

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 532 753**

51 Int. Cl.:

**C07D 405/12** (2006.01)

**A61K 31/404** (2006.01)

**A61P 3/00** (2006.01)

**A61P 25/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.11.2008 E 08876364 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.12.2014 EP 2365972**

54 Título: **Moduladores de transportadores del casete de unión a ATP**

30 Prioridad:

**06.11.2008 US 112152 P**

**06.11.2008 US 112145 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**31.03.2015**

73 Titular/es:

**VERTEX PHARMACEUTICALS INCORPORATED  
(100.0%)**

**50 Northern Avenue  
Boston, MA 02210, US**

72 Inventor/es:

**RUAH, SARA S. HADIDA;  
GROOTENHUIS, PETER D. J.;  
VAN GOOR, FREDRICK;  
MILLER, MARK T.;  
MCCARTNEY, JASON;  
ZHOU, JINGLAN;  
BEAR, BRIAN y  
NUMA, MEHDI MICHEL DJAMEL**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 532 753 T3**

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

**Moduladores de transportadores del casete de unión a ATP****Descripción**5 CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a moduladores de transportadores del casete de unión a ATP ("ABC") o fragmentos de los mismos, que incluyen el regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística ("CFTR"), composiciones del mismo y métodos con el mismo. La presente invención también se refiere a métodos para tratar enfermedades mediadas por el transportador de ABC usando tales moduladores.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 Los transportadores de ABC son una familia de proteínas transportadoras de membrana que regulan el transporte de una amplia variedad de agentes farmacológicos, fármacos posiblemente tóxicos y xenobióticos, además de aniones. Los transportadores de ABC son proteínas de la membrana homólogas que se unen a y usan adenosina trifosfato (ATP) celular para sus actividades específicas. Algunos de estos transportadores se descubrieron como proteínas de resistencia a múltiples fármacos (como la glucoproteína MDR1-P, o la proteína de resistencia a múltiples fármacos, MRP1), que defienden las células cancerosas malignas de agentes quimioterapéuticos. Hasta la fecha, se han  
20 identificado 48 transportadores de ABC y agrupado en 7 familias basándose en su identidad de secuencias y función.

Los transportadores de ABC regulan una variedad de funciones fisiológicas importantes dentro del cuerpo y proporcionan defensa contra compuestos medioambientales perjudiciales. Debido a esto, representan posibles  
25 dianas para fármacos importantes para el tratamiento de enfermedades asociadas a defectos en el transportador, prevención del transporte de fármacos fuera de la célula diana e intervención en otras enfermedades en las que puede ser beneficiosa la modulación de la actividad de transportadores de ABC.

Un miembro de la familia de transportadores de ABC comúnmente asociado a enfermedad es el canal de aniones mediado por AMPc/ATP, CFTR. CFTR se expresa en una variedad de tipos de células, que incluyen células  
30 epiteliales absorbentes y secretoras, en las que regula el flujo de aniones a través de la membrana, además de la actividad de otros canales de iones y proteínas. En células epiteliales, el funcionamiento normal de CFTR es crítico para el mantenimiento del transporte de electrolitos a través del cuerpo, que incluye tejido respiratorio y digestivo. El CFTR está compuesto por aproximadamente 1480 aminoácidos que codifican una proteína constituida de una  
35 repetición en tándem de dominios transmembrana, conteniendo cada uno seis hélices transmembrana y un dominio de unión de nucleótidos. Los dos dominios transmembrana están ligados por un dominio regulador (R) polar grande con múltiples sitios de fosforilación que regulan la actividad de canales y el tráfico celular.

