroarylalkyl" eller "heteroaralkyl", er heteroaryl og alkyl som definert her og bindingspunktet er på alkylgruppen. Denne betegnelsen omfatter pyridylmetyl, tiofenylmetyl og (pyrrolyl)-1-etyl.

**[0041]** Med "heterocykloalkyl" menes en cykloalkylrest hvor ett til fire av karbonatomene er erstattet med et heteroatom så som oksygen, nitrogen eller svovel. Egnede heterocykloalkylgrupper omfatter for eksempel (som nummerert fra bindingsstillingen gitt prioritet 1), 2-pyrrolinyl, 2,4-imidazolidinyl, 2,3-pyrazolidinyl, 2-piperidyl, 3-piperidyl, 4-piperidyl og 2,5-piperzinyll. Morfolinylgrupper er også omfattet, omfattende 2-morfolinyl og 3-morfolinyl (nummerert hvor oksygenet er gitt prioritet 1).

**[0042]** Som anvendt her angir "modulering" en forandring i myosin eller sarkomere aktivitet som en direkte eller indirekte respons på tilstedeværelse av minst én kjemisk enhet beskrevet her, i forhold til aktiviteten til myosinet eller sarkomeren i fravær av forbindelsen. Forandringen kan være en økning i aktivitet eller en reduksjon i aktivitet og kan være på grunn av direkte interaksjon av forbindelsen med myosin eller sarkomeren eller på grunn av interaksjonen av forbindelsen med én eller flere andre faktorer som i sin tur påvirker myosin- eller sarkomere-aktivitet.

**[0043]** Betegnelsen "sulfanyl" omfatter gruppene: -S-(eventuelt substituert alkyl), -S-(eventuelt substituert aryl), -S-(eventuelt substituert heteroaryl) og -S-(eventuelt substituert heterocykloalkyl). Således omfatter sulfanyl-gruppen C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alkylsulfanyl.

**[0044]** Betegnelsen "sulfinyl" omfatter gruppene: -S(O)-H, -S(O)-(eventuelt substituert alkyl), -S(O)-eventuelt substituert aryl), -S(O)-eventuelt substituert heteroaryl), -S(O)-(eventuelt substituert heterocykloalkyl); og -S(O)-(eventuelt substituert amino).



[0045] Betegnelsen “sulfonyl” omfatter gruppene:  $-S(O_2)-H$ ,  $-S(O_2)-$ (eventuelt substituert alkyl),  $-S(O_2)-$ eventuelt substituert aryl),  $-S(O_2)-$ eventuelt substituert heteroaryl),  $-S(O_2)-$ (eventuelt substituert heterocykloalkyl),  $-S(O_2)-$ (eventuelt substituert alkoksy),  $-S(O_2)-$ eventuelt substituert aryloksy),  $-S(O_2)-$ eventuelt substituert heteroaryloksy),  $-S(O_2)-$ (eventuelt substituert heterocykloalkyloksy); og  $-S(O_2)-$ (eventuelt substituert amino).

[0046] Betegnelsen “substituert” som anvendt her, betyr at hvilket som helst av ett eller flere hydrogenener på det angitte atom eller gruppe er erstattet med et utvalg fra den angitte gruppe, forutsatt at det angitte atomets normale valens ikke blir oversteget. Når en substituent er okso (dvs.  $=O$ ) da er 2 hydrogenener på atomet erstattet. Kombinasjoner av substituenten og/eller variabler er tillatt bare hvis slike kombinasjoner resulterer i stabile forbindelser eller anvendelige syntetiske mellomprodukter. En stabil forbindelse eller stabil struktur menes å angi en forbindelse som er tilstrekkelig robust til å overleve isolering fra en reaksjonsblanding og påfølgende formulering som et middel som minst har praktisk nytte. Hvis ikke på annen måte spesifisert er substituenten betegnet i kjernestrukturen. For eksempel skal det forstås at når (cykloalkyl)alkyl er listet opp som en mulig substituent, er bindingpunktet av denne substituenten til kjernestrukturen i alkyl delen.

[0047] Betegnelsene “substituert” alkyl, cykloalkyl, aryl, heterocykloalkyl og heteroaryl, hvis ikke på annen måte uttrykkelig definert, angir henholdsvis alkyl, cykloalkyl, aryl, heterocykloalkyl og heteroaryl hvor én eller flere (opptil 5, så som opptil 3) hydrogenatomer er erstattet med en substituent uavhengig valgt fra:

$-R^a$ ,  $-OR^b$ ,  $-O(C_1-C_2 \text{ alkyl})O-$  (f.eks. metylendioksy-),  $-SR^b$ , guanidin, guanidin hvor én eller flere av guanidin-hydrogenene er erstattet med en lavere alkylgruppe,  $-NR^bR^c$ , halogen, cyano, nitro,  $-COR^b$ ,  $-CO_2R^b$ ,  $-CONR^bR^c$ ,  $-OCOR^b$ ,  $-OCO_2R^a$ ,  $-OCONR^bR^c$ ,  $-NR^cCOR^b$ ,  $-NR^cCO_2R^a$ ,  $-NR^cCONR^bR^c$ ,  $-SOR^a$ ,  $-SO_2R^a$ ,  $-SO_2NR^bR^c$  og  $-NR^cSO_2R^a$ ,

hvor  $R^a$  er valgt fra eventuelt substituert  $C_1-C_6$  alkyl, eventuelt substituert aryl og eventuelt substituert heteroaryl;

$R^b$  er valgt fra hydrogen, eventuelt substituert  $C_1-C_6$  alkyl, eventuelt substituert aryl og eventuelt substituert heteroaryl; og

$R^c$  er valgt fra hydrogen og eventuelt substituert  $C_1-C_4$  alkyl; eller

$R^b$  og  $R^c$  sammen med nitrogenet som de er bundet til, danner eventuelt substituert 5-til 7-leddet nitrogen-inneholdende heterocykloalkyl som eventuelt omfatter 1 eller 2 ytterligere heteroatomer valgt fra O, N og S i heterocykloalkylringen;

hvor hver eventuelt substituerte gruppe er usubstituert eller uavhengig substituert med

én eller flere, så som én, to eller tre, substituenten uavhengig valgt fra C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl, aryl, heteroaryl, aryl-C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl-, heteroaryl-C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl-, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> halogenalkyl-, -OC<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl, -OC<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkylfenyl, -C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl-OH, -OC<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> halogenalkyl, halogen, -OH, -NH<sub>2</sub>, -C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl-NH<sub>2</sub>, -N(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl)(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl), -NH(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl), -N(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl)(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkylfenyl), -NH(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkylfenyl), cyano, nitro, okso (som en substituent for cykloalkyl, heterocykloalkyl eller heteroaryl), -CO<sub>2</sub>H, -C(O)OC<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl, -CON(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl)(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl), -CONH(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl), -CONH<sub>2</sub>, -NHC(O)(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl), -NHC(O)(fenyl), -N(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl)C(O)(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl), -N(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl)C(O)(fenyl), -C(O)C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl, -C(O)C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> fenyl, -C(O)C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> halogenalkyl, -OC(O)C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl, -SO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl), -SO<sub>2</sub>(fenyl), -SO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> halogenalkyl), -SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>NH(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl), -SO<sub>2</sub>NH(fenyl), -NHSO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl), -NHSO<sub>2</sub>(fenyl) og -NHSO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> halogenalkyl).

**[0048]** Betegnelsene “substituert” cykloalkyl, aryl, heterocykloalkyl og heteroaryl omfatter også okso (=O) og oksid (-O<sup>-</sup>) substituenten, for eksempel N-oksider av nitrogen-inneholdende arylgrupper, så som pyridin-1-oksider eller >S(O)- og >S(O)<sub>2</sub>-derivater av svovel-inneholdende grupper.

**[0049]** Betegnelsen “substituert acyl” angir gruppene (substituert alkyl)-C(O)-; (substituert cykloalkyl)-C(O)-; (substituert aryl)-C(O)-; (substituert heteroaryl)-C(O)-; og (substituert heterocykloalkyl)-C(O)-, hvor gruppen er bundet til moder-strukturen gjennom karbonylfunksjonaliteten og hvor substituert alkyl, cykloalkyl, aryl, heteroaryl og heterocykloalkyl, refererer til henholdsvis alkyl, cykloalkyl, aryl, heteroaryl og heterocykloalkyl hvor ett eller flere (opptil 5, så som opptil 3) hydrogenatomer er erstattet med en substituent uavhengig valgt fra:

-R<sup>a</sup>, -OR<sup>b</sup>, -O(C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub> alkyl)O- (f.eks. metylendioksy-), -SR<sup>b</sup>, guanidin, guanidin hvor ett eller flere av guanidin-hydrogenene er erstattet med en lavere-alkylgruppe, -NR<sup>b</sup>R<sup>c</sup>, halogen, cyano, nitro, -COR<sup>b</sup>, -CO<sub>2</sub>R<sup>b</sup>, -CONR<sup>b</sup>R<sup>c</sup>, -OCOR<sup>b</sup>, -OCO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -OCONR<sup>b</sup>R<sup>c</sup>, -NR<sup>c</sup>COR<sup>b</sup>, -NR<sup>c</sup>CO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -NR<sup>c</sup>CONR<sup>b</sup>R<sup>c</sup>, -CO<sub>2</sub>R<sup>b</sup>, -CONR<sup>b</sup>R<sup>c</sup>, -NR<sup>c</sup>COR<sup>b</sup>, -SOR<sup>a</sup>, -SO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -SO<sub>2</sub>NR<sup>b</sup>R<sup>c</sup> og -NR<sup>c</sup>SO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>,

hvor R<sup>a</sup> er valgt fra eventuelt substituert C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alkyl, eventuelt substituert aryl og eventuelt substituert heteroaryl;

R<sup>b</sup> er valgt fra H, eventuelt substituert C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alkyl, eventuelt substituert aryl og eventuelt substituert heteroaryl; og

R<sup>c</sup> er valgt fra hydrogen og eventuelt substituert C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl; eller

R<sup>b</sup> og R<sup>c</sup> sammen med nitrogenet som de er bundet til, danner eventuelt substituert 5-

til 7-leddet nitrogen-inneholdende heterocykloalkyl som eventuelt omfatter 1 eller 2 ytterligere heteroatomer valgt fra O, N og S i heterocykloalkylringen;

hvor hver eventuelt substituerte gruppe er usubstituert eller uavhengig substituert med én eller flere, så som én, to eller tre, substituenten uavhengig valgt fra C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl, aryl, heteroaryl, aryl-C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl-, heteroaryl-C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl-, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> halogenalkyl-, -OC<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl, -OC<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkylfenyl, -C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl-OH, -OC<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> halogenalkyl, halogen, -OH, -NH<sub>2</sub>, -C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl-NH<sub>2</sub>, -N(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl)(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl), -NH(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl), -N(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl)(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkylfenyl), -NH(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkylfenyl), cyano, nitro, okso (som substituent for cykloalkyl, heterocykloalkyl eller heteroaryl), -CO<sub>2</sub>H, -C(O)OC<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl, -CON(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl)(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl), -CONH(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl), -CONH<sub>2</sub>, -NHC(O)(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl), -NHC(O)(fenyl), -N(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl)C(O)(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl), -N(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl)C(O)(fenyl), -C(O)C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl, -C(O)C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> fenyl, -C(O)C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> halogenalkyl, -OC(O)C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl, -SO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl), -SO<sub>2</sub>(fenyl), -SO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> halogenalkyl), -SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>NH(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl), -SO<sub>2</sub>NH(fenyl), -NHSO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl), -NHSO<sub>2</sub>(fenyl) og -NHSO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> halogenalkyl). Ett eller flere karbonatomer i den substituerte acyl-resten kan være erstattet av nitrogen, oksygen eller svovel så lenge bindingspunktet til den parentale gruppen er ved karbonyl.

**[0050]** Betegnelsen "substituert alkoksy" angir alkoksy hvor alkyl-bestanddelen er substituert (dvs. -O-(substituert alkyl)) hvor "substituert alkyl" angir alkyl hvor ett eller flere (opptil 5, så som opptil 3) hydrogenatomer er erstattet med en substituent uavhengig valgt fra:

-R<sup>a</sup>, -OR<sup>b</sup>, -O(C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub> alkyl)O- (f.eks. metylendioksy-), -SR<sup>b</sup>, guanidin, guanidin hvor ett eller flere av guanidin-hydrogenene er erstattet med en lavere alkylgruppe, -NR<sup>b</sup>R<sup>c</sup>, halogen, cyano, nitro, -COR<sup>b</sup>, -CO<sub>2</sub>R<sup>b</sup>, -CONR<sup>b</sup>R<sup>c</sup>, -OCOR<sup>b</sup>, -OCO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -OCONR<sup>b</sup>R<sup>c</sup>, -NR<sup>c</sup>COR<sup>b</sup>, -NR<sup>c</sup>CO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -NR<sup>c</sup>CONR<sup>b</sup>R<sup>c</sup>, -SOR<sup>a</sup>, -SO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -SO<sub>2</sub>NR<sup>b</sup>R<sup>c</sup> og -NR<sup>c</sup>SO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>,

hvor R<sup>a</sup> er valgt fra eventuelt substituert C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alkyl, eventuelt substituert aryl og eventuelt substituert heteroaryl;

R<sup>b</sup> er valgt fra H, eventuelt substituert C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alkyl, eventuelt substituert aryl og eventuelt substituert heteroaryl; og R<sup>c</sup> er valgt fra hydrogen og eventuelt substituert C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl; hvor hver eventuelt substituerte gruppe er usubstituert eller uavhengig substituert med én eller flere, så som én, to eller tre, substituenten uavhengig valgt fra C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl, aryl, heteroaryl, aryl-C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl-, heteroaryl-C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl-, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> halogenalkyl-, -OC<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl, -OC<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkylfenyl, -C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl-OH, -OC<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> halogenalkyl, halogen, -OH, -NH<sub>2</sub>, -C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl-NH<sub>2</sub>, -N(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl)(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl), -NH(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl),

-N(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl)(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkylfenyl), -NH(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkylfenyl), cyano, nitro, okso (som substituent for cykloalkyl, heterocykloalkyl eller heteroaryl), -CO<sub>2</sub>H, -C(O)OC<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl, -CON(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl)(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl), -CONH(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl), -CONH<sub>2</sub>, -NHC(O)(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl), -NHC(O)(fenyl), -N(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl)C(O)(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl), -N(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl)C(O)(fenyl), -C(O)C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl, -C(O)C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> fenyl, -C(O)C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> halogenalkyl, -OC(O)C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl, -SO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl), -SO<sub>2</sub>(fenyl), -SO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> halogenalkyl), -SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>NH(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl), -SO<sub>2</sub>NH(fenyl), -NHSO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl), -NHSO<sub>2</sub>(fenyl) og -NHSO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> halogenalkyl). I noen utførelsesformer er en substituert alkoksygruppe "polyalkoksy" eller -O-(eventuelt substituert alkyl)-(eventuelt substituert alkoksy) og omfatter grupper så som -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub> og rester av glykoletere så som polyetylenglykol og -O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>x</sub>CH<sub>3</sub>, hvor x er et helt tall på 2-20, så som 2-10 og for eksempel 2-5. En annen substituert alkoksygruppe er hydroksyalkoksy eller -OCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>y</sub>OH, hvor y er et helt tall på 1-10, så som 1-4.

**[0051]** Betegnelsen "substituert alkoksykarbonyl" angir gruppen (substituert alkyl)-O-C(O)- hvor gruppen er bundet til moder-strukturen gjennom karbonylfunksjonaliteten og hvor substituert angir alkyl hvor ett eller flere (opptil 5, så som opptil 3) hydrogenatomer er erstattet med en substituent uavhengig valgt fra:

-R<sup>a</sup>, -OR<sup>b</sup>, -O(C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub> alkyl)O- (f.eks. metylendioksy-), -SR<sup>b</sup>, guanidin, guanidin hvor ett eller flere av guanidin-hydrogenene er erstattet med en lavere alkylgruppe, -NR<sup>b</sup>R<sup>c</sup>, halogen, cyano, nitro, -COR<sup>b</sup>, -CO<sub>2</sub>R<sup>b</sup>, -CONR<sup>b</sup>R<sup>c</sup>, -OCOR<sup>b</sup>, -OCO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -OCONR<sup>b</sup>R<sup>c</sup>, -NR<sup>c</sup>COR<sup>b</sup>, -NR<sup>c</sup>CO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -NR<sup>c</sup>CONR<sup>b</sup>R<sup>c</sup>, -CO<sub>2</sub>R<sup>b</sup>, -CONR<sup>b</sup>R<sup>c</sup>, -NR<sup>c</sup>COR<sup>b</sup>, -SOR<sup>a</sup>, -SO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -SO<sub>2</sub>NR<sup>b</sup>R<sup>c</sup> og -NR<sup>c</sup>SO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>,

hvor R<sup>a</sup> er valgt fra eventuelt substituert C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alkyl, eventuelt substituert aryl og eventuelt substituert heteroaryl;

R<sup>b</sup> er valgt fra H, eventuelt substituert C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alkyl, eventuelt substituert aryl og eventuelt substituert heteroaryl; og

R<sup>c</sup> er valgt fra hydrogen og eventuelt substituert C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl; eller

R<sup>b</sup> og R<sup>c</sup> sammen med nitrogenet som de er bundet til, danner eventuelt substituert 5-til 7-leddet nitrogen-inneholdende heterocykloalkyl som eventuelt omfatter 1 eller 2 ytterligere heteroatomer valgt fra O, N og S i heterocykloalkylringen;

hvor hver eventuelt substituerte gruppe er usubstituert eller uavhengig substituert med én eller flere, så som én, to eller tre, substituenten uavhengig valgt fra C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl, aryl, heteroaryl, aryl-C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl-, heteroaryl-C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl-, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> halogenalkyl-, -OC<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl,

-OC<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkylfenyl, -C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl-OH, -OC<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> halogenalkyl, halogen, -OH, -NH<sub>2</sub>,  
 -C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl-NH<sub>2</sub>, -N(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl)(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl), -NH(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl),  
 -N(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl)(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkylfenyl), -NH(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkylfenyl), cyano, nitro, okso (som  
 substituent for cykloalkyl, heterocykloalkyl eller heteroaryl), -CO<sub>2</sub>H, -C(O)OC<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl,  
 -CON(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl)(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl), -CONH(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl), -CONH<sub>2</sub>, -NHC(O)(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl),  
 -NHC(O)(fenyl), -N(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl)C(O)(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl), -N(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl)C(O)(fenyl),  
 -C(O)C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl, -C(O)C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> fenyl, -C(O)C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> halogenalkyl, -OC(O)C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl,  
 -SO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl), -SO<sub>2</sub>(fenyl), -SO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> halogenalkyl), -SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>NH(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl),  
 -SO<sub>2</sub>NH(fenyl), -NHSO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl), -NHSO<sub>2</sub>(fenyl) og -NHSO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> halogenalkyl).

**[0052]** Betegnelsen "substituert amino" angir gruppen -NHR<sup>d</sup> eller -NR<sup>d</sup>R<sup>d</sup> hvor hver R<sup>d</sup> uavhengig er valgt fra: eventuelt substituert alkyl, eventuelt substituert cykloalkyl, eventuelt substituert acyl, eventuelt substituert aryl, eventuelt substituert heteroaryl, eventuelt substituert heterocykloalkyl, alkoksykarbonyl, sulfinyl og sulfonyl, hvor substituert alkyl, cykloalkyl, aryl, heterocykloalkyl og heteroaryl refererer til henholdsvis alkyl, cykloalkyl, aryl, heterocykloalkyl og heteroaryl hvor ett eller flere (opptil 5, så som opptil 3) hydrogenatomer er erstattet med en substituent uavhengig valgt fra:

-R<sup>a</sup>, -OR<sup>b</sup>, -O(C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub> alkyl)O- (f.eks. metylendioksy-), -SR<sup>b</sup>, guanidin, guanidin hvor ett eller flere av guanidin-hydrogenene er erstattet med en lavere-alkylgruppe, -NR<sup>b</sup>R<sup>c</sup>, halogen, cyano, nitro, -COR<sup>b</sup>, -CO<sub>2</sub>R<sup>b</sup>, -CONR<sup>b</sup>R<sup>c</sup>, -OCOR<sup>b</sup>, -OCO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -OCONR<sup>b</sup>R<sup>c</sup>, -NR<sup>c</sup>COR<sup>b</sup>, -NR<sup>c</sup>CO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -NR<sup>c</sup>CONR<sup>b</sup>R<sup>c</sup>, -CO<sub>2</sub>R<sup>b</sup>, -CONR<sup>b</sup>R<sup>c</sup>, -NR<sup>c</sup>COR<sup>b</sup>, -SOR<sup>a</sup>, -SO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -SO<sub>2</sub>NR<sup>b</sup>R<sup>c</sup> og -NR<sup>c</sup>SO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>,

hvor R<sup>a</sup> er valgt fra eventuelt substituert C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alkyl, eventuelt substituert aryl og eventuelt substituert heteroaryl;

R<sup>b</sup> er valgt fra H, eventuelt substituert C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alkyl, eventuelt substituert aryl og eventuelt substituert heteroaryl; og

R<sup>c</sup> er valgt fra hydrogen og eventuelt substituert C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl; eller

R<sup>b</sup> og R<sup>c</sup> sammen med nitrogenet som de er bundet til, danner eventuelt substituert 5-til 7-leddet nitrogen-inneholdende heterocykloalkyl som eventuelt omfatter 1 eller 2 ytterligere heteroatomer valgt fra O, N og S i heterocykloalkylringen;

hvor hver eventuelt substituerte gruppe er usubstituert eller uavhengig substituert med én eller flere, så som én, to eller tre, substituent uavhengig valgt fra C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl, aryl, heteroaryl, aryl-C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl-, heteroaryl-C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl-, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> halogenalkyl-, -OC<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl, -OC<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkylfenyl, -C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl-OH, -OC<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> halogenalkyl, halogen, -OH, -NH<sub>2</sub>,

-C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl-NH<sub>2</sub>, -N(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl)(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl), -NH(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl),  
 -N(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl)(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkylfenyl), -NH(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkylfenyl), cyano, nitro, okso (som  
 substituent for cykloalkyl, heterocykloalkyl eller heteroaryl), -CO<sub>2</sub>H, -C(O)OC<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl,  
 -CON(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl)(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl), -CONH(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl), -CONH<sub>2</sub>, -NHC(O)(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl),  
 -NHC(O)(fenyl), -N(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl)C(O)(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl), -N(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl)C(O)(fenyl),  
 -C(O)C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl, -C(O)C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> fenyl, -C(O)C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> halogenalkyl, -OC(O)C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl,  
 -SO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl), -SO<sub>2</sub>(fenyl), -SO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> halogenalkyl), -SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>NH(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl),  
 -SO<sub>2</sub>NH(fenyl), -NHSO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl), -NHSO<sub>2</sub>(fenyl) og -NHSO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> halogenalkyl) og

hvor eventuelt substituert acyl, alkoksykarbonyl, sulfinyl og sulfonyl er som definert her.

**[0053]** Forbindelser ifølge oppfinnelsen omfatter optiske isomerer av forbindelser med formel I, racemater og andre blandinger derav. I tillegg omfatter forbindelser med formel I Z- og E-former (eller *cis*- og *trans*-former) av forbindelser med karbon-karbon-dobbeltbindinger. I de situasjoner kan de enkle enantiomerer eller diastereomerer, dvs. optisk aktive former, oppnås ved asymmetrisk syntese eller ved spaltning av racematene. Spaltning av racematene kan gjennomføres, for eksempel ved konvensjonelle metoder så som krystallisering i nærvær av et oppløsningsmiddel eller kromatografi, ved anvendelse av for eksempel chiral høytrykk væskrokromatografi- (HPLC) kolonne. Når forbindelser med formel I eksisterer i forskjellige tautomere former, omfatter kjemiske enheter ifølge foreliggende oppfinnelse alle tautomere former av forbindelsen.

**[0054]** Forbindelser ifølge oppfinnelsen omfatter også krystallinske og amorfe former av forbindelsene, omfattende for eksempel polymorfer, pseudopolymorfer, solvater, hydrater, usolvaterte polymorfer (omfattende anhydrater), konformasjonelle polymorfer og amorfe former av forbindelsene, så vel som blandinger derav. "Krystallinsk form," "polymorf," og "ny form" kan anvendes om hverandre her og skal omfatte alle krystallinske og amorfe former av forbindelsen, omfattende for eksempel polymorfer, pseudopolymorfer, solvater, hydrater, usolvaterte polymorfer (omfattende anhydrater), konformasjonelle polymorfer og amorfe former, så vel som blandinger derav, hvis ikke en spesiell krystallinsk eller amorf form er referert til.

**[0055]** Kjemiske enheter ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter forbindelser og alle farmasøytisk akseptable former derav. Farmasøytisk akseptable former av forbindelsene angitt her omfatter farmasøytisk akseptable salter, chelater, ikke-kovalente komplekser, prodrug og blandinger derav. I visse utførelsesformer er forbindelsene beskrevet her i form av farmasøytisk akseptable salter. Således omfatter betegnelsene "kjemisk enhet" og

“kjemiske enheter” også farmasøytisk akseptable salter, chelater, ikke-kovalente komplekser, prodrug og blandinger.

[0056] “Farmasøytisk akseptable salter” omfatter salter med uorganiske syrer, så som hydroklorat, fosfat, difosfat, hydrobromat, sulfat, sulfinat, nitrat og lignende salter; så vel som salter med en organisk syre, så som malat, maleat, fumarat, tartrat, succinat, citrat, acetat, laktat, metansulfonat, p-toluensulfonat, 2-hydroksyetylsulfonat, benzoat, salicylat, stearat og alkanoat så som acetat,  $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$  hvor n er 0-4 og lignende salter. Tilsvarende omfatter farmasøytisk akseptable kationer, natrium, kalium, kalsium, aluminium, litium og ammonium.

[0057] I tillegg, hvis en forbindelse blir oppnådd som et syreaddisjonssalt, kan den frie basen oppnås ved alkalisering av en løsning av syresaltet. Omvendt, hvis produktet er en fri base, kan et addisjonssalt, spesielt et farmasøytisk akseptabelt addisjonssalt, produseres ved oppløsning av den frie basen i et egnet organisk løsningsmiddel og behandling av løsningen med en syre, i henhold til konvensjonelle metoder for fremstilling av syreaddisjonssalter fra basiske forbindelser. Fagfolk på området vil kjenne forskjellige syntesemetoder som kan anvendes for å fremstille ikke-toksiske farmasøytisk akseptable addisjonssalter.

[0058] Betegnelsen “solvat” angir den kjemiske enhet dannet ved interaksjon av et løsningsmiddel og en forbindelse. Egnede solvater er farmasøytisk akseptable solvater, så som hydrater, omfattende for eksempel hemi-hydrater, monohydrater, dihydrater, trihydrater.

[0059] Betegnelsen “aktivt middel” blir anvendt for å angi en kjemisk enhet som har biologisk aktivitet. I visse utførelsesformer er et “aktivt middel” en forbindelse som er farmasøytisk nyttig.

[0060] Betegnelsen "terapeutisk effektiv mengde" av en kjemisk enhet ifølge foreliggende oppfinnelse betyr en mengde effektiv, når administrert til et menneske eller en ikke-human pasient, til å behandle en sykdom, f.eks. kan en terapeutisk effektiv mengde være en mengde tilstrekkelig til å behandle en sykdom eller lidelse mottagelig for myosin-aktivisering. Den terapeutisk effektive mengden kan bestemmes eksperimentelt, for eksempel ved å undersøke blodkonsentrasjonen av den kjemiske enhet eller teoretisk, ved å beregne biotilgjengelighet.

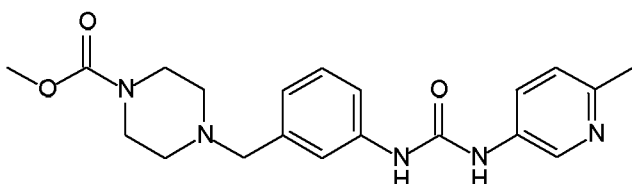
[0061] Med “betydelig” menes hvilken som helst detekterbar forandring som er statistisk signifikant i en standard parametriske test av statistisk signifikans så som Student's T-test, hvor  $p < 0,05$ .

[0062] “Pasient” angir et dyr, så som et pattedyr, for eksempel et menneske, som er eller vil bli gjenstand for behandling, observasjon eller forsøk. Metodene ifølge oppfinnelsen kan være anvendelige i både human terapi og veterinær-anvendelser. I noen utførelsesformer er pasienten et pattedyr og i noen utførelsesformer er pasienten et menneske.

[0063] “Behandling” eller “behandling av” betyr hvilken som helst behandling av en sykdom hos en pasient, omfattende:

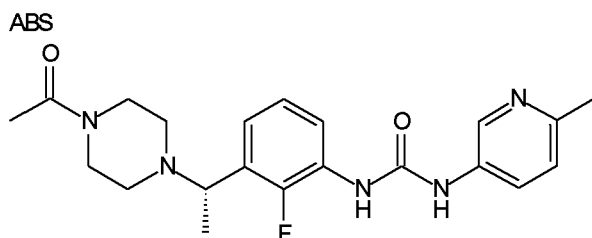
- a) forhindring av sykdommen, dvs. forårsake at de kliniske symptomene på sykdommen ikke utvikles;
- b) hemning av sykdommen;
- c) sinking eller stansing av utvikling av kliniske symptomer; og/eller
- d) lindring av sykdommen, dvs. forårsake regresjonen av kliniske symptomer.

[0064] Forbindelsene ifølge oppfinnelsen kan betegnes og nummereres (f.eks. ved anvendelse av NamExpert™ tilgjengelig fra Cheminnovation eller det automatiske navnings-system i ChemDraw Ultra versjon 9.0 fra Cambridge Soft Corporation) som beskrevet nedenfor. For eksempel kan forbindelsen:



betegnes metyl-4-[(3-[(6-metyl-3-pyridyl)amino]karbonylamino}fenyl)metyl]piperazinkarboksylat.

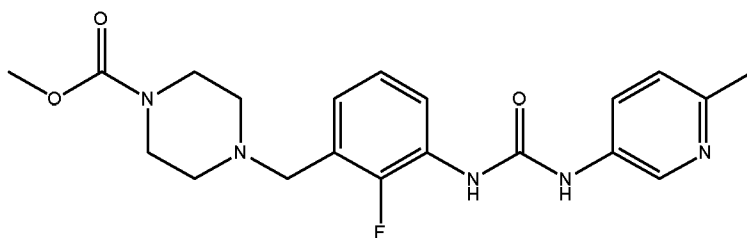
Likeledes kan forbindelsen:



betegnes N-{3-[(1S)-1-(4-acetylpiperazinyl)etyl]-2-fluorfenyl}[(6-metyl(3-pyridyl))amino]karboksamid.

[0065] Likeledes kan forbindelsen





betegnes [3-fluor-5-(3-pyridin-3-yl-ureido)-benzyl]-metyl-karbaminsyre-metylester eller metyl-4-[(2-fluor-3-[(6-metyl(3-pyridyl))amino]karbonylamino}fenyl)metyl]piperazinkarboksylat.

**[0066]** De kjemiske enheter beskrevet her kan syntetiseres ved anvendelse av teknikker velkjent på området, f.eks. som illustrert nedenfor med referanse til reaksjonsskjemaene.

**[0067]** Hvis ikke spesifisert på annen måte finner reaksjonene beskrevet her sted ved atmosfærisk trykk, generelt innen et temperaturområde fra  $-10^{\circ}\text{C}$  til  $110^{\circ}\text{C}$ . Videre, bortsett fra som anvendt i eksemplene eller som på annen måte spesifisert, skal reaksjonstider og -betingelser være omtrentlige, f.eks. finne sted ved ca. atmosfærisk trykk innen et temperaturområde på ca.  $-10^{\circ}\text{C}$  til ca.  $110^{\circ}\text{C}$  over en periode på ca. 1 til ca. 24 timer; reaksjoner som blir kjørt natten over har gjennomsnittlig en periode på ca. 16 timer.

**[0068]** Betegnelsene "løsningsmiddel", "organisk løsningsmiddel" eller "inert løsningsmiddel" betyr hver et løsningsmiddel inert under reaksjonsbetingelsene beskrevet i forbindelse dermed [omfattende for eksempel benzen, toluen, acetonitril, tetrahydrofuran ("THF"), dimetylformamid ("DMF"), kloroform, metylenklorid (eller diklormetan), dietyleter, metanol, pyridin]. Hvis ikke spesifisert på annen måte er løsningsmidlene anvendt i reaksjonene ifølge foreliggende oppfinnelse inerte organiske løsningsmidler.

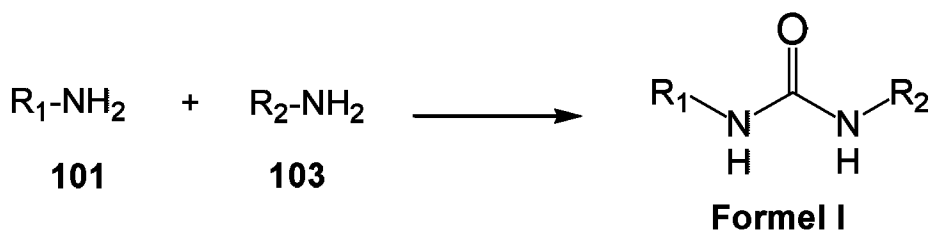
**[0069]** Isolering og rensning av de kjemiske forbindelser og mellomprodukter beskrevet her kan utføres, om ønsket, ved hvilken som helst egnet separerings- eller rensnings-prosedyre så som for eksempel filtrering, ekstraksjon, krystallisering, kolonnekromatografi, tynnsjiktskromatografi eller tykksjiktskromatografi eller en kombinasjon av disse prosedyrer. Spesifikke illustrasjoner av egnede separerings- og isoleringsprosedyrer kan finnes med referanse til eksemplene nedenfor. Imidlertid kan andre ekvivalente separerings- eller isoleringsprosedyrer også anvendes.

**[0070]** Når ønsket kan (R)- og (S)-isomerer spaltes ved metoder kjent for fagfolk på området, for eksempel ved dannelse av diastereoisomere salter eller komplekser som kan separeres, for eksempel ved krystallisering; via dannelse av diastereoisomere derivater som

kan separeres, for eksempel ved krystallisasjon, gass-væske- eller væskekromatografi; selektiv omsetning av én enantiomer med et enantiomer-spesifikt reagens, for eksempel enzymatisk oksidasjon eller reduksjon, fulgt av separering av de modifiserte og umodifiserte enantiomerer; eller gass-væske- eller væskekromatografi i en chiral omgivelse for eksempel på en chiral bærer, så som silika med en bundet chiral ligand eller i nærvær av et chiralt løsningsmiddel. Alternativt kan en spesifikk enantiomer syntetiseres ved asymmetrisk syntese ved anvendelse av optisk aktive reagenser, substrater, katalysatorer eller løsningsmidler eller ved omdannelse av én enantiomer til den andre ved asymmetrisk transformasjon.

[0071] Mange av de eventuelt substituerte utgangsf forbindelser 101, 103, 201, 301 og andre reaktanter er kommersielt tilgjengelige, f.eks. fra Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI) eller kan lett fremstilles av fagfolk på området ved anvendelse av vanlig anvendt syntesemetodikk.

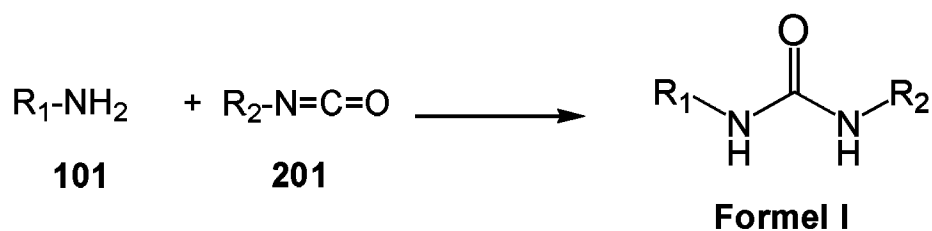
#### REAKSJONSSKJEMA 1



#### [0072] Fremstilling av Forbindelser med formel I

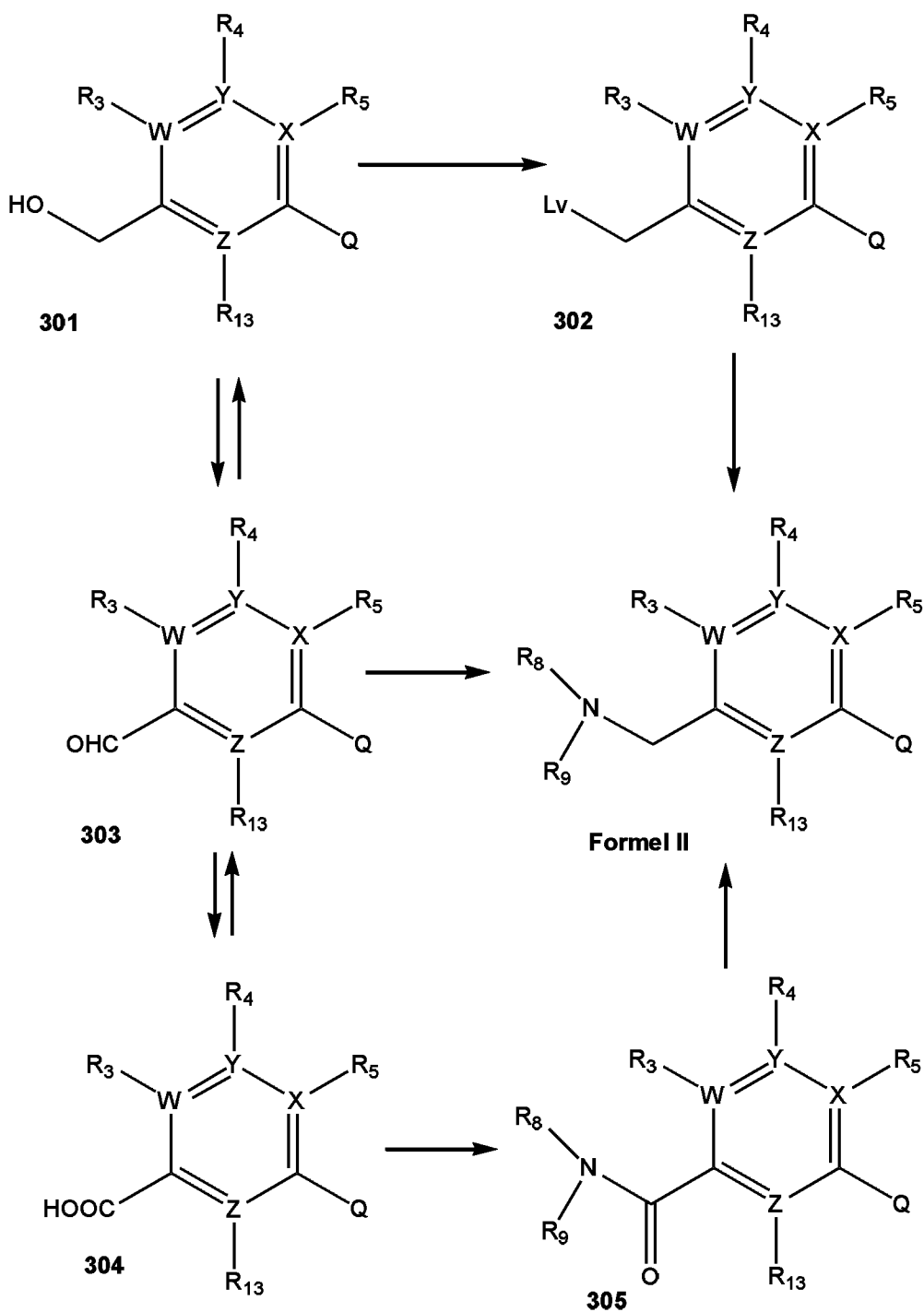
Med henvisning til Reaksjonsskjema 1 blir en kolbe utstyrt med en magnetisk rører, tilbakeløpskjøler og termometerlomme, under nitrogen, fylt med fosgen eller en fosgen-ekvivalent (typisk trifosgen) og et ikke-polart, aprotisk løsningsmiddel så som diklormetan eller tetrahydrofuran. En løsning av en forbindelse med formel 101 i et ikke-polart, aprotisk løsningsmiddel så som diklormetan eller tetrahydrofuran blir tilsatt dråpevis over ca. 10-60 minutter og løsningen får omrøres mellom 1 til 15 timer. En forbindelse med formel 103 blir tilsatt porsjonsvis og løsningen blir omrørt i ca. 10-60 min. En base, så som DIEA, blir tilsatt dråpevis i ca. én time og løsningen får omrøres i ca. 1-15 timer. Produktet, en forbindelse med formel 105, blir isolert og rensset.

## REAKSJONSSKJEMA 2

**[0073] Fremstilling av Forbindelser med formel I**

Reaksjonsskjema 2 illustrerer en alternativ syntese av forbindelser med formel I. Isocyanatet med formel 201 kan dannes og isoleres uavhengig av enten tilsvarende amin (dvs.  $R_2-NH_2$ ) ved anvendelse av fosgen eller en fosgen-ekvivalent eller av den tilsvarende karboksylsyre (dvs.  $R_2-COOH$ ) ved anvendelse av en Curtius eller Hoffman omleiring. En blanding av forbindelser med formel 101 og 201 i et aprotisk løsningsmiddel så som diklormetan eller tetrahydrofuran fra  $-40^\circ C$  til  $110^\circ C$  får omrøres i mellom 1 til 15 timer. Produktet, en forbindelse med formel I, blir isolert og renset.

## REAKSJONSSKJEMA 3

**[0074] Fremstilling av Forbindelser med formel II**

Med henvisning til Reaksjonsskjema 3 blir benzyl-alkoholen med formel 301 omdannet til en utgående gruppe ("Lv" så som halogen, mesylat eller triflat), 302 ved anvendelse av vanlig anvendt syntesemetodikk (se for eksempel: "Comprehensive Organic Transformation" LaRock, Richard C., 1989, VCH publishers, Inc. s. 353-365).

[0075] En blanding av en forbindelse med formel 302 og amin med formel  $\text{HNR}_3\text{R}_9$  i et aprotisk løsningsmiddel så som diklormetan eller DMF fra  $-40^\circ\text{C}$  til  $110^\circ\text{C}$  får omrøres i mellom 1 til 15 timer. Produktet, en forbindelse med formel II, blir isolert og renset.

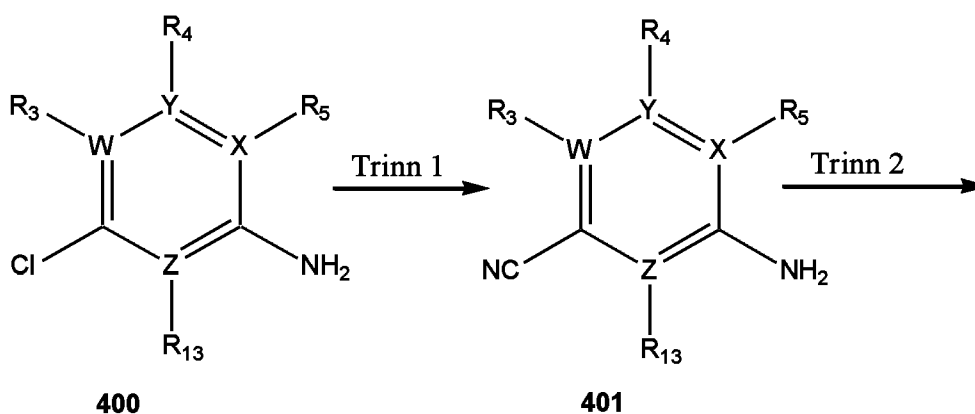
[0076] Alternativt blir benzyl-alkoholen med formel 301 oksidert til aldehydet med formel 303 ved anvendelse av vanlig anvendt syntesemetodikk (se for eksempel: "Comprehensive Organic Transformation" LaRock, Richard C., 1989, VCH publishers, Inc. s. 604-615.).

[0077] En blanding av en forbindelse med formel 303 og amin med formel  $\text{HNR}_3\text{R}_9$  i et løsningsmiddel så som diklormetan med et reduksjonsmiddel så som triacetoksyborhydrid med eller uten en syre så som eddiksyre fra  $-40^\circ\text{C}$  til  $110^\circ\text{C}$  får omrøres i mellom 1 til 36 timer. Produktet, en forbindelse med formel II, blir isolert og renset.