Se ha identificado el gen que codifica CFTR y secuenciado (véanse Gregory, R. J. y col. (1990) Nature 347:382-386; Rich, D. P. y col. (1990) Nature 347:358-362), (Riordan, J. R. y col. (1989) Science 245:1066-1073). Un defecto en este gen produce mutaciones en CFTR produciendo fibrosis quística ("FQ"), la enfermedad genética mortal más  
40 común en los seres humanos. La fibrosis quística afecta aproximadamente a uno de cada 2.500 lactantes en los Estados Unidos. Dentro de la población general de los Estados Unidos, hasta 10 millones de personas llevan una única copia del gen defectuoso sin efectos de enfermedad evidentes. A diferencia, individuos con dos copias del gen asociado a la FQ, padecen los efectos debilitantes y mortales de la FQ, que incluyen enfermedad pulmonar crónica.

En pacientes con fibrosis quística, las mutaciones en CFTR expresadas endógenamente en epitelios respiratorios conducen a secreción aniónica apical reducida, causando un desequilibrio en el transporte de iones y fluidos. La  
50 disminución resultante en el transporte de aniones contribuye a una acumulación potenciada de moco en el pulmón e infecciones microbianas concomitantes que por último lugar producen la muerte en pacientes con FQ. Además de la enfermedad respiratoria, los pacientes con FQ normalmente padecen problemas gastrointestinales e insuficiencia pancreática que, si se deja sin tratar, produce muerte. Además, la mayoría de los hombres con fibrosis quística son estériles y la fecundidad es reducida entre mujeres con fibrosis quística. A diferencia de los graves efectos de dos copias del gen asociado a la FQ, los individuos con una única copia del gen asociado a la FQ presentan elevada  
55 resistencia al cólera y a deshidratación resultante de diarrea – que quizás explica la frecuencia relativamente alta del gen de FQ dentro de la población.

El análisis de secuencias del gen CFTR de cromosomas de FQ ha revelado una variedad de mutaciones causantes de enfermedad (Cutting, G. R. y col. (1990) Nature 346:366-369; Dean, M. y col. (1990) Cell 61:863-870; y Kerem, B-S. y col. (1989) Science 245:1073-1080; Kerem, B-S y col. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:8447-8451). Hasta la fecha, se han identificado > 1000 mutaciones causantes de enfermedad en el gen de FQ (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>). La mutación más prevalente es una delección de fenilalanina en la posición 508 de la secuencia de aminoácidos de CFTR, y comúnmente se denomina  $\Delta F508$ -CFTR. Esta mutación se produce en aproximadamente el 70 % de los casos de fibrosis quística y está asociada a una enfermedad grave.

65 La delección del residuo 508 en  $\Delta F508$ -CFTR previene que la proteína naciente se pliegue correctamente. Esto

5 produce la incapacidad de la proteína mutante para salir del RE, y el tránsito a la membrana plasmática. Como resultado, el número de canales presentes en la membrana es mucho menor al observado en células que expresan CFTR no mutado. Además del tráfico alterado, la mutación produce la apertura defectuosa de los canales. Juntos, el reducido número de canales en la membrana y la defectuosa apertura conducen al transporte reducido de aniones a través de los epitelios, conduciendo a transporte defectuoso de iones y fluido (Quinton, P. M. (1990), FASEB J. 4: 2709-2727). Sin embargo, los estudios han mostrado que los números reducidos de  $\Delta F508$ -CFTR en la membrana son funcionales, sin embargo inferiores a CFTR no mutado (Dalemans y col. (1991), Nature Lond. 354: 526-528; Denning y col., arriba; Pasyk y Foskett (1995), J. Cell. Biochem. 270: 12347-50). Además de  $\Delta F508$ -CFTR, otras mutaciones causantes de enfermedad en CFTR que producen tráfico, síntesis y/o apertura de canales defectuoso podrían ser reguladas por incremento o por disminución para alterar la secreción de aniones y modificar la progresión de la enfermedad y/o gravedad.