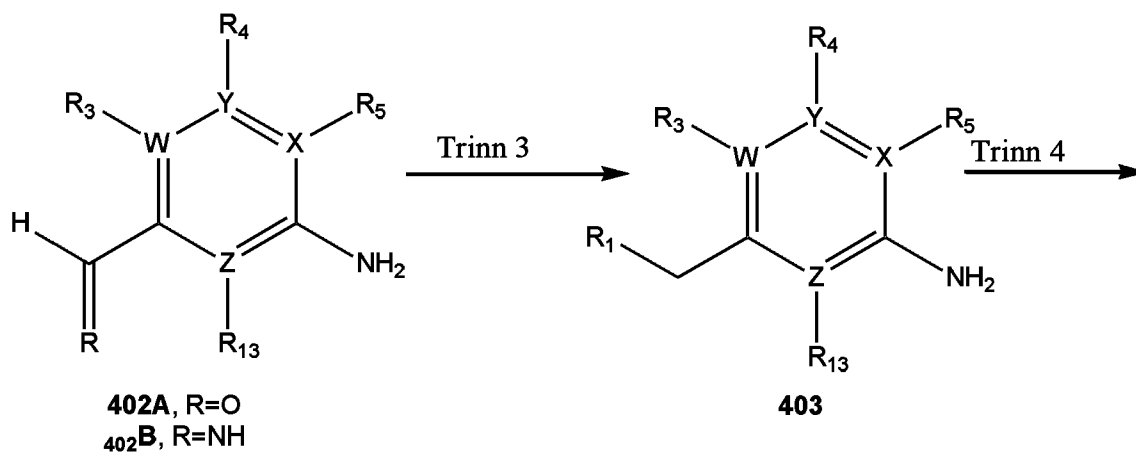
[0078] Alternativt blir karboksylsyren med formel 304 koblet til et amin ved anvendelse av vanlig anvendt syntesemetodikk (se for eksempel: "Comprehensive Organic Transformation" LaRock, Richard C., 1989, VCH publishers, Inc. s. 972-976) for å danne amid 305. Amid 305 blir redusert til en forbindelse med formel II ved anvendelse av vanlig anvendt syntesemetodikk så som behandling av 305 med boran-dimetylsulfid i THF fra  $-40^\circ\text{C}$  til tilbakeløp i 1 til 96 timer.

[0079] En forbindelse med formel II hvor Q er brom, klor, nitro, amino eller beskyttet amino kan omdannes til en forbindelse med formel 101 ved anvendelse av vanlig anvendt syntesemetodikk. Når for eksempel Q er nitro, kan den reduseres til det tilsvarende amin ved anvendelse av hydrogen med en Pd/C katalysator.

#### Reaksjonsskjema 4



29



[0080] Med henvisning til Reaksjonsskjema 4, Trinn 1, blir til en løsning av en forbindelse med formel 400 i NMP tilsatt et overskudd (så som ca. minst 2 ekvivalenter) av natriumcyanid og et overskudd (så som minst 1 ekvivalent, for eksempel 1,35 ekvivalenter) av nikkell(II)bromid. Ytterligere NMP blir tilsatt og løsningen blir forsiktig oppvarmet til ca. 200°C og omrørt i ca. 4 dager. Produktet, en forbindelse med formel 401, blir isolert og eventuelt renset.

[0081] Til en ~0°C løsning av en forbindelse med formel 401 i et inert løsningsmiddel så som diklormetan blir satt et overskudd (så som to eller flere ekvivalenter) av et reduksjonsmiddel, så som DIBAL-H (så som en 1 M løsning av DIBAL-H) dråpevis over ~3,5 timer, mens en indre reaksjonstemperatur ≤ 0°C opprettholdes. Produktet, en blanding av forbindelser med formel 402A og 402B, blir isolert og eventuelt renset.

[0082] Med henvisning til Reaksjonsskjema 4, Trinn 3, blir til en løsning av en blanding av forbindelser med formel 402A og 402B i et inert løsningsmiddel så som THF tilsatt et overskudd (så som ca. 1,05 ekvivalenter) av en forbindelse med formelen R<sub>1</sub>-H hvor R<sub>1</sub> er eventuelt substituert amino eller eventuelt substituert heterocykloalkyl og et overskudd (så som ca. 1,5 ekvivalenter) av et reduksjonsmiddel så som triacetoksyborhydrid porsjonsvis

over ~40 min, mens en indre reaksjonstemperatur under ca. 45°C opprettholdes. Produktet, en forbindelse med formel 403, blir isolert og eventuelt renset.

**[0083]** Med henvisning til Reaksjonsskjema 4, Trinn 4, blir til en løsning av en forbindelse med formel 403 i et løsningsmiddel så som aceton, tilsatt dråpevis ca. en ekvivalent av en forbindelse med formelen R<sub>2</sub>-NCO. Reaksjonsblandingen blir omrørt i ca. én time og eventuelt oppvarmet til tilbakeløp. Produktet, en forbindelse med formel 405, blir isolert og eventuelt renset.

**[0084]** En racemisk blanding blir eventuelt plassert på en kromatografikolonne og separert i (R)- og (S)-enantiomerer.

**[0085]** En forbindelse med formel I blir eventuelt bragt i kontakt med en farmasøytisk akseptabel syre for å danne det tilsvarende syreaddisjonssalt.

**[0086]** Et farmasøytisk akseptabelt syreaddisjonssalt av Formel I blir eventuelt bragt i kontakt med en base for å danne den tilsvarende frie base med formel I.

**[0087]** Visse utførelsesformer av oppfinnelsen omfatter eller anvender forbindelsene med formel I som har de følgende kombinasjoner og permutasjoner av substituent-grupper. Disse er presentert for å støtte andre kombinasjoner og permutasjoner av substituent-grupper, som for korthets skyld ikke spesifikt er beskrevet her, men skal forstås å være omfattet av foreliggende beskrivelse.

**[0088]** I visse utførelsesformer er forbindelsen:

metyl-4-[(2-fluor-3-{{(6-metyl(3-pyridyl))amino}karbonylamino} fenyl)metyl]-  
piperazinkarboksylat;

metyl-4-[(3-fluor-5-{{(6-metyl(3-  
pyridyl))amino}karbonylamino} fenyl)metyl]piperazinkarboksylat;

metyl-4-[(3-{{(6-metyl-3-pyridyl)amino}karbonylamino} fenyl)metyl]piperazinkarboksylat;

etyl-4-[(4-fluor-3-{{(6-metyl(3-pyridyl))amino}karbonylamino} fenyl)metyl]-  
piperazinkarboksylat;

metyl-4-[(1S)-1-(5-fluor-3-{{(6-metyl(3-pyridyl))amino}karbonylamino} fenyl)etyl]-  
piperazinkarboksylat;

N-{{3-[(1S)-1-(4-acetylpiperazinyl)etyl]-2-fluorfenyl}{{(6-metyl(3-  
pyridyl))amino}karboksamid};

**[0089]** De kjemiske enheter beskrevet her er selektive for og modulerer hjertesarkomere og er anvendelige for å binde til og/eller forsterke aktiviteten til hjerte-myosin, idet de øker graden i hvilken myosin hydrolyserer ATP. Som anvendt i denne sammenheng betyr “modulere” enten øke eller redusere myosin-aktivitet, mens “forsterke” betyr å øke

aktiviteten. Det har også vært funnet ved testing av representative forbindelser ifølge oppfinnelsen, at deres administrering også kan øke den kontraktile kraft i hjertemuskel-fiber.

[0090] De kjemiske enheter, farmasøytiske preparater og kjemiske enheter og farmasøytiske preparater for anvendelse i metoder ifølge oppfinnelsen blir anvendt for å behandle hjertesykdom, omfattende: akutt (eller dekompensert) kongestiv hjertesvikt og kronisk kongestiv hjertesvikt; spesielt sykdommer forbundet med systolisk hjertedysfunksjon. Ytterligere terapeutiske anvendelser omfatter administrering for å stabilisere hjertefunksjon hos pasienter som venter på hjertetransplantat og hjelpe et stanset eller langsomtstående hjerte til å gjenoppta normal funksjon etter anvendelse av en bypass-pumpe.

[0091] ATP-hydrolyse blir anvendt av myosin i sarkomeren for å produsere kraft. Derfor vil en økning i ATP-hydrolyse svare til en økning i kraften eller hastigheten av muskel-kontraksjon. I nærvær av aktin blir myosin ATPase-aktivitet stimulert >100 ganger. Således måler ATP-hydrolyse ikke bare myosin enzymatisk aktivitet men også dens interaksjon med aktin-filament. En forbindelse som modulerer hjerte-sarkomeren kan identifiseres ved en økning eller reduksjon i graden av ATP-hydrolyse av myosin, som i visse utførelsesformer, har en 1,4 ganger økning i konsentrasjon mindre enn 10  $\mu\text{M}$  (så som mindre enn 1  $\mu\text{M}$ ). Forsøk for slik aktivitet kan anvende myosin fra en human kilde, selv om myosin fra andre organismer vanligvis blir anvendt. Systemer som modellerer den regulatoriske rolle til kalsium i myosin-binding til det dekorerte tynne filament blir også anvendt.

[0092] Alternativt kan biokjemisk funksjonell sarkomere-preparering anvendes for å bestemme *in vitro* ATPase-aktivitet, for eksempel som beskrevet i U.S. søknad 09/539,164, innlevert 29. mars 2000. Den funksjonelle biokjemisk adferd av sarkomeren, omfattende kalsium-sensitivitet ved ATPase-hydrolyse, kan rekonstitueres ved å kombinere dens rensede individuelle komponenter (spesielt omfattende dens regulatoriske komponenter og myosin). En annen funksjonell preparering er *in vitro* motilitetsforsøk. Det kan utføres ved tilsetning av testforbindelse til et myosin-bundet objektglass og observere hastigheten av aktin-filamenter som glir over den myosin-dekkede glassoverflate (Kron SJ. (1991) *Methods Enzymol.* 196:399-416).

[0093] *In vitro* hastigheten av ATP-hydrolyse korrelerer med den myosin-forsterkende aktivitet, som kan bestemmes ved overvåking av produksjon av enten ADP eller fosfat, for eksempel som beskrevet i søknad nr. 09/314,464, innlevert 18. mai, 1999. ADP produksjon kan også overvåkes ved kobling av ADP-produksjon til NADH-oksidasjon (ved anvendelse av enzymene pyruvat-kinase og laktat-dehydrogenase) og overvåking av



NADH-nivået enten ved absorbans eller fluorescens (Greengard, P., *Nature* 178 (Part 4534): 632-634 (1956); *Mol Pharmacol* 1970 Jan;6(1):31-40). Fosfat-produksjon kan overvåkes ved anvendelse av purin-nukleosid-fosforylase for å koble fosfat-produksjon til spaltning av en purin-analog, som resulterer i enten en forandring i absorbans (*Proc Natl Acad Sci U S A* 1992 Jun 1;89(11):4884-7) eller fluorescens (*Biochem J* 1990 Mar 1;266(2):611-4). Mens en enkel måling kan anvendes vil generelt multiple målinger av samme prøve på forskjellige tider bli tatt for å bestemme den absolutte grad av protein-aktivitet; slike målinger har høyere spesifisitet spesielt i nærvær av testforbindelser som har lignende absorbans- eller fluorescens-egenskaper som de til den enzymatiske utlesning.

**[0094]** Testforbindelser kan undersøkes på en meget parallell måte ved anvendelse av multibrønn plater ved å plassere forbindelsene enten individuelt i brønner eller testing av dem i blandinger. Forsøkskomponenter omfattende mål-protein-kompleks, koblingsenzymer og substrater og ATP kan deretter settes til brønnene og absorbansen eller fluorescensen i hver brønn av platen kan måles med en plateleser.

**[0095]** En metode anvender et 384 brønn plateformat og et 25  $\mu$ L reaksjonsvolum. Et pyruvat-kinase/laktat-dehydrogenase-koblet enzymesystem (Huang TG og Hackney DD. (1994) *J Biol Chem* 269(23):16493-16501) blir anvendt for å måle graden av ATP-hydrolyse i hver brønn. Som det vil forstås av fagfolk på området blir forsøkskomponenter tilsatt i buffere og reagenser. Siden metodene beskrevet her tillater kinetiske målinger, blir inkuberingsperioder optimalisert for å gi tilstrekkelige deteksjonssignaler over bakgrunnen. Forsøket blir utført i sanntid hvilket gir kinetikken av ATP-hydrolyse, som øker signalet til støyforhold av forsøket.

**[0096]** Modulering av hjertemuskel-fiber ATPase og/eller kontraktil kraft kan også måles ved anvendelse av detergent-permeabiliserte hjertefibere (også referert til som skrubbede "skinned" hjertefibere) eller myofibriller (subcellulære muskel-fragmenter), for eksempel som beskrevet av Haikala H, et al (1995) *J Cardiovasc Pharmacol* 25(5):794-801. Skrubbede hjertefibere beholder deres iboende sarkomere organisering, men beholder ikke alle aspekter av cellulær kalsium-cyklisering; denne modell gir to fordeler: for det første blir den cellulære membranen ikke en barriere for forbindelse-penetrering og for det andre blir kalsium-konsentrasjonen kontrollert. Derfor er hvilken som helst økning i ATPase eller kontraktil kraft et direkte mål for testforbindelsens effekt på sarkomere proteiner. ATPase-målinger blir utført ved anvendelse av metoder som beskrevet ovenfor. Spenningsmålinger blir utført ved å feste én ende av muskelfiberen til et stasjonært punkt og den andre enden til

en transducer som kan måle kraft. Etter strekking av fiberen for å fjerne slark, registrerer kraft-transduceren øket spenning ettersom fiberen begynner å trekke seg sammen. Denne måling er betegnet isometrisk spenning, siden fiberen ikke blir tillatt å forkortes. Aktivisering av den permeabiliserte muskelfiber blir fullført ved å plassere den i en bufret kalsiumløsning, fulgt av tilsetning av testforbindelse eller kontroll. Når testet på denne måten, forårsaket de kjemiske enheter beskrevet her en økning i kraft i kalsiumkonsentrasjoner forbundet med fysiologisk kontraktile aktivitet, men meget liten økning av kraft i relaxerings-buffer ved lave kalsiumkonsentrasjoner eller i fravær av kalsium (EGTA datapunkt).

[0097] Selektivitet for hjerte-sarkomere og hjerte-myosin kan bestemmes ved å anvende ikke-hjerte-sarkomere komponenter og myosin i én eller flere av de ovenfor beskrevne forsøk og sammenligne resultatene oppnådd med de oppnådd ved anvendelse av hjerte-ekvivalentene.

[0098] En kjemisk enhets evne til å øke observert ATPase-grad i et *in vitro* rekonstituert sarkomere-forsøk eller myofibrill kan være resultat av øket omløpsgrad av S1-myosin eller, alternativt, øket sensitivitet av dekorert aktin-filament for  $\text{Ca}^{++}$ -aktivisering. For å skille mellom disse to mulige virkningsmåter, blir effekten av den kjemiske enhet på ATPase-aktivitet til S1 med udekorerte aktin-filamenter initielt målt. Hvis en økning av aktivitet er observert, kan den kjemiske enhets effekt på det Ca-mottagelige regulatoriske apparat være motbevist. Et annet, mer sensitivt forsøk, kan anvendes for å identifisere kjemiske enheter hvis aktiverende effekt på S1-myosin blir forbedret i nærvær av dekorert aktin (sammenlignet med rene aktin-filamenter). I dette andre forsøk blir aktiviteter av hjerte-S1 og skjelett-S1 på hjerte- og skjelett-regulerte aktin-filamenter (i alle 4 permutasjoner) sammenlignet.

[0099] Innledende evaluering av *in vivo* aktivitet kan bestemmes i cellulære modeller av myocyt-kontraktilitet, f.eks. som beskrevet av Popping S, et al ((1996) Am. J. Physiol. 271: H357-H364) og Wolska BM, et al ((1996) Am. J. Physiol. 39:H24-H32). Én fordel ved myocyt-modellen er at komponent-systemene som resulterer i endringer i kontraktilitet kan isoleres og hoved-sted(er) for virkning bestemmes. Kjemiske enheter med cellulær aktivitet (for eksempel seleksjon av kjemiske enheter som har den følgende profil: > 120% økning i fraksjonert forkorting over basal med 2  $\mu\text{M}$  eller resulterer i endringer i diastolisk lengde (<5% forandring)) kan deretter bedømmes i hele organ-modeller, så som isolert hjerte- (Langendorff) modell av hjertefunksjon, *in vivo* ved anvendelse av ekkokardiografi eller ved invasive hemodynamiske metoder og i dyrebaserte hjertesvikt-modeller, så som rotte venstre

koronararterie okklusjons-modell. Endelig blir aktivitet for behandling av hjertesykdom demonstrert i blinde, placebo-kontrollerte, humane kliniske forsøk.

**[00100]** De kjemiske enheter beskrevet her blir administrert i en terapeutisk effektiv dose, f.eks. en dose tilstrekkelig til å gi behandling for sykdomstilstandene beskrevet tidligere. Mens humane dosenivåer ennå må optimaliseres for de kjemiske enheter beskrevet her, er generelt en daglig dose fra ca. 0,05 til 100 mg/kg kroppsvekt; i visse utførelsesformer ca. 0,10 til 10,0 mg/kg kroppsvekt og i visse utførelsesformer ca. 0,15 til 1,0 mg/kg kroppsvekt. Således vil for administrering til en person på 70 kg, i visse utførelsesformer, doseområdet være ca. 3,5 til 7000 mg pr. dag; i visse utførelsesformer ca. 7,0 til 700,0 mg pr. dag og i visse utførelsesformer ca. 10,0 til 100,0 mg pr. dag. Mengden av kjemisk enhet administrert vil selvfølgelig være avhengig av individet og sykdomstilstanden som behandles, alvorlighetsgraden av lidelsen, metode og regime for administrering og bedømmelsen til foreskrevende lege; for eksempel vil et sannsynlig doseområde for oral administrering være ca. 70 til 700 mg pr. dag, mens for intravenøs administrering et sannsynlig doseområde vil være ca. 70 til 700 mg pr. dag avhengig av forbindelse-farmakokinetikk.

**[00101]** Administrering av de kjemiske enheter beskrevet her kan være via hvilken som helst av de aksepterte administreringsmetoder for midler som har lignende anvendelser omfattende, men ikke begrenset til, oralt, sublingvalt, subkuttant, intravenøst, intranasalt, topisk, transdermalt, intraperitonealt, intramuskulært, intrapulmonært, vaginalt, rektalt eller intraokulært. Oral og parenteral administrering er vanlig for behandling av indikasjonene som er gjenstand for foreliggende oppfinnelse.

**[00102]** Farmasøytisk akseptable preparater omfatter faste, halvfaste, flytende og aerosol-doseformer, så som f.eks. tabletter, kapsler, pulvere, væsker, suspensjoner, suppositorier, aerosol-preparater. De kjemiske enhetene kan også administreres i doseformer med forlenget eller kontrollert frigjøring, omfattende depot- injeksjoner, osmotiske pumper, piller, transdermale (omfattende elektrotransport) plasteryer for forlenget og/eller regulert, pulset administrering med en forutbestemt hastighet. I visse utførelsesformer er preparatene gitt i enhetsdoseformer egnet for enkel administrering av en nøyaktig dose.

**[00103]** De kjemiske enheter beskrevet her kan administreres enten alene eller mer typisk i kombinasjon med en konvensjonell farmasøytiske bærer, (f.eks. mannitol, laktose, stivelse, magnesiumstearat, natrium sakkarin, talk, cellulose, natrium crosscarmellose, glukose, gelatin, sukrose, magnesiumkarbonat). Om ønsket kan det farmasøytiske preparatet også inneholde mindre mengder av ikke toksiske hjelpe-substanser så som fuktmidler, emulgeringsmidler, solubiliseringmidler, pH buffermidler (f.eks. natriumacetat,

natriumcitrat, cyklodekstrin-derivater, sorbitan-monolaurat, trietanolamin-acetat, trietanolamin-oleat). Avhengig av den tilsiktede administreringsmetode, vil det farmasøytiske preparatet generelt inneholde ca. 0,005% til 95%; i visse utførelsesformer, ca. 0,5% til 50 vekt% av en kjemisk enhet. Aktuelle metoder for fremstilling av slike doseformer er kjente eller vil være klare for fagfolk på dette området; se for eksempel *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania.

**[00104]** I tillegg kan de kjemiske enheter beskrevet her samadministreres med, og de farmasøytiske preparater kan omfatte, andre medisinske midler, farmasøytiske midler, adjuvantia. Egnede ytterligere aktive midler omfatter for eksempel: terapier som sinker progresjonen av hjertesvikt ved nedregulering av neurohormonell stimulering av hjertet og forsøk på å forhindre hjerte-remodellering (f.eks. ACE-inhibitorer eller  $\beta$ -blokkere); terapier som forbedrer hjertefunksjon ved å stimulere hjerte-kontraktilitet (f.eks. positive inotrope midler, så som  $\beta$ -adrenerg agonist dobutamin eller fosfodiesterase-inhibitoren milrinon); og terapier som reduserer hjerte-forhåndsbelastning ("preload") (f.eks. diuretika, så som furosemid). Andre ytterligere egnede aktive midler omfatter vasodilatorer, digitoxin, antikoaguleringsmidler, mineralokortikoid-antagonister, angiotensin-reseptor-blokkere, nitroglycerin, andre inotroper og hvilken som helst annen terapi anvendt ved behandling av hjertesvikt.

**[00105]** I visse utførelsesformer er preparatene i form av en pille eller tablett og preparatet vil således inneholde, sammen med den aktive bestanddel, et fortynningsmiddel så som laktose, sukrose, dikalsiumfosfat eller lignende; et glattemiddel så som magnesiumstearat eller lignende; og et bindemiddel så som stivelse, gummi akasie, polyvinylpyrrolidin, gelatin, cellulose, cellulosederivater. I en annen fast doseform er et pulver, "marume", løsning eller suspensjon (f.eks. i propylenkarbonat, vegetabiliske oljer eller triglycider) innkapslet i en gelatinkapsel.

**[00106]** Flytende farmasøytisk administrerbare preparater kan for eksempel fremstilles ved oppløsning, dispergering, etc. av minst én kjemisk enhet og eventuelle farmasøytiske adjuvantia i en bærer (f.eks. vann, saltløsning, vandig dekstrose, glycerol, glykoler, etanol eller lignende) for å danne en løsning eller suspensjon. Injiserbare preparater kan fremstilles i konvensjonelle former, enten som flytende løsninger eller suspensjoner, som emulsjoner eller i faste former egnet for oppløsning eller suspensjon i væske før injeksjon. Prosentdelen av kjemiske enheter inneholdt i slike parenterale preparater er meget avhengig av den spesifikke natur derav, så vel som aktiviteten til de kjemiske enheter og behovene til

individuet. Imidlertid er prosentdelene av aktiv bestanddel på 0,01% til 10% i løsning anvendbare og vil være høyere hvis preparatet er et fast stoff som deretter skal fortynnes til prosentdelene ovenfor. I visse utførelsesformer vil preparatet omfatte 0,2-2% av det aktive midlet i løsning.

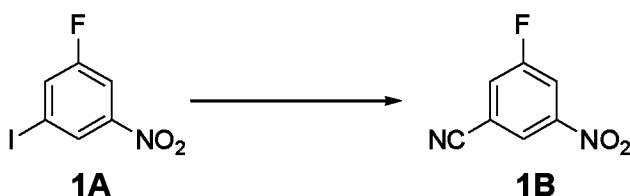
**[00107]** Farmasøytiske preparater av de kjemiske enheter beskrevet her kan også administreres til luftveiene som en aerosol eller løsning for en forstøver eller som et mikrofint pulver for insufflasjon, alene eller i kombinasjon med en inert bærer så som laktose. I et slikt tilfelle har partiklene av det farmasøytiske preparatet diametere på mindre enn 50 mikron, i visse utførelsesformer mindre enn 10 mikron.