15 Aunque CFTR transporta una variedad de moléculas, además de aniones, es evidente que esta función (el transporte de aniones) representa un elemento en un importante mecanismo de transporte de iones y agua a través del epitelio. Los otros elementos incluyen el canal de  $\text{Na}^+$  epitelial, ENaC, co-transportador de  $\text{Na}^+2\text{Cl}^-/\text{K}^+$ , bomba de  $\text{Na}^+-\text{K}^+$ -ATPasa y los canales de  $\text{K}^+$  de la membrana basolateral, que son responsables de la captación de cloruro en la célula.

20 Estos elementos funcionan juntos para lograr el transporte direccional a través del epitelio mediante su expresión y localización selectiva dentro de la célula. La absorción de cloruro tiene lugar por la actividad coordinada de ENaC y CFTR presente sobre la membrana apical y la bomba de  $\text{Na}^+-\text{K}^+$ -ATPasa y canales de  $\text{Cl}^-$  expresados sobre la superficie basolateral de la célula. El transporte activo secundario de cloruro del lado luminal conduce a la acumulación de cloruro intracelular, que puede entonces abandonar pasivamente la célula mediante canales de  $\text{Cl}^-$ , produciendo un transporte vectorial. La disposición del co-transportador de  $\text{Na}^+2\text{Cl}^-/\text{K}^+$ , la bomba de  $\text{Na}^+-\text{K}^+$ -ATPasa y los canales de  $\text{K}^+$  de la membrana basolateral sobre la superficie basolateral y CFTR sobre el lado luminal coordinan la secreción de cloruro mediante CFTR sobre el lado luminal. Debido a que el agua nunca es probablemente activamente transportada ella misma, su flujo a través de los epitelios depende de minúsculos gradientes osmóticos transepiteliales generados por el flujo volumétrico de sodio y cloruro.

30 Además de la fibrosis quística, la modulación de la actividad de CFTR puede ser beneficiosa para otras enfermedades no directamente producidas por mutaciones en CFTR, tales como enfermedades secretoras y otras enfermedades del plegamiento de proteínas mediadas por CFTR. Éstas incluyen, pero no se limitan a, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfermedad del ojo seco y síndrome de Sjögren.

35 La EPOC se caracteriza por la limitación del flujo de aire que es progresiva y no completamente reversible. La limitación del flujo de aire es debida a hipersecreción de moco, enfisema y bronquiolitis. Los activadores de CFTR mutante o no mutado ofrecen un posible tratamiento de la hipersecreción de moco y eliminación mucociliar alterada que es común en EPOC. Específicamente, el aumento de la secreción de aniones a través de CFTR puede facilitar el transporte de fluido en el líquido de la superficie de las vías respiratorias para hidratar el moco y viscosidad del fluido periciliar optimizada. Esto conduciría a eliminación mucociliar potenciada y una reducción en los síntomas asociados a EPOC. La enfermedad del ojo seco se caracteriza por una disminución en la producción acuosa de lágrimas y perfiles de lípidos, proteínas y mucina de la película de la lágrima anormales. Hay muchas causas de ojo seco, algunas de las cuales incluyen edad, cirugía de los ojos con Lasik, artritis, medicaciones, quemaduras químicas/térmicas, alergias y enfermedades, tales como fibrosis quística y síndrome de Sjögren. El aumento de la secreción de aniones mediante CFTR potenciaría el transporte de fluido de las células endoteliales de la córnea y glándulas secretoras que rodean el ojo para aumentar la hidratación de la córnea. Esto ayudaría a aliviar los síntomas asociados a enfermedad del ojo seco. El síndrome de Sjögren es una enfermedad autoinmunitaria en la que el sistema inmunitario ataca las glándulas productoras de humedad en todo el cuerpo, que incluyen el ojo, boca, piel, tejido respiratorio, hígado, vagina e intestino. Los síntomas incluyen ojo seco, boca y vagina, además de enfermedad pulmonar. La enfermedad también está asociada a artritis reumatoide, lupus sistémico, esclerosis sistémica y polimiositis/dermatomiositis. Se cree que el tráfico defectuoso de proteínas produce la enfermedad, para las que las opciones de tratamiento están limitadas. Los moduladores de la actividad de CFTR pueden hidratar los diversos órganos afectados por la enfermedad y ayudar a elevar los síntomas asociados.