**[00108]** Generelt, for å anvende de kjemiske enheter beskrevet her ved en metode for screening for myosin-binding, blir myosin bundet til en bærer og en forbindelse ifølge oppfinnelsen satt til forsøket. Alternativt kan de kjemiske enheter beskrevet her være bundet til bæreren og myosin tilsatt. Klasser av forbindelser blant hvilke nye bindemidler kan søkes omfatter spesifikke antistoffer, ikke-naturlige bindemidler identifisert ved screening av kjemiske biblioteker, peptidanaloger, etc. Av spesiell interesse er screeningsforsøk for kandidat-midler som har lav toksisitet for humane celler. En rekke forsøk kan anvendes for dette formål, omfattende merket in vitro protein-protein bindingsforsøk, elektroforetisk mobilitet skift-forsøk, immunoanalyser for protein-binding, funksjonelle forsøk (fosforyleringsforsøk, etc.). Se f.eks. U.S. Patent nr. 6,495,337.

**[00109]** De følgende eksempler tjener til mer fullstendig å beskrive metoden for anvendelse av den ovenfor beskrevne oppfinnelse. Det vil forstås at disse eksempler på ingen måte tjener til å begrense omfanget av foreliggende oppfinnelse.

**[00110]**

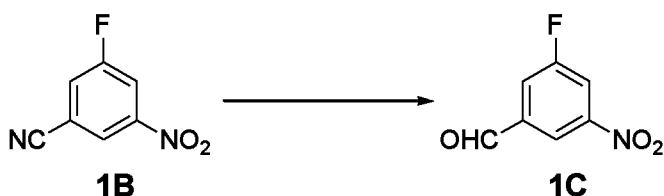
#### Eksempel 1 Trinn 1



**[00111]** Til en løsning av 1,0 ekv **1A** i tørr DMF (0,37 M) ble satt Zn(CN)<sub>2</sub> (0,92 ekv) og Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0,058 ekv). Reaksjonsblandingen ble spylt med nitrogen og oppvarmet til 80°C natten over. Ytterligere 0,023 ekv av Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> ble deretter tilsatt og reaksjonsblandingen ble oppvarmet i ytterligere 6 timer. Reaksjonsblandingen ble deretter

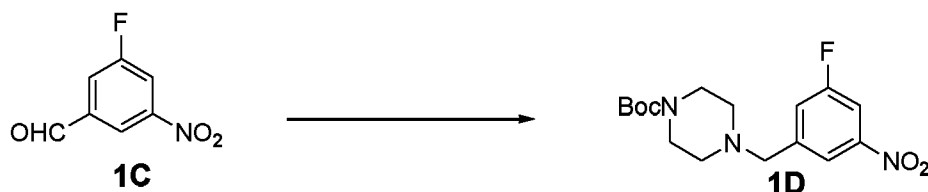
avkjølt til romtemperatur, fortynnet med 15 volumer EtOAc (basert på **1A**) og det organiske laget ble vasket 3 ganger med vann og én gang med saltvann. Det organiske laget ble tørket over natriumsulfat, filtrert og konsentrert. Rensning ved kromatografi over silikagel ved anvendelse av 10% Et<sub>2</sub>O/heksan som elueringsmiddel ga **1B** som et fast stoff (90%).

### Eksempel 1 Trinn 2



[00112] Til en løsning av 1,0 ekv **1B** i tørr Et<sub>2</sub>O (0,06 M) ved 0°C ble satt dråpevis en løsning av diisobutyllitiumaluminium-hydrid (1,1 ekv, 1,0 M i heksaner) med sprøyte. Den resulterende løsningen ble holdt ved 0°C natten over. Reaksjonsblandingen ble satt til en blanding av is og iseddik. Reaksjonsblandingen ble deretter fortynnet med etylacetat og det vandige laget ble ekstrahert med etylacetat to ytterligere ganger. De samlede organiske lag ble vasket to ganger med mettet natriumbikarbonat og én gang med saltvann. De organiske lag ble deretter tørket over natriumsulfat, filtrert og konsentrert i vakuum. Rensning over silikagel ved anvendelse av 10% EtOAc/heksaner som elueringsmiddel ga et gult, fast stoff (100%) som en 80:20 blanding av **1C:1B**.

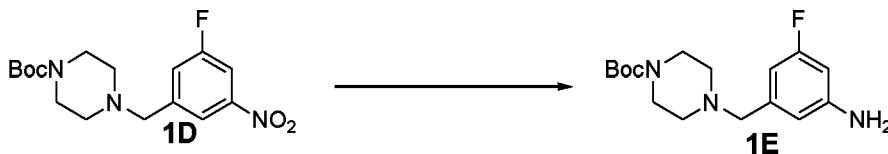
### Eksempel 1 Trinn 3



[00113] Til en avkjølt (0°C) oppslemning av en 80:20 blanding av **1C:1B** (1,0 ekv) og boc-piperazin (ca. 2 ekv) i en blanding av HOAc og DCM (4,8 M boc-piperazin i 1:1,4 volum/volum HOAc/DCM) ble satt natrium-triacetoksyborhydrid som fast stoff over ca. 5 minutter. Reaksjonsblandingen fikk oppvarmes til romtemperatur og ble omrørt i to timer. Reaksjonsblandingen ble behandlet med mettet natriumbikarbonat og fortynnet med etylacetat. Lagene ble separert og det vandige laget ble vasket tre ganger med etylacetat. De organiske lag ble samlet og vasket med saltvann, tørket over natriumsulfat og konsentrert i

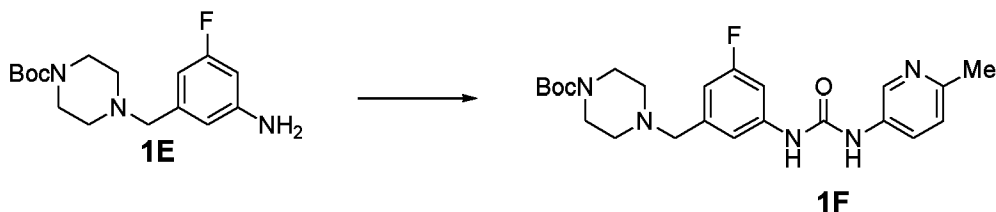
vakuum. Rensning ved kromatografi over silikagel ved anvendelse av 50% etylacetat/heksaner som elueringsmiddel ga **1D** (67,7%) som en gul olje.

#### Eksempel 1 Trinn 4



[00114] En blanding av 1,0 ekv av **1D** og en katalytisk mengde av 10% Pd/C (omtrent 10 vekt/vekt %) i MeOH (ca. 0,6 M **1D** i MeOH) ble omrørt over en atmosfære av 3,5 kg/cm<sup>2</sup> H<sub>2</sub> i 45 min. Etter erstatning av H<sub>2</sub>-atmosfære med N<sub>2</sub>, ble reaksjonsblandingen filtrert gjennom diatoméjord og diatoméjorden vasket med MeOH. Konsentrasjon av MeOH resulterte i isolering av **1E**.

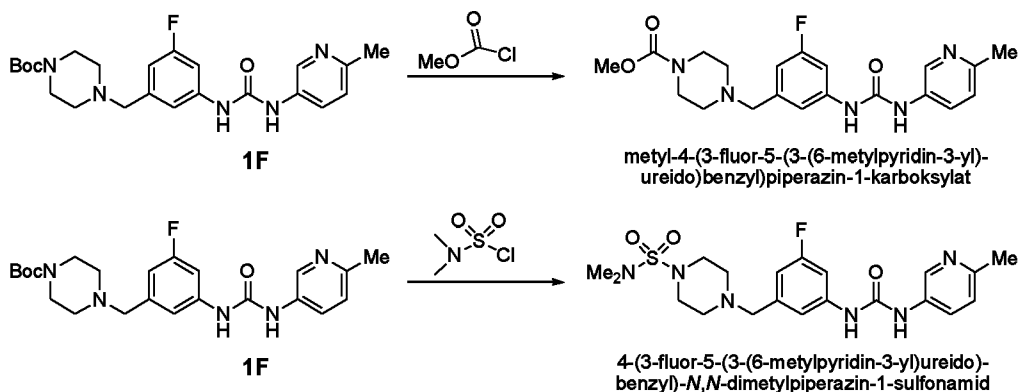
#### Eksempel 1 Trinn 5



[00115] Til en løsning av anilin **1E** (1,0 ekv) i tørr DCM (ca. 0,1 M **1E** i DCM) ved romtemperatur under N<sub>2</sub>-atmosfære ble satt 2-metyl-5-isocyanatopyridin (lite overskudd, ca. 1,2 ekv) med sprøyte. Blandingen ble omrørt i 1 time. Til reaksjonsblandingen ble satt sekvensielt mettet vandig natriumbikarbonat og etylacetat. Lagene ble separert og det organiske laget ble vasket to ganger med mettet NaHCO<sub>3</sub> og én gang med saltvann. Det organiske laget ble tørket over natriumsulfat, filtrert og konsentrert i vakuum. Rensning ved kromatografi over silikagel ved anvendelse av 5% metanol/DCM som elueringsmiddel ga **1F**.

#### Eksempel 1 Trinn 6 og 7

39



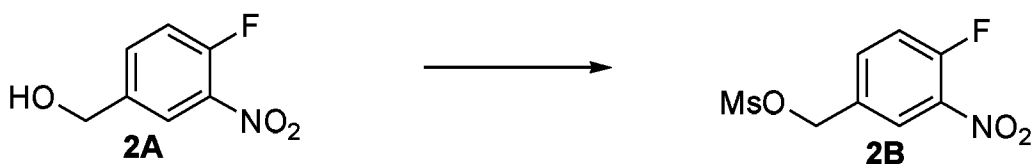
**[00116]** Til en løsning av 1,0 ekv av **1F** i  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (ca. 0,14 M **1F** i DCM) ble satt omtrent 200 ekv av trifluoreddiksyre (TFA). Reaksjonsblandingen ble omrørt i 30 min og konsentrert. Det resulterende residuet ble oppløst i EtOAc (ca. 1,6 ganger volumet av reaksjonsblandingen) og vasket sekvensielt med 3N NaOH (2 ganger) og saltvann. Det organiske laget ble tørket ( $\text{NaSO}_4$ ) og konsentrert for å gi den ønskede frie base som ble anvendt uten ytterligere rensning.

**[00117]** Til en løsning av den frie basen ovenfor (1,0 ekv) og DIPEA (1,2 ekv) i tørr THF (ca. 0,2 M fri base i THF) ble satt metylklorformiat (1,1 ekv) med sprøyte og den resulterende blandingen ble omrørt i 1 time. Til blandingen ble satt vandig natriumbikarbonat fulgt av etylacetat. Det organiske laget ble separert og vasket to ganger med vandig natriumbikarbonat og én gang med saltvann. De samlede vandige lag ble ekstrahert én gang med etylacetat. De samlede organiske lag ble tørket over natriumsulfat, filtrert og konsentrert i vakuum. Rensning ved kromatografi over silikagel ved anvendelse av 5% MeOH/DCM som elueringsmiddel ga metyl-4-(3-fluor-5-(3-(6-metylpyridin-3-yl)ureido)benzyl)-piperazin-1-karboksylat. MS 402 (M+H).

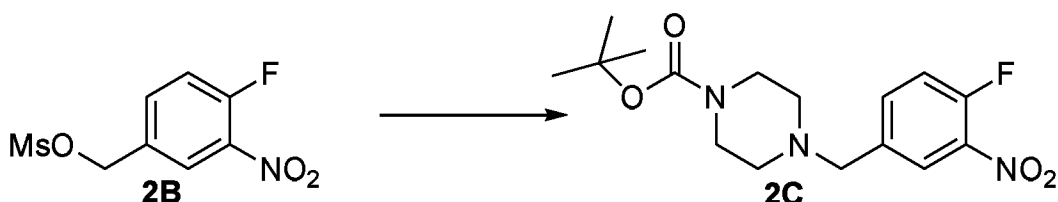
**[00118]** Til en løsning av den frie basen ovenfor (1,0 ekv) og DIPEA (1,2 ekv) i tørr THF (ca. 0,2 M fri base i THF) ble satt dimetylsulfamoylchlorid (1,1 ekv) med sprøyte. Etter noen få timer var reaksjonen fullstendig. Blandingene ble behandlet med vandig natriumbikarbonat, fortynnet med etylacetat og vasket to ganger med bikarb og én gang med saltvann. De samlede vandige lag ble ekstrahert én gang med etylacetat og de samlede organiske lag ble tørket over natriumsulfat, filtrert og konsentrert i vakuum. Rensning ved kromatografi over silikagel ved anvendelse av 5% MeOH/DCM som elueringsmiddel ga 4-(3-fluor-5-(3-(6-metylpyridin-3-yl)ureido)benzyl)-N,N-dimetyl-piperazin-1-sulfonamid. MS 451 (M+H).



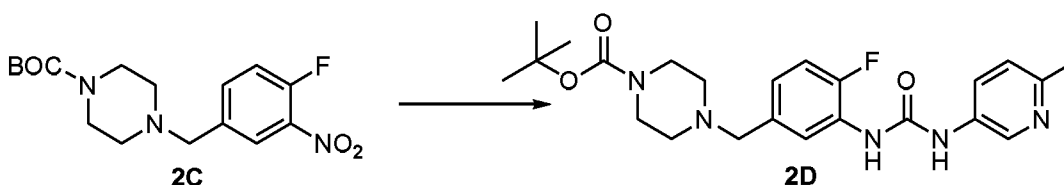
40

**Eksempel 2 Trinn 1**

[00119] Til 1,0 ekv av (4-fluor-3-nitro-fenyl)-metanol (**2A**) i THF (ca. 1 M **2A** i THF) og (ca. 1,1 ekv) av pyridin ble satt omtrent 1,1 ekv av metansulfonylchlorid. Blandingen ble omrørt natten over ved romtemperatur og deretter konsentrert. Residuet ble rensset ved anvendelse av "flash" kromatografi over silika med 10%-50% EtOAc/heksaner som elueringsmiddel, hvilket ga metansulfonsyre-4-fluor-3-nitro-benzylester (**2B**) (57%).

**Eksempel 2 Trinn 2**

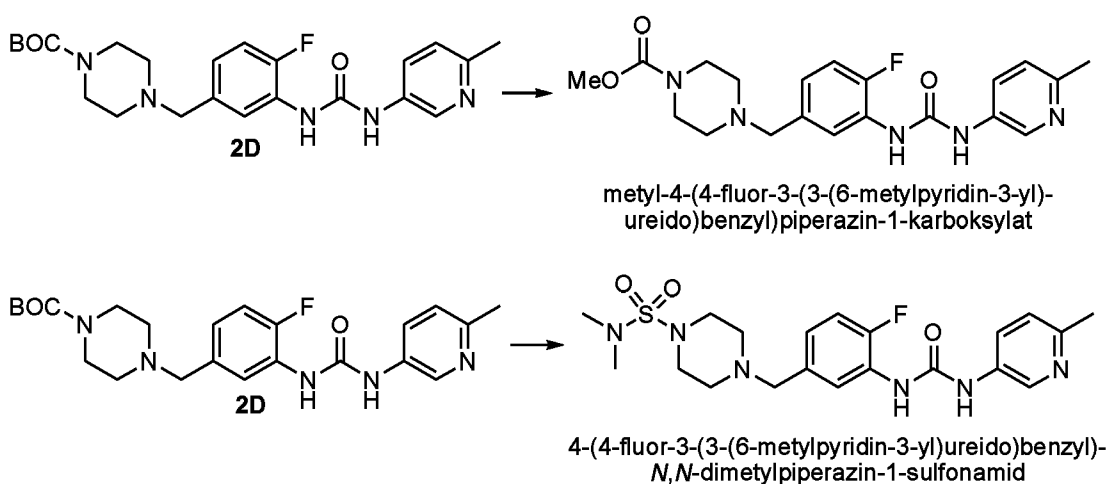
[00120] Til 1,0 ekv av metansulfonsyre-4-fluor-3-nitro-benzylester (**2B**) i DMF (ca. 0,6 M **2B** i DMF) ble satt ca. 1,05 ekv av TEA og ca. 1,0 ekv av *t*-butyl-piperazin-1-karboksyilat. Blandingen ble omrørt i 30 min ved romtemperatur, fortynnet med EtOAc, vasket med NH<sub>4</sub>Cl-løsning, tørket (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) og inndampet. Rensning ved "flash" kromatografi over silika med 50% EtOAc/heksaner som elueringsmiddel ga 4-(4-fluor-3-nitro-benzyl)-piperazin-1-karboksylysyre-tert-butylester (**2C**).

**Eksempel 2 Trinn 3**

[00121] 4-(4-fluor-3-nitro-benzyl)-piperazin-1-karboksylysyre-*tert*-butylester (**2C**, 1,0 ekv) i metanol (ca. 0,2 M **2C** i MeOH) ble behandlet med katalytisk Pd(OH)<sub>2</sub>/C under hydrogen ved 4,2 kg/cm<sup>2</sup> natten over. Blandingen ble filtrert gjennom diatoméjord og

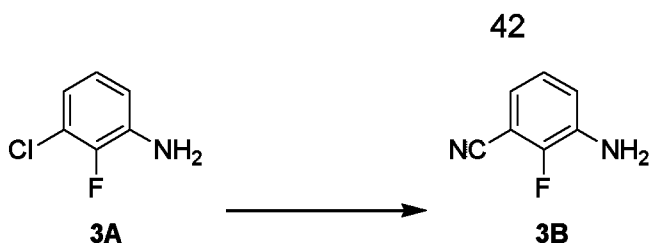
konsentrert til en olje. Denne oljen ble oppløst i THF og behandlet med omtrent 1,05 ekv av 6-metylpyridin-3-isocyanat. Etter omrøring ved 50°C i 30 min ble blandingen konsentrert. Residuet ble renset ved reversert fase HPLC, hvilket ga 4-{4-fluor-3-[3-(6-metyl-pyridin-3-yl)-ureido]-benzyl}-piperazin-1-karboksylysyre-tert-butylester (**2D**).

### Eksempel 2, Trinn 4 og 5



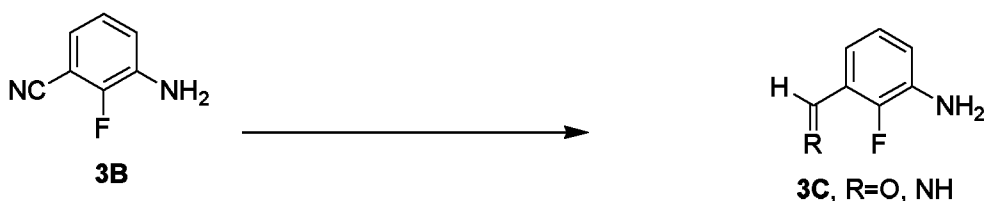
[00122] Til 1,0 ekv av 4-{4-fluor-3-[3-(6-metyl-pyridin-3-yl)-ureido]-benzyl}-piperazin-1-karboksylysyre-*tert*-butylester (**2D**) i MeOH (ca. 0,1 M **2D** i MeOH) ble satt 2 volumer av HCl i dioksan (4 N) og reaksjonsblandingen ble omrørt ved 50°C i 15 min og inndampet til et fast stoff. Det faste stoffet ble kombinert med DCM og behandlet med omtrent 5 ekv av TEA og delt i 3 like porsjoner av reaksjonsblanding A. Én porsjon av reaksjonsblanding A ble behandlet med 1,2 ekv av metyl-karbonylklorid og omrørt natten over. Den resulterende blandingen ble konsentrert og renset ved reversert fase HPLC, hvilket ga 4-{4-fluor-3-[3-(6-metyl-pyridin-3-yl)-ureido]-benzyl}-piperazin-1-karboksylysyre-metylester. MS 402 (M+H). En andre porsjon av reaksjonsblanding A ble behandlet med 1,2 ekv av dimetylsulfamoylklorid og omrørt natten over. Den resulterende blandingen ble konsentrert og renset ved reversert fase HPLC, hvilket ga 4-{4-fluor-3-[3-(6-metyl-pyridin-3-yl)-ureido]-benzyl}-piperazin-1-sulfonsyre-dimetylamid. MS 451 (M+H).

### Eksempel 3 Trinn 1



[00123] En rundbunnet kolbe ble fylt med 1 ekv av 3-klor-2-fluoranilin (**3A**), 1-metyl-2-pyrrolidinon (ca. 1,5 M **3A** i NMP), 2,2 ekv av natriumcyanid og 1,35 ekv av nikkel(II)-bromid ved romtemperatur under N<sub>2</sub>. Konsentrasjonen ble halvert ved innføring av ytterligere NMP under N<sub>2</sub> og løsningen ble forsiktig oppvarmet til 200± 5°C og omrørt i 4 dager under N<sub>2</sub>. Reaksjonsblandingen fikk avkjøles til romtemperatur. Reaksjonsblandingen ble fortynnet med 30 volumer av *tert*-butyl-metyleter (MTBE) og filtrert gjennom celite. Celite-sjiktet ble deretter skyllet med 10 volumer av MTBE. De organiske faser ble vasket med 40 volumer av saltvann, 2 x 40 volumer av vann og 40 volumer av saltvann. De samlede organiske lag ble tørket over natriumsulfat og konsentrert, hvilket ga et brunt, fast stoff som ble tørket under vakuum (~30 i Hg) ved 40°C i 8 timer, hvilket ga forbindelsen med formel **3B** (71% utbytte).

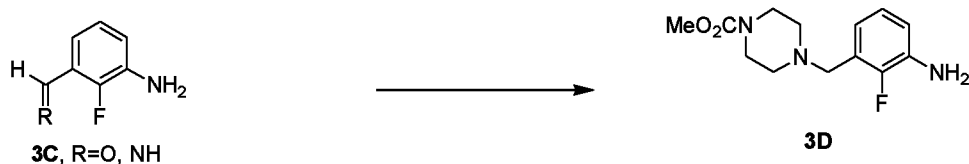
### Eksempel 3 Trinn 2



[00124] En løsning av **3B** i diklormetan (ca. 1,5 M **3B** i DCM) ved romtemperatur under nitrogen-blanding ble avkjølt til ~0°C og 2,0 ekv av 1M diisobutyl-litiumaluminiumhydrid (DIBALH) i DCM ble tilsatt dråpevis over ~3,5 timer, mens en indre reaksjonstemperatur ≤ 0°C ble opprettholdt. Etter fullføring av DiBALH-tilsetningen ble reaksjonsblandingen satt dråpevis med kraftig omrøring til en avkjølt løsning (~0°C) av 40 volumer av 15% Rochelle-salt og 10 volumer av DCM, mens en indre reaksjonstemperatur under 10°C ble opprettholdt. Kolben ble skyllet med 10 volumer av DCM og blandingen fikk oppvarmes til romtemperatur og ble omrørt i 4 timer. Lagene ble separert og det vandige laget ble tilbakeekstrahert med 20 volumer av DCM. De samlede organiske lag ble vasket med 20 volumer vann. Det organiske laget ble tørket over natriumsulfat og konsentrert,

hvilket ga et brunt skum, som ble tørket under vakuum (~30 i Hg) ved romtemperatur, hvilket ga **3C** (92% utbytte).

### Eksempel 3 Trinn 3



#### Trinn 3A/B:

[00125] En løsning av 1 ekv av **3C**, tetrahydrofuran (ca. 1,4 M **3C** i THF) og 1,05 ekv av metyl piperazin-1-karboksylat ble omrørt ved omgivelsestemperatur i 3 timer. Til reaksjonsblandingen ble satt 1,5 ekv av natrium-triacetoksyborhydrid porsjonsvis over ~40 min, mens en indre reaksjonstemperatur under 45°C ble opprettholdt. Reaksjonsblandingen ble omrørt natten over ved romtemperatur. Til reaksjonsblandingen ble satt 5 volumer vann dråpevis over 1 time, mens en indre reaksjonstemperatur under 30°C ble opprettholdt. Etylacetat (EtOAc, 5 volumer) ble deretter tilsatt og lagene ble separert. Det vandige laget ble tilbakeekstrahert med 5 volumer EtOAc. De samlede organiske lag ble vasket med mettet natriumbikarbonat og fast natriumbikarbonat ble tilsatt etter behov for å bringe pH til 8 (pHydrion papir). Lagene ble separert og det organiske laget ble vasket med 5 volumer saltvann. Det organiske laget ble tørket over natriumsulfat og aktivert karbon ble tilsatt i tørketrinnet. De organiske faser ble filtrert gjennom celite og celite-sjiktet ble skyllet 4 ganger med EtOAc. De organiske faser ble konsentrert og tørket natten over på rotavap (~30 i Hg ved romtemperatur), hvilket ga en ravgul-brun olje.

#### Trinn 3C:

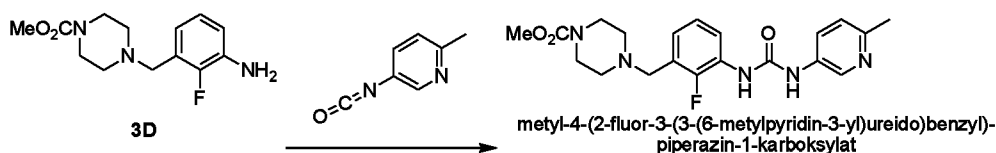
[00126] Alle beregninger er basert på mengden av **3C** (R= O).

[00127] Til 3 volumer av metanol (basert på **3C**, R=O) under N<sub>2</sub> over et is/saltvann/acetone-bad ble satt 3 ekv av acetylklorid dråpevis over 3 timer, mens en indre reaksjonstemperatur under 0°C ble opprettholdt. Løsningen ble deretter omrørt i ytterligere 1 time under 0°C. En løsning av 1,0 ekv av urensset **3D** (fra Trinn 3A/3B ovenfor) i MeOH (ca. 3,6 M basert på **3C**, R=O) ble tilsatt dråpevis over 30 min, mens en indre reaksjonstemperatur under 15°C ble opprettholdt. Reaksjonen fikk oppvarmes til romtemperatur natten over. De

faste stoffene ble filtrert neste dag og skyllet med 2x 0,5 volum av MeOH, 5 volumer av 1:1 *tert*-butyl-metyleter (MTBE):MeOH og 5 volumer av MTBE.

[00128] De faste stoffene ble deretter tatt opp i 5 volumer av EtOAc og mettet natriumbikarbonat og fast natriumbikarbonat ble tilsatt etter behov for å bringe pH i det vandige laget til 8 (pHydrion-papir). Lagene ble separert og det vandige laget ble ekstrahert med 5 volumer av EtOAc. De samlede organiske lag ble vasket med 5 volumer saltvann, tørket over natriumsulfat og konsentrert, hvilket ga et blekt oransje fast stoff som ble tørket under vakuu ( $\sim 30$  i Hg) ved  $\sim 40^\circ\text{C}$ , hvilket ga **3D** (50% utbytte).

### Eksempel 3 Trinn 4



[00129] Til en løsning av **3D** i aceton (ca. 2,7 M **3D** i aceton) ble satt 1,0 ekv av 5-isocyanato-2-metyl-pyridin dråpevis over 9 min. Et voluminøst presipitat ble dannet under tilsetningen og reaksjonsblandingen ble omrørt i én time. Reaksjonsblandingen ble oppvarmet til tilbakeløp i 2 timer og avkjølt til romtemperatur i 2,5 timer. Reaksjonen ble deretter oppvarmet til tilbakeløp i 1 time og avkjølt til romtemperatur natten over.

Reaksjonsblandingen ble filtrert og skyllet med 1 volum aceton, deretter tre ganger med 2 volumer etylacetat. De faste stoffene ble tørket under vakuu ( $\sim 30$  i Hg) ved  $60^\circ\text{C}$  natten over, hvilket ga et hvitt pulver (86% utbytte) av metyl-4-(2-fluor-3-(3-(6-metylpyridin-3-yl)ureido)benzyl)piperazin-1-karboksylat. Materialet ble gjenopparbeidet som følger:

[00130] Metyl-4-(2-fluor-3-(3-(6-metylpyridin-3-yl)ureido)benzyl)piperazin-1-karboksylatet ovenfor ble oppløst i aceton (ca. 0,2 M) under  $\text{N}_2$ . Reaksjonen ble deretter oppvarmet til tilbakeløp i 2,5 timer og avkjølt til romtemperatur natten over.

Reaksjonsblandingen ble filtrert og skyllet med 1 volum aceton, deretter tre ganger med 2 volumer etylacetat. De faste stoffene ble tørket under vakuu ( $\sim 30$  i Hg) ved  $60^\circ\text{C}$  natten over, hvilket ga metyl-4-(2-fluor-3-(3-(6-metylpyridin-3-yl)ureido)benzyl)piperazin-1-karboksylat som et hvitt pulver (79% utbytte). Materialet ble gjenopparbeidet som følger:

[00131] Metyl-4-(2-fluor-3-(3-(6-metylpyridin-3-yl)ureido)benzyl)piperazin-1-karboksylatet ovenfor ble oppløst i aceton (ca. 0,2 M) under  $\text{N}_2$ . Reaksjonen ble deretter

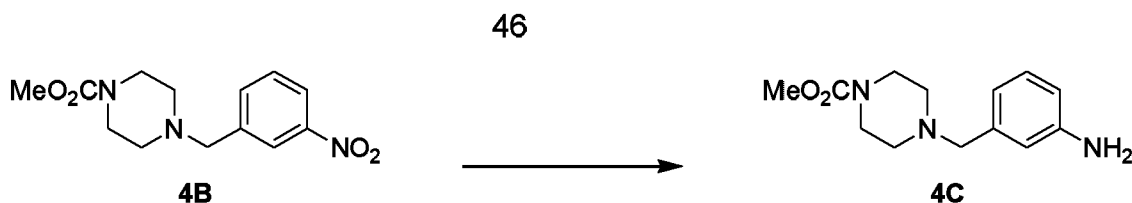
oppvarmet til tilbakeløp og avkjølt til romtemperatur natten over. Reaksjonsblandingen ble filtrert og skyllet med 1 volum aceton, deretter tre ganger til med 2 volumer etylacetat. De faste stoffene ble tørket under vakuum ( $\sim 30$  i Hg) ved  $60^\circ\text{C}$  natten over, hvilket ga metyl-4-(2-fluor-3-(3-(6-metylpyridin-3-yl)ureido)benzyl)piperazin-1-karboksylat som et hvitt pulver (73% utbytte). MS 402 (M+H).

#### Eksempel 4 Trinn 1



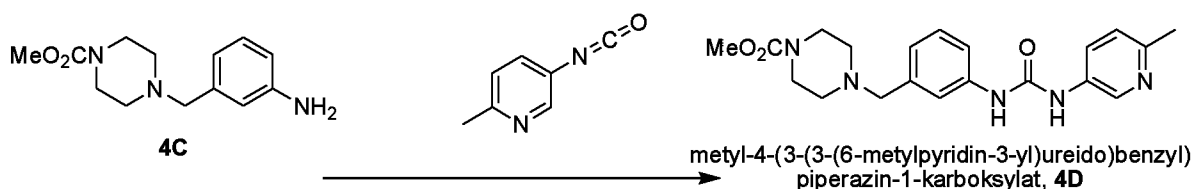
[00132] En 3-halset rundbunnet kolbe ble spylt med nitrogen i minst ti minutter. Kolben ble fylt med 1,0 ekv av **4A**,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (ca. 1,2 M **4A** i DCM) og ca. 1,1 ekv av DIPEA. Kolben ble deretter avkjølt til  $10 \pm 5^\circ\text{C}$ . Mens kolben ble avkjølt, ble 1,2 ekv av metyl-piperazin-1-karboksylat tatt opp i  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (ca. 5,3 M). Materialet ble ikke oppløst, så ytterligere 0,05 ekv av DIPEA i DCM (ca. 0,3 M) ble tilsatt. Materialet ble ikke oppløst og suspensjonen ble deretter tilsatt dråpevis over 50 min, mens en indre reaksjonstemperatur  $\leq 30^\circ\text{C}$  ble opprettholdt. Kjølebadet ble fjernet og reaksjonsblandingen ble oppvarmet til tilbakeløp. Reaksjonsblandingen ble holdt ved tilbakeløp i 19 timer. Ytterligere 0,05 ekv av metyl-piperazin-1-karboksylat ble tilsatt og reaksjonsblandingen ble tilbakeløpskokt i ytterligere 2,5 timer. Reaksjonsblandingen ble avkjølt til romtemperatur og vasket med 5 volumer vann. Vannlaget ble tilbake-ekstrahert med 5 volumer  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . De samlede organiske lag ble vasket med 5 volumer av 10% AcOH/vann. Det organiske laget ble deretter vasket med 5 volumer mett natriumbikarbonat og 5 volumer saltvann. Det organiske laget ble tørket over natriumsulfat, filtrert og konsentrert *via* rotavap ved  $30 \pm 5^\circ\text{C}$  til et residuum. MTBE ble satt til rotavap-kolben ved  $20 \pm 5^\circ\text{C}$  og kolben ble rotert inntil en løsning var oppnådd. Heksan ble satt til kolben og løsningen ble omrørt i 2,5 timer ved  $20 \pm 5^\circ\text{C}$ . De faste stoffene ble filtrert og skyllet med heksaner. De faste stoffene ble tørket ved  $\leq 40^\circ\text{C}$  under maksimum vakuum inntil konstant masse ble oppnådd ( $\sim 22$  timer), hvilket ga **4B** som et blekgult, fast stoff (66% utbytte).

#### Eksempel 4 Trinn 2



[00133] En høytrykk-reaktor ble fylt med en oppslemning av 25 vekt % av Pt/C i forhold til **4B** i 8 volumer av THF (i forhold til Pt/C) fulgt av en oppslemning av 1,5 ekv  $K_2CO_3$ , i THF (ca. 0,67 M), deretter en løsning av 1,0 ekv av **4B** i THF (ca. 0,47 M). Reaktormantelen ble satt til  $10^\circ C$  og reaktoren ble fylt med  $3,5 \text{ kg/cm}^2$   $H_2$  mens en indre reaksjonstemperatur  $\leq 30^\circ C$  ble opprettholdt. Reaksjonsblandingen ble omrørt i 9 timer, 45 min deretter omrørt i ytterligere 3,5 timer. Reaksjonsblandingen ble filtrert. Reaksjonskolben og og filtre ble skyllet med 9 volumer MeOH (i forhold til **4B**) og konsentrert *via* rotavap ved  $\leq 50^\circ C$ . Residuet ble oppløst i 4 volumer EtOAc og vasket med 4 volumer vann. Vannlaget ble tilbake-ekstrahert med 4 volumer EtOAc. De samlede organiske lag ble vasket med 4 volumer saltvann, tørket over natriumsulfat, filtrert og konsentrert *via* rotavap ved  $\leq 50^\circ C$ , hvilket ga et residuum. Da løsningsmidlet hadde sluttet å komme fra rotasjonsinndampeen, ble residuet fylt med 2 volumer MTBE og løsningen ble konsentrert *via* rotavap ved  $\leq 50^\circ C$ , hvilket ga et residuum. Da løsningsmidlet hadde sluttet å komme fra rotasjonsinndamperen ble materialet holdt på rotasjonsinndamperen under maksimum vakuu i 15 timer. MTBE (2 volumer) ble deretter tilsatt for å utgni materialet og kolben rotert i 2 timer. De faste stoffene ble filtrert og skyllet med 0,5 volum av MTBE. De faste stoffene ble tørket ved  $\leq 50^\circ C$  under maksimum vakuu inntil konstant masse ble oppnådd (~22 timer), hvilket ga **4C** som et blekgult, fast stoff (87% utbytte).

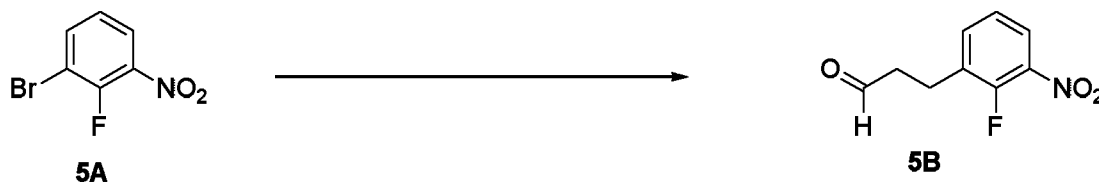
#### Eksempel 4 Trinn 3



[00134] En 3-halset rundbunnet kolbe ble spylt med nitrogen i minst ti minutter. Kolben ble deretter fylt med 1,0 ekv **4C** i aceton (ca. 0,56 M). Kolben ble oppvarmet ved  $27^\circ C$  for å danne en løsning. Ca. 1 ekv 5-isocyanato-2-pyridin ble tilsatt dråpevis over 68 min, med kontroll av tilsetningshastigheten for å holde den indre temperatur  $\leq 45^\circ C$ . Etter tilsetningen ble reaksjonsblandingen holdt  $\leq 45^\circ C$  i omtrent 5 timer. Reaksjonen ble deretter

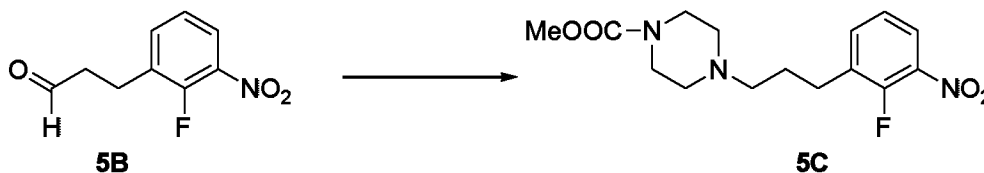
oppvarmet til svakt tilbakeløp i 35 min og deretter avkjølt tilbake til romtemperatur natten over (15 timer). De faste stoffene ble filtrert og skyllet med 0,45 volum av aceton og 1,7 volumer av EtOAc. De faste stoffene ble tørket i en vakuumovn  $\leq 50^{\circ}\text{C}$ , hvilket ga 4D, metyl-4-(3-(3-(6-metylpyridin-3-yl)ureido)benzyl)piperazin-1-karboksylat (89% utbytte). MS 384 (M+H).

### Eksempel 5 Trinn 1



[00135] Til en blanding av 1,0 ekv 2-fluor-3-brom-nitrobenzen (**5A**), 1,0 ekv tetrabutylammoniumklorid, 1,5 ekv  $\text{NaHCO}_3$  og 2,0 ekv allylalkohol i DMF (ca. 1M allylalkohol i DMF) under  $\text{N}_2$ -atmosfære ble satt 0,4 ekv  $\text{PdCl}_2$ . Reaksjonsblandingen ble oppvarmet til  $60^{\circ}\text{C}$  og omrørt under  $\text{N}_2$  i 16 timer. Temperaturen ble hevet til  $70^{\circ}\text{C}$  og reaksjonsblandingen ble omrørt ytterligere 4 timer. Ytterligere aliquoter av 1 ekv allylalkohol og 0,1 ekv  $\text{PdCl}_2$  ble tilsatt og reaksjonsblandingen ble omrørt under  $\text{N}_2$  i 6 timer. Reaksjonsblandingen ble avkjølt til romtemperatur og fortynnet med EtOAc. Blandingen ble vasket sekvensielt med vann, 1N HCl og saltvann. Det organiske laget ble tørket og konsentrert til et residuum. Rensning over silikagel ved anvendelse av 10%EtOAc/heksan til 60% EtOAc/heksan som gradient elueringsmiddel ga **5B**.

### Eksempel 5 Trinn 2



[00136] Til en løsning av 1,0 ekv **5B** i  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (ca. 0,04 M) under  $\text{N}_2$ -atmosfære ble satt 1,3 ekv metyl-piperazin-1-karboksylat-HCl-salt fulgt av 1,2 ekv natrium-triacetoksyborhydrid. Reaksjonsblandingen ble omrørt ved romtemperatur natten over. Ytterligere 0,5 ekv av metyl-piperazin-1-karboksylat-HCl-salt fulgt av 2 ekv av natrium-triacetoksyborhydrid ble satt til reaksjonsblandingen og blandingen ble omrørt ved romtemperatur i 4 timer. Reaksjonsblandingen ble fortynnet med  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  og vasket



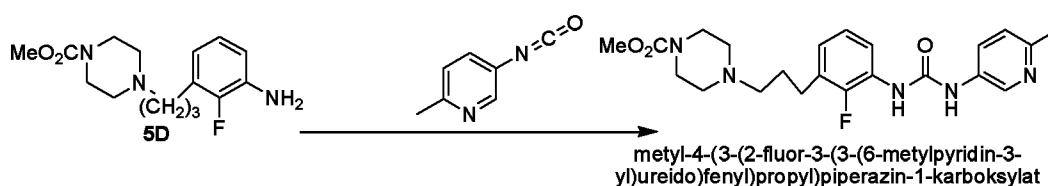
sekvensielt med vann og saltvann. Det organiske laget ble tørket og konsentrert til et residuum. Rensning over silikagel ved anvendelse av 2:1 EtOAc/heksan som elueringsmiddel ga **5C**.

### Eksempel 5 Trinn 3

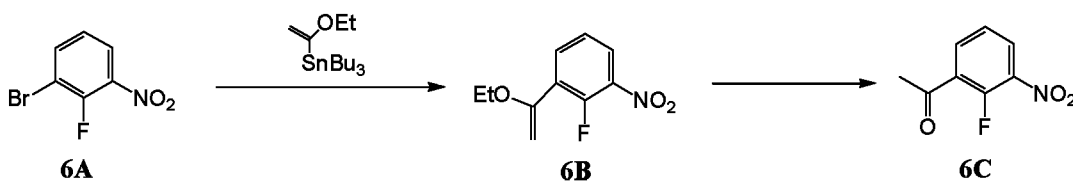


[00137] En blanding av 1 ekv **5C** og 50 vekt ekv av 10% Pd/C i MeOH (0,06 M **5C** i MeOH) ble omrørt over en atmosfære av 2,1 kg/cm<sup>2</sup> H<sub>2</sub> i 2 timer. Etter erstatning av H<sub>2</sub>-atmosfæren med N<sub>2</sub> ble reaksjonsblandingen filtrert gjennom diatoméjord og diatoméjorden vasket med MeOH. Konsentrasjon av MeOH resulterte i isolering av **5D** i nesten kvantitativt utbytte.

### Eksempel 5 Trinn 4

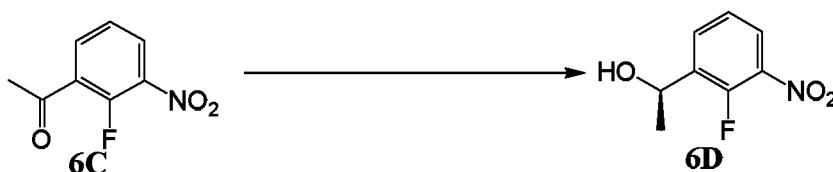


[00138] Til en løsning av 1 ekv **5D** i CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (ca. 0,1 M) under N<sub>2</sub>-atmosfære ved romtemperatur ble satt 1 ekv 5-isocyanato-2-pyridin og den resulterende blandingen ble omrørt ved romtemperatur i 12 timer. Reaksjonsblandingen ble fortynnet med CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> og vasket sekvensielt med vann og saltvann. Det organiske laget ble tørket og konsentrert til et residuum. Rensning ved preparativ revers fase HPLC (C-18 kolonne) ved anvendelse av 10% CH<sub>3</sub>CN/vann til 100% CH<sub>3</sub>CN som gradient elueringsmiddel ga metyl-4-(3-(2-fluor-3-(3-(6-metylpyridin-3-yl)ureido)fenyl)propyl)piperazin-1-karboksylat. MS 430 (M+H).

**Eksempel 6 Trinn 1 og 2**

[00139] PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (0,05 ekv) ble satt til en blanding av 1,0 ekv av **6A**, 1,0 ekv av tributyl(1-etoksyvinyl)-tinn i dioksan (ca. 0,4 M) under N<sub>2</sub>. Blandingen ble oppvarmet ved 95°C i 4 timer under N<sub>2</sub>. En blanding av 1:1 volum/volum EtOAc/ (1M KF) løsning ble satt til reaksjonsblandingen og blandingen ble omrørt i 1 time. Fellingen ble filtrert fra. Det organiske laget ble tørket og konsentrert, hvilket ga **6B** som ble anvendt uten ytterligere rensning.

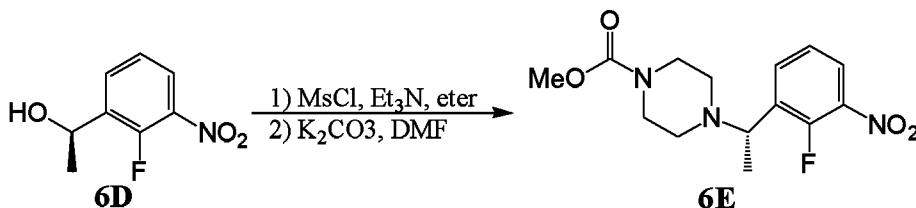
[00140] Til en blanding av **6B** i THF (0,8 M i forhold til **6A**) ble satt ca. 2,3 volumer av 2N HCl og blandingen ble omrørt ved romtemperatur i 1 time. Mettet NaHCO<sub>3</sub> ble satt til reaksjonsblandingen. Reaksjonsblandingen ble konsentrert for å fjerne THF og til den resulterende blandingen ble satt et volum av eter ca. 3 ganger det til volumet av reaksjonsblandingen. Det organiske laget ble tørket og konsentrert til et residuum. Residuet ble rensset over silikagel for å oppnå **6C** (87% i 2 trinn).