55 Como se ha tratado anteriormente, se cree que la delección del residuo 508 en  $\Delta F508$ -CFTR previene que la proteína nascente se pliegue correctamente, produciendo la incapacidad de esta proteína mutante para salir del RE, y el tránsito a la membrana plasmática. Como resultado, cantidades insuficientes de la proteína madura están presentes en la membrana plasmática y el transporte de cloruro dentro de tejidos epiteliales es significativamente reducido. En realidad, se ha mostrado que este fenómeno celular de procesamiento en el RE defectuoso de transportadores de ABC por la maquinaria del RE es la base subyacente no solo para la enfermedad de FQ, sino para una amplia variedad de otras enfermedades aisladas y heredadas. Las dos formas por las que la maquinaria del RE puede funcionar mal es tanto por la pérdida de acoplamiento a exportación del RE de las proteínas que conducen a la degradación, como por la acumulación en el RE de estas proteínas defectuosas/erróneamente plegadas [Aridor M y col., Nature Med., 5(7), pp 745-751 (1999); Shastry, B.S., y col., Neurochem. International, 43, pp 1-7 (2003); Rutishauser, J., y col., Swiss Med Wkly, 132, pp 211-222 (2002); Morello, JP y col., TIPS, 21, pp. 466- 469 (2000); Bross P. y col., Human Mut., 14, pp. 186-198 (1999)]. Las enfermedades asociadas a la primera clase de mal

funcionamiento del RE son fibrosis quística (debido a  $\Delta F508$ -CFTR erróneamente plegado como se ha tratado anteriormente), enfisema hereditario (debido a  $\alpha 1$ -antitripsina; variantes no PiZ), hemocromatosis hereditaria, deficiencias en la coagulación-fibrinólisis, tales como deficiencia de proteína C, angioedema hereditario tipo 1, deficiencias del procesamiento de lípidos, tales como hipercolesterolemia familiar, quilomiconemia tipo 1, abetalipoproteinemia, enfermedades de almacenamiento de lisosomas, tales como enfermedad de las células I/pseudo-Hurler, mucopolisacaridosis (debida a enzimas de procesamiento de lisosomas), Sandhof/Tay-Sachs (debida a  $\beta$ -hexosaminidasa), Crigler-Najjar tipo II (debida a la UDP-glucuroniltransferasa siálica), poliendocrinopatía/hiperinsulinemia, diabetes mellitus (debida al receptor de insulina), enanismo de Laron (debido al receptor de la hormona del crecimiento), deficiencia de mieloperoxidasa, hipoparatiroidismo primario (debido a la hormona preproparatiroidea), melanoma (debido a tirosinasa). Las enfermedades asociadas a la última clase del mal funcionamiento del RE son glicanosis CDG tipo 1, enfisema hereditario (debido a  $\alpha 1$ -antitripsina (variante PiZ), hipertiroidismo congénito, osteogénesis imperfecta (debida a procolágeno tipo I, II, IV), hipofibrinogenemia hereditaria (debida a fibrinógeno), deficiencia de ACT (debida a  $\alpha 1$ -antiquimotripsina), diabetes insípida (DI), DI neurohipofisaria (debida a la hormona vasopresina/receptor V2), DI nefrogénica (debida a acuaporina II), síndrome de Charcot-Marie-Tooth (debido a la proteína mielina periférica 22), enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher, enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Alzheimer (debida a  $\beta$ APP y presenilinas), enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, parálisis supranuclear progresiva, enfermedad de Pick, varios trastornos neurológicos de la poliglutamina, tales como Huntington, ataxia espinocerebelosa tipo I, atrofia muscular espinal y bulbar, atrofia dentato-rubro-pálido-luisiana y distrofia miotónica, así como encefalopatías espongiiformes, tales como la enfermedad hereditaria de Creutzfeldt-Jakob (debida a un defecto en el procesamiento de las proteínas priónicas), enfermedad de Fabry (debida a la  $\alpha$ -galactosidasa A lisosómica) y el síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (debido a un defecto en el procesamiento de Prp).