**Eksempel 6 Trinn 3**

[00141] Til en blanding av 0,1 til 0,15 ekv av (S)-1-metyl-3,3-difenyl-heksahydropyrrolo[1,2-c][1,3,2]oksazaborol i toluen (1 -1,5 M) og toluen (et volum ca. 10 ganger det til oksazaborol i toluen) under N<sub>2</sub> ved 20°C ble satt 1,05 ekv av Et<sub>2</sub>NPh-BH<sub>3</sub>. Til denne reaksjonsblandingen ble dråpevis satt 1,0 ekv **6C** i toluen (ca. 0,4 M) over 1,5 timer. Reaksjonsblandingen ble deretter omrørt i ytterligere 1 time ved romtemperatur. Til reaksjonsblandingen ble satt ca. 1,9 volumer av MeOH, fulgt av ca. 3,4 volumer av 1N HCl. Blandingen ble omrørt i 20 min. Til reaksjonsblandingen ble satt ca. 7,8 volumer av eter og

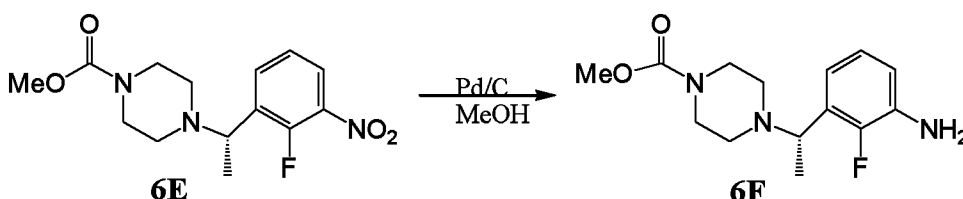
ca. 7,8 volumer avsaltvann. Det organiske laget ble separert, tørket og konsentrert til et residuum. Residuet ble renset ved kromatografi over silikagel, hvilket ga **6D** (79%).

#### Eksempel 6 Trinn 4



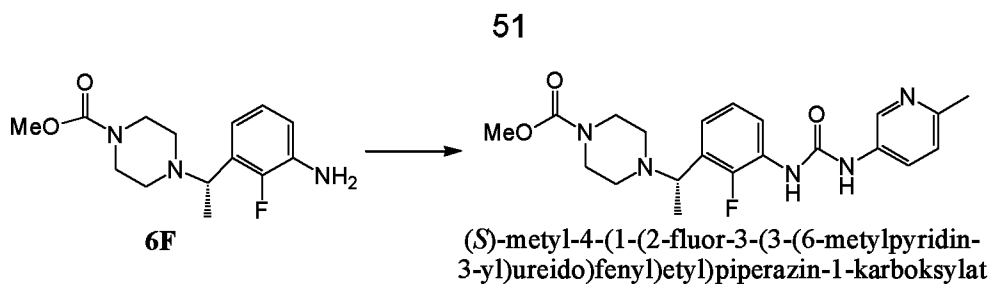
[00142] Til 1,0 ekv **6D** i eter (ca. 0,55 M) og 1,2 ekv Et<sub>3</sub>N ble satt ca. 1,1 ekv metansulfonylchlorid dråpevis ved 0°C. Blandingen ble omrørt ved romtemperatur i 30 min. Reaksjonsblandingen ble filtrert og konsentrert til et residuum. Residuet ble oppløst i ca. 5,9 volumer av DMF og 1,2 ekv metyl-piperazin-1-karboksylat-HCl-salt og 4 ekv av K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ble tilsatt. Reaksjonsblandingen ble oppvarmet ved 50°C i 16 timer. Reaksjonsblandingen ble avkjølt til romtemperatur og ca. 29 volumer av EtOAc og 29 volumer mettet NH<sub>4</sub>Cl ble tilsatt. Det organiske laget ble separert, tørket og konsentrert. Det resulterende residuet ble renset ved kromatografi over silikagel, hvilket ga **6E**.

#### Eksempel 6 Trinn 5



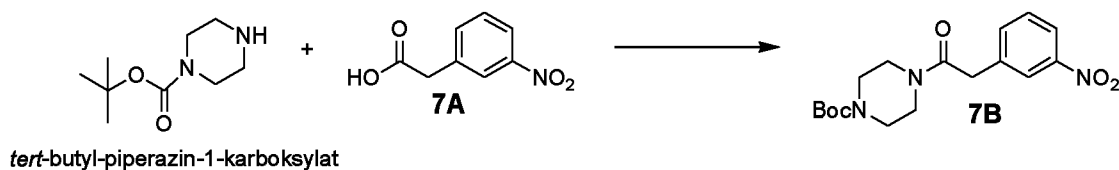
[00143] En blanding av 1 ekv **6E** og 10 vekt ekv av 10% Pd/C i MeOH ble omrørt over en atmosfære av 3,15 kg/cm<sup>2</sup> H<sub>2</sub> i 0,5 time. Etter erstatning av H<sub>2</sub>-atmosfæren med N<sub>2</sub> ble reaksjonsblandingen filtrert gjennom diatoméjord og diatoméjorden vasket med MeOH. Konsentrasjon av MeOH resulterte i isolering av **6F**.

#### Eksempel 6 Trinn 6



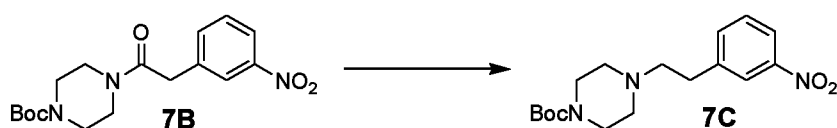
[00144] Til en løsning av 1,0 ekv **6F** i  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (ved ca. 0,3 M) under  $\text{N}_2$ -atmosfære ved romtemperatur ble satt 1,0 ekv av 5-isocyanato-2-metylpyridin og den resulterende blandingen ble omrørt ved romtemperatur i 0,5 time. Reaksjonsblandingens ble konsentrert til et residuum. Rensning ved revers fase HLPC (C-18 kolonne) ga (S)-metyl-4-(1-(2-fluor-3-(3-(6-metylpyridin-3-yl)ureido)fenyl)etyl)-piperazin-1-karboksylat som et hvitt, fast stoff. MS 416 (M+H).

### Eksempel 7 Trinn 1



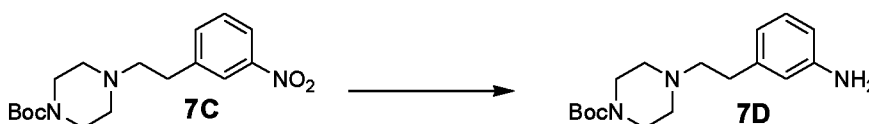
[00145] En ovnstørket, rundbunnet kolbe ble fylt med *tert*-butyl-piperazin-1-karboksylat (1,1 ekv), 3-nitrofenyleddiksyre (**7A**, 1,0 ekv), EDC (1,2 ekv) og HOBT (1,2 ekv). Kolben ble spylt med nitrogen og *N,N*-dimetylformamid (ca. 0,5 M **7A** i DMF) og trietylamin (2,0 ekv) ble tilsatt med sprøyte. Den resulterende reaksjonsblanding ble omrørt natten over ved romtemperatur. Reaksjonsblandingens ble deretter fortynnet med EtOAc og vasket 4 ganger med  $\text{H}_2\text{O}$ , to ganger med 1N vandig  $\text{KHSO}_4$ , én gang med mettet  $\text{NaHCO}_3$  og én gang med saltvann. Det organiske laget ble tørket over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrert og konsentrert i vakuum. *Tert*-butyl-4-(2-(3-nitrofenyl)acetyl)piperazin-1-karboksylat (**7B**) ble isolert som et fast stoff (80%) og anvendt uten ytterligere rensning.

### Eksempel 7 Trinn 2



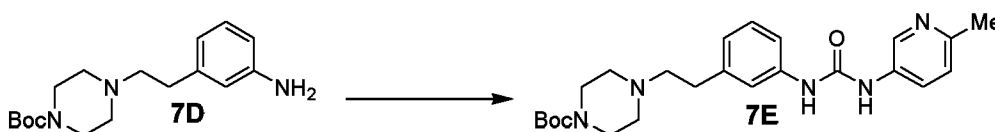
[00146] Til en løsning av *tert*-butyl-4-(2-(3-nitrofenyl)acetyl)piperazin-1-karboksylat (**7B**, 1,0 ekv) i THF (ca. 0,5 M **7B** i THF)) ble satt boran-THF (2,0 ekv) med sprøyte. Den resulterende reaksjonsblanding ble oppvarmet til tilbakeløp i 2 timer. Reaksjonsblandingen ble avkjølt i et is/vannbad og 10% vandig HOAc ble langsomt tilsatt. Blandingen ble konsentrert i vakuum og residuet ble oppløst i EtOAc. Det organiske laget ble fordelt med vann og det vandige laget ble gjort basisk (pH ~ 9) ved tilsetning av 50% NaOH. Det organiske laget ble deretter vasket to ganger med mettet vandig NaHCO<sub>3</sub> og én gang med saltvann. Det organiske laget ble tørket over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrert og konsentrert i vakuum. Det resulterende *tert*-butyl-4-(3-nitrofenetyl)piperazin-1-karboksylat (**7C**, kvant.) ble anvendt uten ytterligere rensning.

### Eksempel 7 Trinn 3



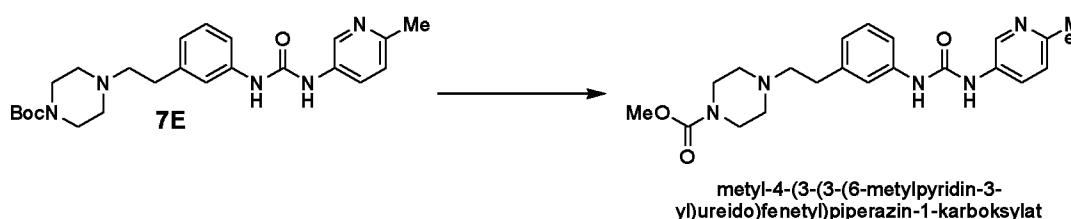
[00147] En Parr glasskolbe ble fylt med *tert*-butyl-4-(3-nitrofenetyl)piperazin-1-karboksylat (**7C**, 1,0 ekv) og metanol (ca. 0,2 M **7C** i MeOH). Til denne løsningen ble satt en oppslemming av 12,5 vekt ekv av 10% Pd/C i metanol. Reaksjonsblandingen ble lukket i et Parr hydrogeneringskar og underkastet 3 trykk/ventilerings-cykler med H<sub>2</sub>. Reaksjonen fikk løpe ved romtemperatur og 3,15 kg/cm<sup>2</sup> H<sub>2</sub> i 2,5 timer. Reaksjonsblandingen ble deretter tilsatt 12,5 vekt ekv av Pd(OH)<sub>2</sub>/C og karet ble igjen satt under trykk med hydrogen (3,15 kg/cm<sup>2</sup>). Etter 1 time ble reaksjonsblandingen filtrert gjennom et sjikt av diatoméjord, diatoméjorden vasket med MeOH og de kombinerte organiske lag konsentrert i vakuum for å gi det ønskede *tert*-butyl-4-(3-aminofenetyl)piperazin-1-karboksylat (**7D**, 63%), som ble anvendt uten ytterligere rensning.

### Eksempel 7 Trinn 4



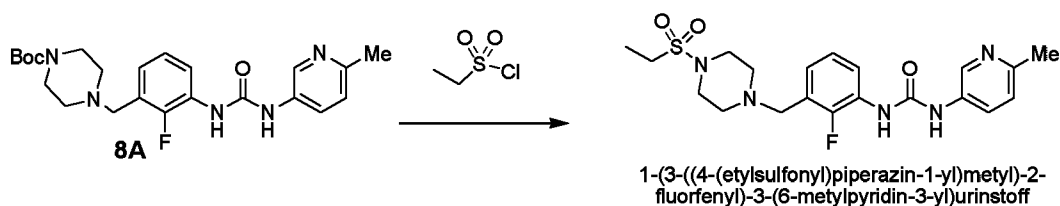
[00148] Til en løsning av *tert*-butyl-4-(3-aminofenetyl)piperazin-1-karboksylat (**7D**, 1,0 ekv) i THF (ca. 0,3 M **7D** i THF) ble dråpevis satt 5-isocyanato-2-metylpyridin (1,0 ekv). Den resulterende reaksjonsblanding ble omrørt i 2 timer. Til reaksjonsblandingen ble satt mettet vandig NaHCO<sub>3</sub>. Blandingen ble fortynnet med EtOAc og lagene ble separert. Det organiske laget ble vasket to ganger med mettet vandig NaHCO<sub>3</sub> og én gang med saltvann. Det organiske laget ble tørket over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrert og konsentrert i vakuum. Rensning over silikagel ved anvendelse av 5 – 12% MeOH/ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> som gradient elueringsmiddel ga *tert*-butyl-4-(3-(3-(6-metylpyridin-3-yl)ureido)fenetyl)piperazin-1-karboksylat (**7E**, 63%).

#### Eksempel 7 Trinn 5



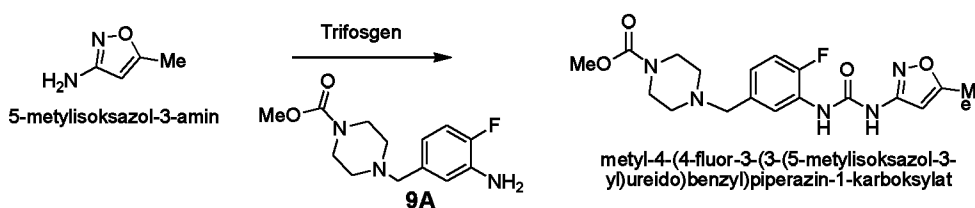
[00149] Til en løsning av *tert*-butyl-4-(3-(3-(6-metylpyridin-3-yl)ureido)fenetyl)piperazin-1-karboksylat (**7E**, 1,0 ekv) i MeOH (ca. 0,2 M **7E** i MeOH) ble satt en løsning av 2 M HCl i dioksan (ca. 12 ekv). Etter 70 min ble reaksjonsblandingen konsentrert i vakuum og anvendt uten rensning for påfølgende acyleringer. MS 398 (M+H).

[00150] Det resulterende HCl-salt (1,0 ekv) fra det foregående trinn ble suspendert i THF (ca. 0,15 M salt i THF) og trietylamin (4,0 ekv) ble tilsatt. Reaksjonsblandingen ble avkjølt til 0°C og metylklorformiat (1,05 ekv) ble tilsatt dråpevis og den resulterende blandingen omrørt i 5 min ved romtemperatur. Til reaksjonsblandingen ble satt mettet vandig NaHCO<sub>3</sub> fulgt av EtOAc. Lagene ble separert og det organiske laget ble vasket én gang med mettet vandig NaHCO<sub>3</sub>, én gang med saltvann, tørket over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrert og konsentrert i vakuum. Rensning over silikagel ved anvendelse av 2 – 10% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> som gradient elueringsmiddel ga metyl-4-(3-(3-(6-metylpyridin-3-yl)ureido)fenetyl)piperazin-1-karboksylat.

**Eksempel 8**

[00151] Til en løsning av 1,0 ekv **8A** i MeOH (ca. 0,07 M) ble satt en løsning av 2 M HCl i dioksan (ca. 30 ekv)). Etter 70 min ble reaksjonsblandingen konsentrert i vakuum og anvendt uten rensning for påfølgende acyleringer.

[00152] Det resulterende HCl-salt fra det foregående trinn ble suspendert i THF (ca. 0,05 M) og ca. 18 ekv diisopropyletylamin ble tilsatt. Reaksjonsblandingen ble avkjølt til 0°C og ca. 1 ekv etansulfonylklorid ble tilsatt dråpevis. Den resulterende blandingen ble omrørt i 5 min ved romtemperatur. Til reaksjonsblandingen ble satt mettet vandig NaHCO<sub>3</sub> fulgt av EtOAc. Lagene ble separert og det organiske laget ble vasket én gang med mettet vandig NaHCO<sub>3</sub>, én gang med saltvann, tørket over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrert og konsentrert i vakuum. Rensning over silikagel ved anvendelse av 1 – 10% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> som gradient elueringsmiddel fulgt av utgning i 1:1 acton/eter ga metyl-1-(3-((4-(ethylsulfonyl)piperazin-1-yl)metyl)-2-fluorfenyl)-3-(6-metylpyridin-3-yl)urinstoff. MS 436 (M+H).

**Eksempel 9**

[00153] Til en løsning av ca. 4 ekv trifosgen i THF (ca. 0,04 M) ved romtemperatur under N<sub>2</sub>-atmosfære ble satt 1 ekv 5-metylisoksazol-3-amin og 2 ekv diisopropyletylamin i THF (ca. 0,2 M amin i THF). Reaksjonsblandingen ble omrørt i 15 min. Til denne blandingen ble satt 1,0 ekv **9A** i THF (ca. 0,2 mM **9A** i THF). Den resulterende blandingen ble omrørt i 10 min. Til reaksjonsblandingen ble satt mettet vandig NaHCO<sub>3</sub> fulgt av EtOAc. Lagene ble separert og det organiske laget ble vasket én gang med mettet vandig NaHCO<sub>3</sub>, én gang med saltvann, tørket over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrert og konsentrert i vakuum. Rensning over silikagel ved anvendelse av 1 – 10% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> som gradient elueringsmiddel ga metyl-

4-(4-fluor-3-(3-(5-metylisoksazol-3-yl)ureido)benzyl)piperazin-1-karboksylat. MS 392 (M+H).

[00154] De følgende forbindelser ble syntetisert på en måte lignende de representative forbindelser ovenfor:

Masse-spek data	Forbindelsenavn
402 (M+H)	metyl-4-[(3-fluor-5-{{(6-metyl(3-pyridyl))amino}karbonylamino}fenyl)metyl]piperazinkarboksylat
416 (M+H)	etyl-4-[(4-fluor-3-{{(6-metyl(3-pyridyl))amino}karbonylamino}fenyl)metyl]piperazinkarboksylat
416 (M+H)	metyl-(3S)-3-{{(4-fluor-3-{{(6-metyl(3-pyridyl))amino}karbonylamino}fenyl)metyl}metylamino}pyrrolidinkarboksylat
400 (M+H)	N-{3-[(1S)-1-(4-acetyl)piperazinyl]etyl}-2-fluorfenyl}[(6-metyl(3-pyridyl))amino]karboksamid
410 (M+H)	N-{3-[(3-etyl(1,2,4-triazolo[3,4-c]piperazin-7-yl))metyl]-2-fluorfenyl}[(6-metyl(3-pyridyl))amino]karboksamid
408 (M+H)	N-(2-fluor-3-{{4-(metylsulfonyl)piperazinyl}metyl}fenyl)(4-pyridylamino)karboksamid
422 (M+H)	N-(3-{{4-(etylsulfonyl)piperazinyl}metyl}-2-fluorfenyl)(4-pyridylamino)karboksamid
402 (M+H)	metyl-4-[(2-fluor-3-{{(6-metyl(3-pyridyl))amino}karbonylamino}fenyl)metyl]piperazinkarboksylat

### Eksempel 10

#### Målidentifikasjons-forsøk

[00155] **Spesifisitetforsøk:** Spesifisitet mot hjerte-myosin blir evaluert ved å sammenligne effekten av den kjemiske enheten på aktin-stimulert ATPase for et panel av myosin-isoformer: hjerte, skjelett og glattmuskel, med en enkel 50µM konsentrasjon eller multiple konsentrasjoner av den kjemiske enhet.

### Eksempel 11

#### *In vitro* modeller av doseavhengig hjerte-myosin ATPase modulering

[00156] **Rekonstituert hjerte-sarkomere forsøk:** Dose-responser blir målt ved anvendelse av et kalsium-bufret, pyruvat-kinase og laktat-dehydrogenase-koblet ATPase forsøk inneholdende de følgende reagenser (konsentrasjoner uttrykt er endelige forsøks-konsentrasjoner): Kalium PIPES (12 mM), MgCl<sub>2</sub> (2 mM), ATP (1 mM), DTT (1 mM), BSA (0,1 mg/ml), NADH (0,5 mM), PEP (1,5 mM), pyruvat-kinase (4 U/ml), laktat-



dehydrogenase (8 U/ml) og ANTIFOAM (90 ppm). pH blir regulert til 6,80 ved 22°C ved tilsetning av kaliumhydroksid. Kalsiumnivåer blir kontrollert med et buffersystem inneholdende 0,6 mM EGTA og varierende konsentrasjoner av kalsium, for å oppnå en fri kalsium konsentrasjon på  $1 \times 10^{-4}$  M til  $1 \times 10^{-8}$  M.

**[00157]** Proteinkomponentene spesifikke for dette forsøket er bovin hjerte-myosin subfragment-1 (typisk 0,5  $\mu$ M), bovin hjerte-aktin (14  $\mu$ M), bovin hjerte-tropomyosin (typisk 3  $\mu$ M) og bovin hjerte-troponin (typisk 3-8  $\mu$ M). De nøyaktige konsentrasjoner av tropomyosin og troponin blir bestemt empirisk, ved titrering for å oppnå maksimal forskjell i ATPase-aktivitet når målt i nærvær av 2 mM EGTA mot den målt i nærvær av 0,1 mM  $\text{CaCl}_2$ . Den nøyaktige konsentrasjonen av myosin i forsøket blir også bestemt empirisk, ved titrering for å oppnå ønsket grad av ATP-hydrolyse. Denne varierer mellom proteinpreparater, på grunn av variasjoner i fraksjonen av aktive molekyler i hvert preparat.

**[00158]** Dose-responser blir typisk målt ved kalsiumkonsentrasjon svarende til 25% eller 50% av maksimal ATPase-aktivitet ( $p\text{Ca}_{25}$  eller  $p\text{Ca}_{50}$ ), så et preliminært forsøk blir utført for å teste responsen av ATPase-aktivitet på fri kalsium-konsentrasjoner i området  $1 \times 10^{-4}$  M til  $1 \times 10^{-8}$  M. Deretter blir forsøksblandingen regulert til  $p\text{Ca}_{50}$  (typisk  $3 \times 10^{-7}$  M). Forsøk blir utført ved først å fremstille en fortyningsserie av testforbindelse, hver med en forsøksblanding inneholdende kalium Pipes,  $\text{MgCl}_2$ , BSA, DTT, pyruvat-kinase, laktatdehydrogenase, myosin-subfragment-1, Antifoam, EGTA,  $\text{CaCl}_2$  og vann. Forsøket blir startet ved tilsetning av et likt volum av løsning inneholdende kalium Pipes,  $\text{MgCl}_2$ , BSA, DTT, ATP, NADH, PEP, aktin, tropomyosin, troponin, Antifoam og vann. ATP-hydrolyse blir overvåket ved absorbans ved 340 nm. Den resulterende doserespons-kurve blir tilpasset 4 parameter ligning  $y = \text{Bunn} + ((\text{Topp} - \text{Bunn}) / (1 + ((\text{EC}50/\text{X})^{\text{Hill}})))$ . AC1.4 er definert som konsentrasjonen ved hvilken ATPase aktivitet er 1,4-ganger høyere enn bunnen av dosekurven.

**[00159] Hjerte-myofibrill-forsøk:** For å bedømme effekten av kjemiske enheter på ATPase-aktivitet til full-lengde hjerte-myosin i sammenheng med native sarkomere, blir skurt myofibrill-forsøk utført. Hjerte-myofibriller blir oppnådd ved homogenisering av hjertevev i nærvær av ikke-ionisk detergent. Slik behandling fjerner membraner og mesteparten av oppløselige cytoplasmatiske proteiner men lar intakt hjerte-sarkomere akto-myosin-apparatet. Myofibrillpreparater beholder evnen til å hydrolysere ATP på en  $\text{Ca}^{++}$  kontrollert måte. ATPase-aktiviteter av slike myofibrillpreparater i nærvær og fravær av kjemiske enheter er

undersøkt ved  $\text{Ca}^{++}$ -konsentrasjoner over hele kalsium responsområdet men med foretrukne kalsium-konsentrasjoner som gir 25%, 50% og 100% av maksimal grad.

**[00160]** Myofibriller kan fremstilles fra enten friskt eller "flash"-frosset vev som er raskt tint. Vev blir finskåret og resuspendert i en relaxeringsbuffer inneholdende de følgende reagenser (konsentrasjoner angitt er endelige løsningskonsentrasjoner): Tris-HCl (10 mM),  $\text{MgCl}_2$  (2 mM), KCl (75 mM), EGTA (2 mM),  $\text{NaN}_3$  (1 mM), ATP (1 mM), fosfokreatin (4 mM), BDM (50 mM), DTT (1 mM), benzamidin (1 mM), PMSF (0,1 mM), leupeptin (1 ug/ml), pepstatin (1 ug/ml) og triton X-100 (1%). pH blir regulert til 7,2 ved 4°C ved tilsetning av HCl. Etter tilsetning av EDTA til 10 mM blir vevet håndskåret ved 4°C, i et kaldt rom og homogenisert ved anvendelse av en stor rotor-stator homogenisator (Omni Mixer). Etter blanding i 10s blir materialet pelletert ved sentrifugering (5 minutter, 2000x g maks, 4°C). Myofibrillene blir deretter resuspendert i en Standard Buffer inneholdende de følgende reagenser (konsentrasjoner angitt er endelige løsnings-konsentrasjoner): Tris-HCl (10 mM) pH 7,2 ved 4°C,  $\text{MgCl}_2$  (2 mM), KCl (75 mM), EGTA (2 mM),  $\text{NaN}_3$  (1 mM), Triton X-100 (1%), ved anvendelse av en glass-glass vev-maler (Kontes) inntil glatt, vanligvis 4-5 stryk. Myofibrillpelletten blir vasket mange ganger med kort homogenisering, ved anvendelse av rotor-stator homogenisator i 10 volumer av standard buffer, fulgt av sentrifugering. For å fjerne detergent blir myofibrillene vasket mange flere ganger med standard buffer som mangler Triton X-100. Myofibrillene blir deretter underkastet tre runder med gravitasjonsfiltrering ved anvendelse av 600, 300 og til slutt 100  $\mu\text{m}$  nylon mesh (Spectrum Lab Products) for å danne homogene blandinger og pelletert ned. Til slutt blir myofibrillene resuspendert i en lagringsbuffer inneholdende de følgende reagenser (konsentrasjoner angitt er endelige løsningskonsentrasjoner): Kalium PIPES (12 mM),  $\text{MgCl}_2$  (2 mM) og DTT (1 mM). Fast sukrose blir tilsatt under omrøring til 10% (vekt/volum) før frysing ("drop-freezing") i flytende nitrogen og lagring ved -80°C.

**[00161]** Doseresponser blir målt ved anvendelse av et kalsium-bufret, pyruvat-kinase og laktat-dehydrogenase-koblet ATPase-forsøk inneholdende de følgende reagenser (konsentrasjoner angitt er endelige forsøkskonsentrasjoner): Kalium PIPES (12 mM),  $\text{MgCl}_2$  (2 mM), ATP (0,05 mM), DTT (1 mM), BSA (0,1 mg/ml), NADH (0,5 mM), PEP (1,5 mM), pyruvat-kinase (4 U/ml), laktat-dehydrogenase (8 U/ml) og Antifoam (90 ppm). pH blir regulert til 6,80 ved 22°C ved tilsetning av kaliumhydroksid. Kalsiumnivåer blir kontrollert med et buffersystem inneholdende 0,6 mM EGTA og varierende konsentrasjoner av kalsium,

for å oppnå fri kalsium-konsentrasjon på  $1 \times 10^{-4}$  M til  $1 \times 10^{-8}$  M. Myofibrill-konsentrasjon i det endelige forsøk er typisk 0,2 til 1 mg/ml.

**[00162]** Doseresponser blir typisk målt ved kalsiumkonsentrasjonen svarende til 25%, 50% eller 100% av maksimal ATPase-aktivitet ( $pCa_{25}$ ,  $pCa_{50}$ ,  $pCa_{100}$ ), så et preliminært forsøk blir utført for å teste responsen av ATPase-aktivitet på fri kalsium-konsentrasjoner i området  $1 \times 10^{-4}$  M til  $1 \times 10^{-8}$  M. Deretter blir forsøksblandingen regulert til  $pCa_{50}$  (typisk  $3 \times 10^{-7}$  M). Forsøk blir utført ved først å fremstille en fortynningsserie av testforbindelse, hver med en forsøksblanding inneholdende kalium Pipes,  $MgCl_2$ , BSA, DTT, pyruvat-kinase, laktat-dehydrogenase, hjerte-myofibriller, Antifoam, EGTA,  $CaCl_2$  og vann. Forsøket blir startet ved tilsetning av et likt volum av løsning inneholdende kalium Pipes,  $MgCl_2$ , BSA, DTT, ATP, NADH, PEP, Antifoam og vann. ATP-hydrolyse blir overvåket ved absorbans ved 340 nm. Den resulterende dose responskurve blir tilpasset med 4 parameter ligning  $y = Bunn + ((Topp-Bunn)/(1+((EC50/X)^{Hill})))$ . AC1.4 er definert som konsentrasjonen ved hvilken ATPase-aktivitet er 1,4-ganger høyere enn bunnen av dosekurven.

## Eksempel 12

### Myocyttforsøk

**[00163]** PREPARERING AV HJERTE-VENTRIKULÆRE MYOCYTTER FRA VOKSNE ROTTER. Voksne Sprague-Dawley hannrotter blir anestesert med en blanding av isofluran-gass og oksygen. Hjerter blir raskt tatt ut, skyllet og oppgående aorta kanylert. Kontinuerlig retrograd perfusjon blir initiert på hjertene ved et perfusjonstrykk på 60 cm  $H_2O$ . Hjerter blir først perfusert med en nominelt  $Ca^{2+}$  fri modifisert Krebs-løsning med følgende sammensetning: 110 mM NaCl, 2,6 mM KCL, 1,2 mM  $KH_2PO_4 \cdot 7H_2O$ , 1,2 mM  $MgSO_4$ , 2,1 mM  $NaHCO_3$ , 11 mM glukose og 4 mM Hepes (alle Sigma). Dette medium blir ikke resirkulert og blir kontinuerlig gasset med  $O_2$ . Etter omtrent 3 minutter blir hjertet perfusert med modifisert Krebs-buffer supplert med 3,3% kollagenase (169  $\mu$ /mg aktivitet, Klasse II, Worthington Biochemical Corp., Freehold, NJ) og 25  $\mu$ M endelig kalsium-konsentrasjon inntil hjertet er tilstrekkelig blekt og mykt. Hjertet blir fjernet fra kanylen, atria og kar kastet og ventriklene blir kuttet i små stykker. Myocytterne blir dispergert ved forsiktig agitering av det ventrikulære vev i frisk kollagenase inneholdende Krebs før de blir forsiktig tvunget gjennom en 200  $\mu$ m nylon mesh i et 50  $cm^3$  rør. De resulterende myocytter blir resuspendert i modifisert Krebs-løsning inneholdende 25  $\mu$ M kalsium. Myocytter blir gjort kalsium-tolerante ved tilsetning av en kalsium-løsning (100 mM lager) med 10 minutters intervaller

inntil 100  $\mu\text{M}$  kalsium er oppnådd. Etter 30 minutter blir supernatanten kastet og 30 – 50 ml Tyrode-buffer (137 mM NaCl, 3,7 mM KCL, 0,5 mM MgCL, 11 mM glukose, 4 mM Hepes og 1,2 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4) blir satt til cellene. Celler blir holdt i 60 min ved 37°C før initiering av forsøk og anvendt innen 5 timer etter isolering. Preparater av celler blir anvendt bare hvis celler først har passert QC-kriterier ved å respondere på en standard (>150% av basal) og isoproterenol (ISO; > 250% av basal). I tillegg blir bare celler hvis basale kontraktilitet er mellom 3 og 8 % anvendt i de følgende forsøk.

**[00164]** VOKSEN VENTRIKULÆR-MYOCYTT KONTRAKTILITETSFORSEK. Aliquoter av Tyrode-buffer inneholdende myocytter blir plassert i perfusjonskammere (serie 20 RC-27NE; Warner Instruments) komplette med oppvarmningsplattformer. Myocytter får feste seg, kammeret blir oppvarmet til 37°C og cellene blir deretter perfusert med 37°C Tyrode-buffer. Myocytter blir felt-stimulert ved 1 Hz med platina-elektroder (20% over terskel). Bare celler som har klare striper og er uvirksomme før pacing blir anvendt for kontraktilitetsforsøk. For å bestemme basal kontraktilitet blir myocytter avbildet gjennom et 40x objektiv og ved anvendelse av et variabel bildefrekvens (60-240 Hz) ladnings-koblet kamera, blir bildene digitalisert og vist på en datamaskin-skjerm med avlesningsfrekvens på 240 Hz. [Frame grabber, myopacer, akvisisjon- og analyse-programvare for cellekontraktilitet er tilgjengelig fra IonOptix (Milton, MA).] Etter en minimum 5 minutters basal kontraktilitetsperiode, blir testforbindelser (0,01 – 15  $\mu\text{M}$ ) perfusert på myocytterne i 5 minutter. Etter denne tid blir frisk Tyrode-buffer perfusert for å bestemme forbindelse-utvaskings-karakteristika. Ved anvendelse av kantdeteksjon-strategi blir kontraktilitet til myocytterne og kontraksjons- og relaksasjons-hastighet kontinuerlig registrert.

**[00165]** KONTRAKTILITETSANALYSE: Tre eller flere individuelle myocytter blir testet pr. kjemisk enhet ved anvendelse av to eller flere forskjellige myocytt-preparater. For hver celle blir tjue eller flere kontraktilitetstransienter basalt (definert som 1 min før infusjon av den kjemiske enhet) og etter tilsetning av den kjemiske enhet, gjennomsnittsberegnet og sammenlignet. Disse gjennomsnittlige transienter blir analysert for å bestemme endringer i diastolisk lengde og ved anvendelse av Ionwizard analyseprogram (IonOptix), blir fraksjonert forkorting (% reduksjon i diastolisk lengde) og maksimum kontraksjons- og relaksasjons-hastigheter (um/sek) bestemt. Analyse av individuelle celler blir samlet. Økning i fraksjonert forkorting over basal indikerer forsterkning av myocytt-kontraktilitet.

**[00166]** KALSIMUM TRANSIENT ANALYSE: *Fura lading*: Cellepermeabel Fura-2 (Molecular Probes) blir oppløst i like mengder av pluronic (Mol Probes) og FBS i 10 min ved

romtemperatur. En 1  $\mu$ M Fura stamløsning blir fremstilt i Tyrode-buffer inneholdende 500 mM probenecid (Sigma). For å lade celler blir denne løsningen satt til myocytter ved romtemperatur. Etter 10 min. blir bufferen fjernet, cellene vasket med Tyrode inneholdende probenecid og inkubert ved romtemperatur i 10 min. Denne vask og inkubering blir gjentatt. Samtidige kontraktilitet- og kalsium-målinger blir bestemt innen 40 min. fra lading.

**[00167]**      *Avbildning:* en testforbindelse blir perfusert på celler. Samtidige kontraktilitet og kalsium transient-forhold blir bestemt ved baselinje og etter tilsetning av forbindelsen. Celler blir digitalt avbildet og kontraktilitet bestemt som beskrevet ovenfor, ved anvendelse av et rødt filter i lysbanen for å unngå interferens med fluorescerende kalsium-målinger. Akvisisjon, analyse-programvare og maskinvare for kalsium transient analyse blir oppnådd fra IonOptix. Instrumentering for fluorescens-måling omfatter en xenonlyslampe og en Hyperswitch dual eksitasjonslyskilde som alternerer mellom 340 og 380 bølgelengder ved 100 Hz av et galvo-drevet speil. En væskefylt lysguide leverer det duale eksitasjonslys til mikroskopet og emisjons-fluorescens blir bestemt ved anvendelse av et fotomultiplikator-rør (PMT). Fluorescenssystem-grenseflaten ruter PMT-signalet og forholdene blir registrert ved anvendelse av IonWizard akvisisjonsprogram.

**[00168]**      *Analyse:* For hver celle ble ti eller flere kontraktilitet og kalsium-forhold transienter basalt og etter forbindelsetilsetning, gjennomsnittsberegnet og sammenlignet. Kontraktilitet gjennomsnittlige transienter blir analysert ved anvendelse av Ionwizard analyse-program for å bestemme endringer i diastolisk lengde og fraksjonert forkorting (% reduksjon i diastolisk lengde). De gjennomsnittlige kalsium forhold transienter blir analysert ved anvendelse av Ionwizard analyseprogram for å bestemme endringer i diastolisk og systolisk forhold og 75% tid til baselinje ( $T_{75}$ ).

**[00169]**      *VARIGHET:* For å bestemme varighet av respons blir myocytter utfordret med en testforbindelse i 25 minutter fulgt av en 2 min. utvaskingsperiode. Kontraktilitet-respons blir sammenlignet 5 og 25 min. etter forbindelse infusjon.

**[00170]**      *TERSKELE-POTENSIALE:* Myocytter blir felt-stimulert ved en spenning omtrent 20% over terskel. I disse forsøk er terskelspenningen (minimum spenning for å pace cellen) empirisk bestemt, cellen pacet ved den terskel og deretter blir testforbindelsen infusert. Etter at aktiviteten er stabil blir spenningen redusert i 20 sekunder og deretter startet igjen. Endring av ionekanaler svarer til økning eller nedsettelse av terskel virkningspotensiale.

**[00171]**      *HZ FREKVENS:* Kontraktilitet av myocytter blir bestemt ved 3 Hz som følger: et 1 min. basalt tidspunkt fulgt av perfusjon av testforbindelsen i 5 min. fulgt av en 2 min. utvasking. Etter at cellekontraktilitet har returnert fullstendig til baselinje blir Hz-frekvensen

redusert til 1. Etter en innledende akklimatiseringsperiode blir cellen utfordret med samme forbindelse. Ettersom denne art, rotte, oppviser en negativ kraft frekvens ved 1 Hz, skal ved 3 Hz FS av cellen være lavere, men cellen skal fortsatt respondere ved å øke dens fraksjonerte forkorting i nærvær av forbindelsen.

[00172]        ADDITIV MED ISOPROTERENOL: For å demonstrere at en forbindelse virker via en forskjellig mekanisme enn den adrenerge stimulant isoproterenol, blir celler ladet med fura-2 og samtidig måling av kontraktilitet og kalsiumforhold blir bestemt. Myocytene blir sekvensielt utfordret med 5  $\mu\text{m}$  eller mindre av en testforbindelse, buffer, 2 nM isoproterenol, buffer og en kombinasjon av en testforbindelse og isoproterenol.

### Eksempel 13

#### *In vitro* modell av doseavhengig hjerte-myosin ATPase modulering

[00173]        Kveg- og rotte-hjertemyosiner blir rensset fra de respektive hjertevev. Skjelett og glattmuskel myosiner anvendt for spesifisitetsundersøkelser blir rensset fra henholdsvis kanin-skjelettmuskel og kylling-krås. Alle myosiner anvendt i forsøkene blir omdannet til en enkel-hodet oppløselig form (S1) ved begrenset proteolyse med chymotrypsin. Andre sarkomere komponenter: troponin-kompleks, tropomyosin og aktin blir rensset fra bovine hjerter (hjerte-sarkomere) eller kyllingbrystmuskel (skjelett-sarkomere).

[00174]        Aktivitet til myosiner blir overvåket ved å måle graden av hydrolyse av ATP. Myosin ATPase blir meget betydelig aktivert av aktin-filamenter. ATP-produksjon blir detektert i et koblet enzymatisk forsøk ved anvendelse av pyruvat-kinase (PK) og laktat-dehydrogenase (LDH). I dette forsøket blir hver ADP produsert som et resultat av ATP-hydrolyse resirkulert til ATP av PK med samtidig oksidasjon av NADH molekyl av LDH. NADH-oksidasjon kan hensiktsmessig overvåkes ved reduksjon i absorbans ved 340 nm bølgelengde.

[00175]        Doseresponser blir målt ved anvendelse av et kalsium-bufret, pyruvat-kinase og laktat-dehydrogenase-koblet ATPase-forsøk inneholdende de følgende reagenser (konsentrasjoner angitt er endelige forsøkskonsentrasjoner): Kalium PIPES (12 mM),  $\text{MgCl}_2$  (2 mM), ATP (1 mM), DTT (1 mM), BSA (0,1 mg/ml), NADH (0,5 mM), PEP (1,5 mM), pyruvat-kinase (4 U/ml), laktat-dehydrogenase (8 U/ml) og Antifoam (90 ppm). pH blir regulert til 6,80 ved 22°C ved tilsetning av kaliumhydroksid. Kalsiumnivåer blir kontrollert av et buffersystem inneholdende 0,6 mM EGTA og varierende konsentrasjoner av kalsium, for å oppnå fri kalsium konsentrasjon på  $1 \times 10^{-4}$  M til  $1 \times 10^{-8}$  M.

[00176] Proteinkomponenter spesifikke for dette forsøket er bovint hjerte-myosin subfragment-1 (typisk 0,5  $\mu\text{M}$ ), bovin hjerte-aktin (14  $\mu\text{M}$ ), bovin hjerte-tropomyosin (typisk 3  $\mu\text{M}$ ) og bovin hjerte-troponin (typisk 3-8  $\mu\text{M}$ ). De nøyaktige konsentrasjoner av tropomyosin og troponin blir bestemt empirisk, ved titrering for å oppnå maksimal forskjell i ATPase-aktivitet når målt i nærvær av 1 mM EGTA mot den målt i nærvær av 0,2 mM  $\text{CaCl}_2$ . Den nøyaktige konsentrasjonen av myosin i forsøket blir også bestemt empirisk, ved titrering for å oppnå ønsket grad av ATP-hydrolyse. Denne varierer mellom proteinpreparater, på grunn av variasjoner i fraksjonen av aktive molekyler i hvert preparat.

[00177] Forbindelse doseresponser blir typisk målt i kalsiumkonsentrasjonen svarende til 50% av maksimal ATPase-aktivitet ( $p\text{Ca}_{50}$ ), så et preliminært forsøk blir utført for å teste responsen av ATPase-aktivitet på fri kalsium konsentrasjoner i området  $1 \times 10^{-4}$  M til  $1 \times 10^{-8}$  M. Deretter blir forsøksblandingen regulert til  $p\text{Ca}_{50}$  (typisk  $3 \times 10^{-7}$  M). Forsøk blir utført ved først å fremstille en fortyningsserie av testforbindelse, hver med en forsøksblanding inneholdende kalium Pipes,  $\text{MgCl}_2$ , BSA, DTT, pyruvat-kinase, laktat-dehydrogenase, myosin subfragment-1, antifoam, EGTA,  $\text{CaCl}_2$  og vann. Forsøket blir startet ved tilsetning av et likt volum av løsning inneholdende kalium Pipes,  $\text{MgCl}_2$ , BSA, DTT, ATP, NADH, PEP, aktin, tropomyosin, troponin, antifoam og vann. ATP-hydrolyse blir overvåket ved absorbans ved 340 nm. Den resulterende doserespons-kurve blir tilpasset 4 parameter ligning  $y = \text{Bunn} + ((\text{Topp}-\text{Bunn}) / (1 + ((\text{EC}_{50}/X)^{\text{Hill}})))$ .  $\text{AC}_{1.4}$  er definert som konsentrasjonen ved hvilken ATPase-aktivitet er 1,4-ganger høyere enn bunnen av dosekurven.

[00178] Evnen til en forbindelse til å aktivere hjerte-myosin blir evaluert ved effekten av forbindelsen på aktin-stimulert ATPase av S1 subfragment. Aktin-filamenter i forsøket blir dekorert med troponin og tropomyosin og  $\text{Ca}^{++}$  konsentrasjon blir regulert til en verdi som ville resultere i 50% av maksimal aktivering. S1 ATPase blir målt i nærvær av en fortyningsserie av forbindelsen. Forbindelsekonsentrasjon nødvendig for 40% aktivering over ATPase-grad målt i nærvær av kontroll (ekvivalent volum av DMSO) er angitt som  $\text{AC}_{40}$ .

## Eksempel 14

### *In vivo* fraksjonert forkortings-forsøk

[00179] DYR Sprague Dawley hannrotter fra Charles River Laboratories (275 – 350 g) blir anvendt for bolus-effektivitet og infusjonsundersøkelser. Dyr med hjertesvikt er

beskrevet nedenfor. De blir holdt to pr. bur og har tilgang til mat og vann *ad libitum*. Det er en minimum tre-dagers akklimatiseringsperiode før forsøk.

**[00180]** EKKOKARDIOGRAFI Dyr blir anestesert med isofluran og holdt på kirurgisk plan gjennom hele prosedyren. Kjerne kroppstemperatur blir holdt ved 37°C ved anvendelse av en varmepute. Når anestesert blir dyrene barbert og hårfjerner blir påført for å fjerne alle spor av pels fra brystområdet. Brystområdet blir videre preparert med 70% ETOH og ultralydgel blir påført. Ved anvendelse av et GE System Vingmed ultralyd-system (General Electric Medical Systems), blir 10 MHz probe plassert på brystveggen og bilder blir tatt i kortakse-oversikt på nivået av papill-muskler. 2-D M-modus bilder av venstre hjertekammer blir tatt før og etter forbindelse bolus-injeksjon eller infusjon. *In vivo* fraksjonert forkorting ((ende diastolisk diameter – ende systolisk diameter)/ ende diastolisk diameter x 100) blir bestemt ved analyse av M-modus bilder ved anvendelse av GE EchoPak programvare.

**[00181]** BOLUS- OG INFUSJONSEFFEKTIVITET For bolus- og infusjonsprotokoller blir fraksjonert forkorting bestemt ved anvendelse av ekkokardiografi som beskrevet ovenfor. For bolus- og infusjons-protokoller blir fem pre-dose M-Modus bilder tatt med 30 sekunders intervaller før bolusinjeksjon eller infusjon av forbindelser. Etter injeksjon blir M-modus bilder tatt ved 1 min og deretter med fem minutter intervaller opptil 30 min. Bolus-injeksjon (0,5-5 mg/kg) eller infusjon skjer via et halevene-kateter. Infusjonsparametere blir bestemt fra farmakokinetiske profiler av forbindelsene. For infusjon mottok dyrene en 1 minutt innledningsdose umiddelbart fulgt av en 29 minutters infusjonsdose via et halevene-kateter. Innledningsdosen blir beregnet ved å bestemme målkonsentrasjon x stabilt volum av distribusjon. Opprettholdelse-dosekonsentrasjon blir bestemt ved å ta målkonsentrasjon x utskillingen. Forbindelser blir formulert i 25% cavitron-konstituent for bolus- og infusjons-protokoller. Blodprøver blir tatt for å bestemme plasmakonsentrasjon av forbindelsene.

### **Eksempel 15**

#### **Hemodynamikk i normale dyr og dyr med hjertesvikt**

**[00182]** Dyr blir anestesert med isofluran, holdt på kirurgisk plan og deretter barbert for preparering for kateterisering. Et innsnitt blir gjort i halsregionen og høyre karotid-arterie blottlagt og isolert. Et 2 French Millar Micro-tip trykk-kateter (Millar Instruments, Houston, TX) blir kanylert inn i høyre karotid-arterie og trødd forbi aorta og inn i venstre hjertekammer. Ende diastoliske trykkavlesninger, maks + / - dp/dt, systolisk trykk og



hjertertakt blir bestemt kontinuerlig mens forbindelse eller konstituent blir infusert. Målinger blir registrert og analysert ved anvendelse av PowerLab og Chart 4 programvare (ADInstruments, Mountain View, CA). Hemodynamiske målinger blir utført ved valgt infusjons-konsentrasjon. Blodprøver blir tatt for å bestemme plasmakonsentrasjon av forbindelsene.

### **Eksempel 16**

#### **Venstre koronararterie okklusjonsmodell av kongestiv hjertesvikt**

**[00183]**      DYR                      Sprague-Dawley CD (220-225 g; Charles River) hannrotter blir anvendt i dette forsøket. Dyr blir gitt fri tilgang til vann og kommersiell gnagerdiett under standard laboratorie-betingelser. Romtemperatur blir holdt ved 20-23°C og rom-belysning er i en 12/12-timer lys/mørke cyklus. Dyr blir akklimatisert til laboratorieomgivelsen 5 til 7 dager før undersøkelsen. Dyrene blir fastet natten over før kirurgi.

**[00184]**      OKKLUSJONSPROSEDYRE                      Dyr blir anestert med ketamin/xylazin (95 mg/kg og 5 mg/kg) og intubert med 14-16-gauge modifisert intravenøst kateter. Anestesi-nivå blir kontrollert ved tåklemming. Kjerne kroppstemperatur blir holdt ved 37°C ved anvendelse av et varmeteppe. Det kirurgiske området blir klemt og skrubbet. Dyret blir plassert i høyre lateral-stilling og initielt plassert på en ventilator med et topp innåndingstrykk på 10-15 cm H<sub>2</sub>O og respiratorisk hastighet 60-110 pust/min. 100% O<sub>2</sub> blir levert til dyrene av ventilatoren. Det kirurgiske sted blir vasket med kirurgisk vask og alkohol. Et innsnitt blir gjort over brystkassen i det 4.-5. interkostale rom. De underliggende muskler blir dissekert med forsiktighet for å unngå den laterale torakale vene, for å eksponere de interkostale muskler. Brysthulen blir inntrengt gjennom 4.-5. interkostale rom og innsnittet utvidet for å tillate visualisering av hjertet. Perikardet blir åpnet for å eksponere hjertet. En 6-0 silkesutur med taper-nål blir ført rundt venstre koronararterie nær dens startpunkt, som ligger i kontakt med venstre kant av den pulmonale konus, ved ca. 1 mm fra insersjonen av venstre atrie-vedheng. Venstre koronararterie blir ligert ved å binde suturen rundt arterien ("LCL"). Sham dyr blir behandlet på samme måte, bortsett fra at suturen ikke blir bundet. Innsnittet blir lukket i tre lag. Rotten blir ventilert inntil den er i stand til å puste av seg selv. Rottene blir ekstubert og får komme seg på en varmepute. Dyr mottar buprenorphin (0,01-0,05 mg/kg SQ) for postoperativ analgesi. Når de våkner blir de returnert til deres bur. Dyr blir overvåket daglig for tegn på infeksjon eller smerte. Infiserte eller døende dyr blir avlivet. Dyrene blir veiet én gang pr. uke.

**[00185]**      EFFEKTIVITETSANALYSE      Omtrent åtte uker etter infarkt-kirurgi, blir rottene scannet for tegn på myokardialt infarkt ved anvendelse av ekkokardiografi. Bare dyr med redusert fraksjonert forkorting sammenlignet med sham-rotter blir anvendt videre i effektivitetsforsøk. I alle forsøk er det fire grupper, sham + konstituent, sham + forbindelse, LCL + konstituent og LCL + forbindelse. 10 -12 uker etter LCL blir rotter infusert med en valgt infusjonskonsentrasjon. Som før blir fem pre-dose M-Modus bilder tatt med 30 sekunders intervaller før infusjon av forbindelser og M-modus bilder blir tatt med 30 sekunders intervaller opptil 10 minutter og hvert minutt eller med fem minutters intervaller deretter. Fraksjonert forkorting blir bestemt fra M-modus bilder. Sammenligninger mellom pre-dose fraksjonert forkorting og forbindelse-behandling blir utført ved ANOVA og post-hoc Student - Newman – Keuls. Dyrene får komme seg og innen 7-10 dager blir dyrene igjen infusert med forbindelser ved anvendelse av den hemodynamiske protokoll for å bestemme hemodynamiske endringer av forbindelsene i dyr med hjertesvikt. Ved slutten av infusjonen blir rottene avlivet og hjertevektene bestemt.

**[00186]**      Når testet som beskrevet i Eksempler 10-16 er kjemiske enheter beskrevet her vist å ha den ønskede aktivitet.

### **Eksempel 17**

#### **Hjerte-kontraktilitet *in vitro* og *in vivo* i en rottemodell av hjertesvikt**

**[00187]**      Et myofibrill-forsøk blir anvendt for å identifisere forbindelser (myosin-aktivatorer) som direkte aktiverer hjerte-myosin ATPase. Den cellulære virkningsmekanisme, *in vivo* hjertefunksjon i Sprague Dawley (SD) rotter og effektivitet i SD rotter med definert hjertesvikt til aktive forbindelser blir deretter bestemt. Cellulær kontraktilitet ble kvantifisert ved anvendelse av en kantdeteksjons-strategi og kalsium transient målt ved anvendelse av fura-2 ladede voksent rottehjerte-myocytter. Cellulær kontraktilitet øket over baselinje innen 5 minutter av eksponering for en aktiv forbindelse (0,2  $\mu$ M) uten endring av kalsium transient. Kombinasjon av aktiv forbindelse med isoproterenol ( $\beta$ -adrenerg agonist) vil resultere bare i en additiv økning i kontraktilitet med ingen ytterligere forandring i kalsium transient, hvilket demonstrerer at den aktive forbindelse ikke hemmer PDE-banen. *In vivo* kontraktile funksjon i anesteserte SD rotter blir kvantifisert ved anvendelse av ekkokardiografi (M-modus) og samtidige trykkmålinger. SD-rotter blir infusert med konstituent eller aktiv forbindelse med 0,25 – 2,5 mg/kg/time. Den aktive forbindelse vil øke fraksjonert forkorting (FS) og ejeksjonsfraksjon (EF) på en dose-avhengig måte med ingen betydelig forandring i perifert blodtrykk eller hjertetak bortsett fra ved den

høyeste dose. Rotter med definert hjertesvikt fremkalt ved venstre koronar ligering eller sham-behandlede rotter kan ha lignende og betydelig økninger i FS og EF når behandlet med 0,7 – 1,2 mg/kg/time aktiv forbindelse. Som oppsummering øket den aktive forbindelse hjerte-kontraktilitet uten å øke kalsium transient og var effektiv i en rottemodell med hjertesvikt, hvilket indikerer at den aktive forbindelse kan være et anvendelig terapeutisk middel ved behandling av human hjertesvikt.

### **Eksempel 18**

#### **Farmakologi**

**[00188]** Farmakologien av minst én kjemisk enhet beskrevet her er undersøkt i isolerte voksen rotte hjerte-myocytter, anesteserte rotter og i en kronisk instrumentert hundemodell av hjertesvikt fremkalt ved myokardialt infarkt kombinert med rask ventrikulær pacing. Den aktive forbindelse øker hjerte-myocytt-kontraktilitet ( $EC_{20} = 0,2 \mu M$ ) men øker ikke størrelsen eller forandrer kinetikken av kalsium transient i konsentrasjoner opptil  $10 \mu M$  i Fura-2 ladete myocytter. Den aktive forbindelse ( $30 \mu M$ ) hemmer ikke fosfodiesterase type 3.

**[00189]** I anesteserte rotter øker den aktive forbindelse ekkokardiografisk fraksjonert forkorting fra  $45 \pm 5,1\%$  til  $56 \pm 4,6\%$  etter en 30 minutters infusjon ved 1,5 mg/kg/time ( $n=6$ ,  $p < 0,01$ ).

**[00190]** I bevisste hunder med hjertesvikt øker den aktive forbindelse (0,5 mg/kg bolus, deretter 0,5 mg/kg/time i.v. i 6-8 timer) fraksjonert forkorting med  $74 \pm 7\%$ , minuttvolum med  $45 \pm 9\%$  og slagvolum med  $101 \pm 19\%$ . Hjertetakt reduseres med  $27 \pm 4\%$  og venstre atriale trykk faller fra  $22 \pm 2$  mmHg til  $10 \pm 2$  mmHg ( $p < 0,05$  for alle). I tillegg endres hverken gjennomsnittlig arterielt trykk eller koronar blodstrøm betydelig. Diastolisk funksjon blir ikke svekket ved denne dosen. Det er ingen betydelige endringer i en konstituent-behandlet gruppe. Den aktive forbindelse forbedret hjertefunksjon på en måte som indikerer at forbindelser av denne klassen kan være fordelaktige for pasienter med hjertesvikt.

### **Eksempel 19**

#### **Farmasøytisk preparat**

**[00191]** Et farmasøytisk preparat for intravenøs administrering blir fremstilt på følgende måte.

**[00192]** 1 mg/ml (som fri base) IV-løsning med konstituent som er 50 mM sitronsyre, pH regulert til 5,0 med NaOH:

<b>Sammensetning</b>	<b>Enhetsformel (mg/ml)</b>
Aktivt middel	1,00
Sitronsyre	10,51
Natriumhydroksid	qs til pH 5,0
Vann for injeksjon (WFI)	q.s. til 1 ml

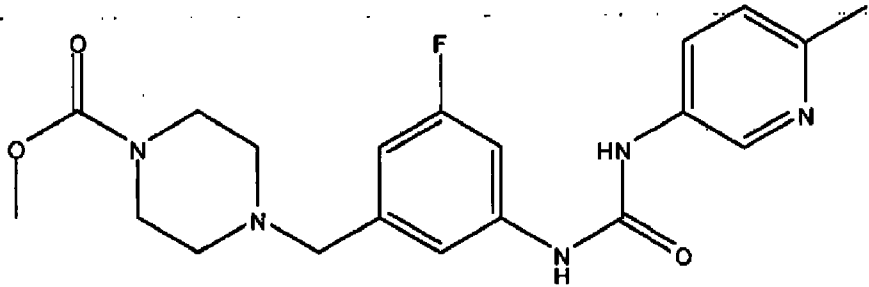
\*Alle komponenter forskjellige fra den aktive forbindelse er USP / Ph. Eur. tilpasset

**[00193]** Et egnet formuleringskar blir fylt med WFI til omtrent 5% av bulk løsningsvolum. Sitronsyren (10,51 g) blir veiet, satt til formuleringskaret og omrørt for å produsere 1M sitronsyre. Det aktive midlet (1,00 g) blir veiet og oppløst i 1 M av sitronsyreløsningen. Den resulterende løsningen blir overført til et større egnet formuleringskar og WFI blir tilsatt til omtrent 85% av bulk løsningsvolum. pH i bulk-løsningen blir målt og regulert til 5,0 med 1N NaOH. Løsningen blir bragt til dens endelige volum (1 liter) med WFI.

## Patentkrav:

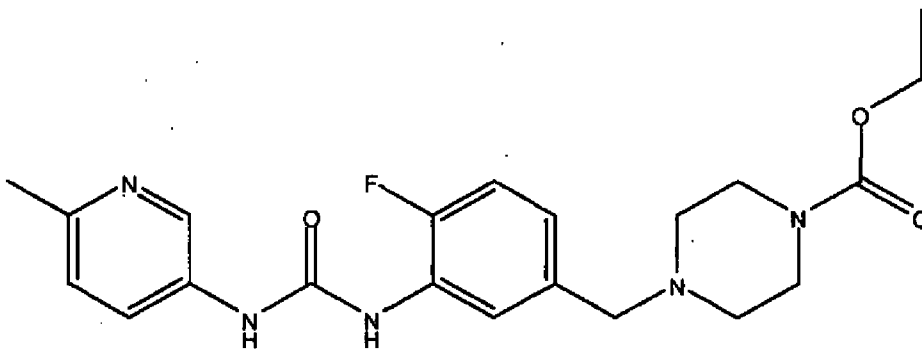
## 1. Forbindelse valgt fra:

i) metyl 4-[(3-fluor-5-[[6-metyl(3-pyridyl)]amino]karbonylamino}-fenyl)metyl]piperazinekarboksylat



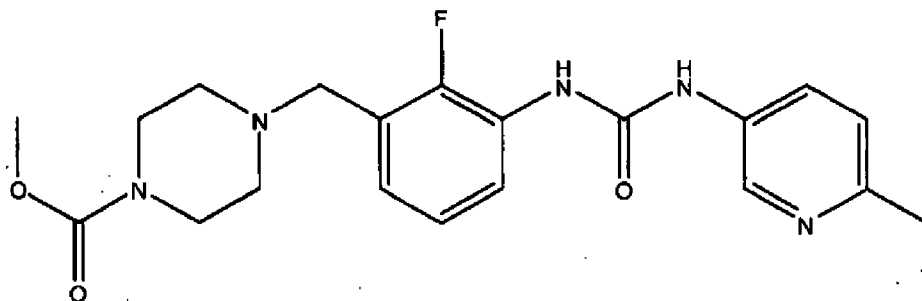
eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav;

ii) etyl 4-[(4-fluor-3-[[6-metyl(3-pyridyl)]amino]karbonylamino}fenyl)-metyl]piperazinekarboksylat



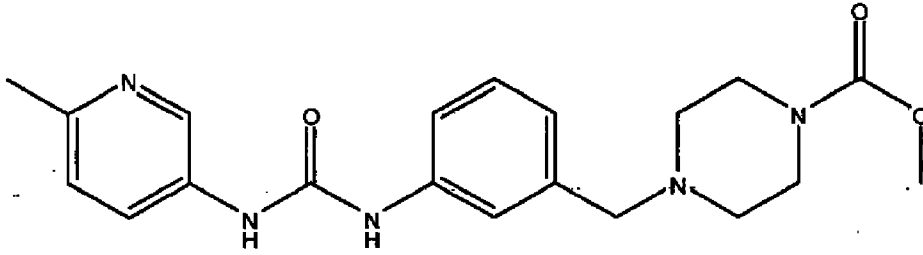
eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav;

iii) metyl 4-[(2-fluor-3-[[6-metyl(3-pyridyl)]amino]karbonylamino}-fenyl)metyl]piperazinekarboksylat



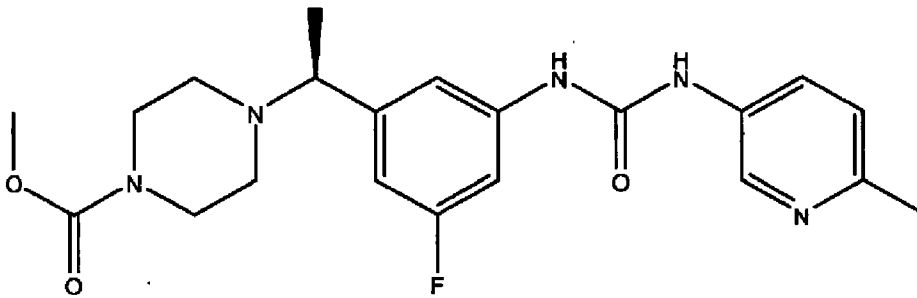
eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav;

iv) metyl 4-[(3-[[6-metyl(3-pyridyl)]amino]karbonylamino}fenyl)-metyl]piperazinekarboksylat



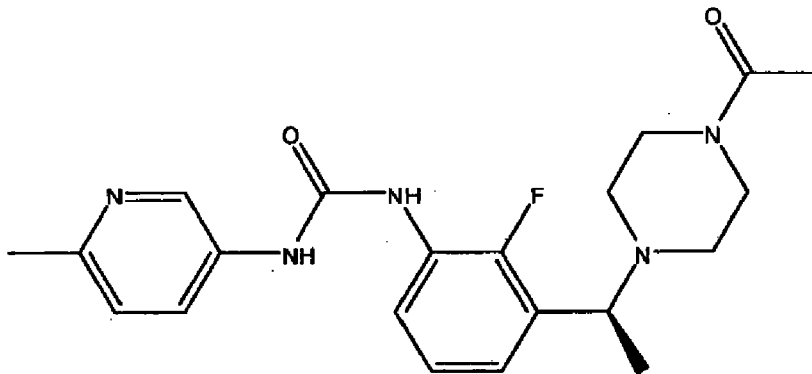
eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav;

v) metyl 4-[(1S)-1-(5-fluor-3-[[6-metyl(3-pyridyl)]amino]karbonylamino)-fenyl)etyl]piperazinekarboksylat



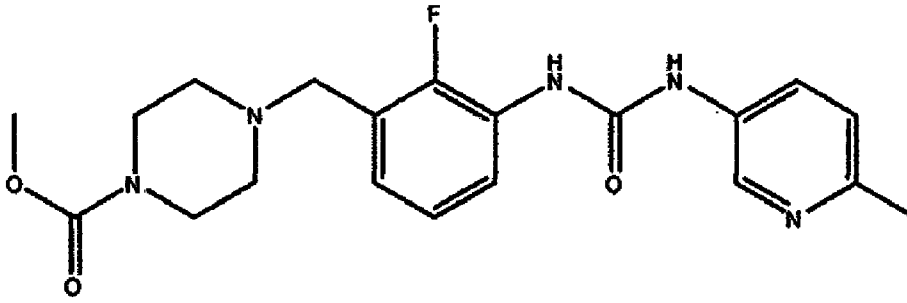
eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav; og

vi) N-{3-[(1S)-1-(4-acetyl-piperazinyl)etyl]-2-fluorfenyl}[(6-metyl(3-pyridyl))amino]karboksamid



eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav.

2. Forbindelse ifølge krav 1, som er metyl 4-[(2-fluor-3-[[6-metyl(3-pyridyl)]amino]karbonylamino)-fenyl)metyl]piperazinekarboksylat



eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav.

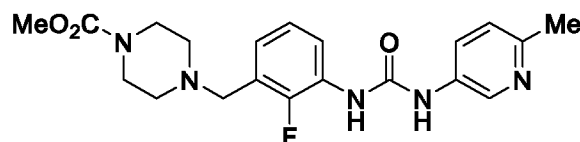
3. Farmasøytisk preparat omfattende et farmasøytisk akseptabelt tilsetningsmiddel, bærer eller adjuvans og forbindelse ifølge krav 1 eller krav 2 eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav.

4. Forbindelse eller farmasøytiske preparat ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 3 for anvendelse ved en metode for behandling av hjertesykdom hos et pattedyr hvilken metode omfatter administrering til et pattedyr med behov for dette en terapeutisk effektiv mengde av forbindelse ifølge krav 1 eller krav 2 eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav eller et farmasøytisk preparat ifølge krav 3.

5. Forbindelse eller farmasøytiske preparat for anvendelse ifølge krav 4, hvor hjertesykdommen er akutt eller dekompensert kongestiv hjertesvikt eller kronisk kongestiv hjertesvikt.

6. Forbindelse eller farmasøytiske preparat for anvendelse ifølge krav 4, hvor hjertesykdommen er systolisk hjertesvikt.

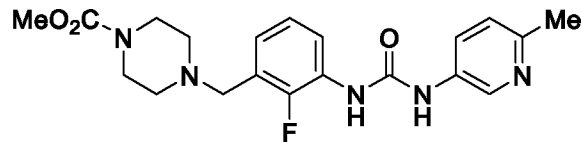
7. Forbindelse ifølge krav 2 for anvendelse ved en metode for å forbedre hjerte- kontraktilitet i hjertevev uten å endre kalsiumtransienten, hvor forbindelsen er:



eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav.

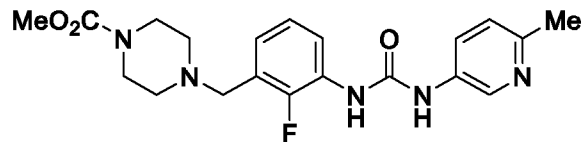
8. Forbindelse ifølge krav 2 for anvendelse ved en metode for å stabilisere hjertefunksjonen hos en pasient i påvente av et hjerte transplantat, hvor forbindelsen er:

71



eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav.

9. Forbindelse ifølge krav 2 for anvendelse ved en metode for behandling av hjertesvikt gjennom økende kontraktilitet for å modulere systolisk funksjon eller gjennom å bevirke total relaksasjon av moderat diastolisk funksjon, hvor forbindelsen er:



eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav.

10. Farmasøytisk preparat omfattende forbindelse ifølge krav 2 og et farmasøytisk akseptabelt tilsetningsmiddel, bærer eller adjuvans, for anvendelse i henhold til kravene 7 til 9.

11. Preparatet for anvendelse ifølge krav 10, formulert i en form valgt fra gruppen bestående av et injiserbar fluid, en aerosol, en tablett, en pille, en kapsel, en sirup, en krem, en gel og et transdermalt plaster.