Además de la regulación por incremento de la actividad de CFTR, el reducir la secreción de aniones por los moduladores de CFTR puede ser beneficioso para el tratamiento de diarreas secretoras, en las que el transporte del agua epitelial aumenta espectacularmente como resultado del transporte de cloruro activado por secretagogos. El mecanismo implica la elevación de AMPc y la estimulación de CFTR.

Aunque hay numerosas causas de la diarrea, las principales consecuencias de las enfermedades diarreicas, resultantes del excesivo transporte de cloruro, son comunes a todas, e incluyen deshidratación, acidosis, crecimiento alterado y muerte.

Las diarreas agudas y crónicas representan un problema médico importante en muchas áreas del mundo. La diarrea es tanto un factor significativo en la malnutrición como la causa frecuente de muerte (5.000.000 muertes/año) en niños de menos de cinco años de edad.

Las diarreas secretoras también son una afección peligrosa en pacientes de síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y enfermedad inflamatoria del intestino (EII) crónica. 16 millones de viajeros a países en desarrollo de naciones industrializadas desarrollan cada año diarrea, variando la gravedad y número de casos de diarrea dependiendo del país y área de viaje.

La diarrea en animales de establo y mascotas tales como vacas, cerdos y caballos, ovejas, cabras, gatos y perros, también conocida como diarreas neonatales, es una causa importante de muerte en estos animales. La diarrea puede resultar de cualquier transición importante, tal como destete o movimiento físico, además de en respuesta a una variedad de infecciones bacterianas o virales y generalmente se produce dentro de las primeras horas de vida del animal.

La bacteria más común causante de la diarrea es *E. coli* enterotoxogénica (ETEC) que tiene el antígeno del pilo K99. Las causas virales comunes de la diarrea incluyen rotavirus y coronavirus. Otros agentes infecciosos incluyen *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* y salmonella, entre otros.

Los síntomas de la infección rotaviral incluyen la secreción de heces acuosas, deshidratación y debilidad. Los coronavirus producen una enfermedad más grave en los animales recién nacidos, y tiene una mayor tasa de mortalidad que la infección rotaviral. Frecuentemente, sin embargo, un animal joven puede infectarse con más de un virus o con una combinación de microorganismos virales y bacterianos de una vez. Esto aumenta espectacularmente la gravedad de la enfermedad.

Por consiguiente, existe la necesidad de moduladores de una actividad de transportadores de ABC, y composiciones de los mismos, que puedan usarse para modular la actividad del transportador de ABC en la membrana celular de un mamífero.

Existe la necesidad de métodos para tratar enfermedades mediadas por el transportador de ABC usando tales moduladores de la actividad de transportadores de ABC.

Existe la necesidad de métodos de modulación de una actividad de transportadores de ABC en una membrana

celular *ex vivo* de un mamífero.

Existe la necesidad de moduladores de la actividad de CFTR que puedan usarse para modular la actividad de CFTR en la membrana celular de un mamífero.

5 Existe la necesidad de métodos para tratar enfermedades mediadas por CFTR usando tales moduladores de la actividad de CFTR.

10 Existe la necesidad de métodos de modulación de la actividad de CFTR en una membrana celular *ex vivo* de un mamífero.

RESUMEN DE LA INVENCION

15 Ahora se ha encontrado que el compuesto 322 de la presente invención, compuestos adicionales descritos en el presente documento y composiciones farmacéuticamente aceptables de los mismos, son útiles como moduladores de la actividad de transportadores de ABC, particularmente actividad de CFTR. Estos compuestos son

20

25

30

35

40

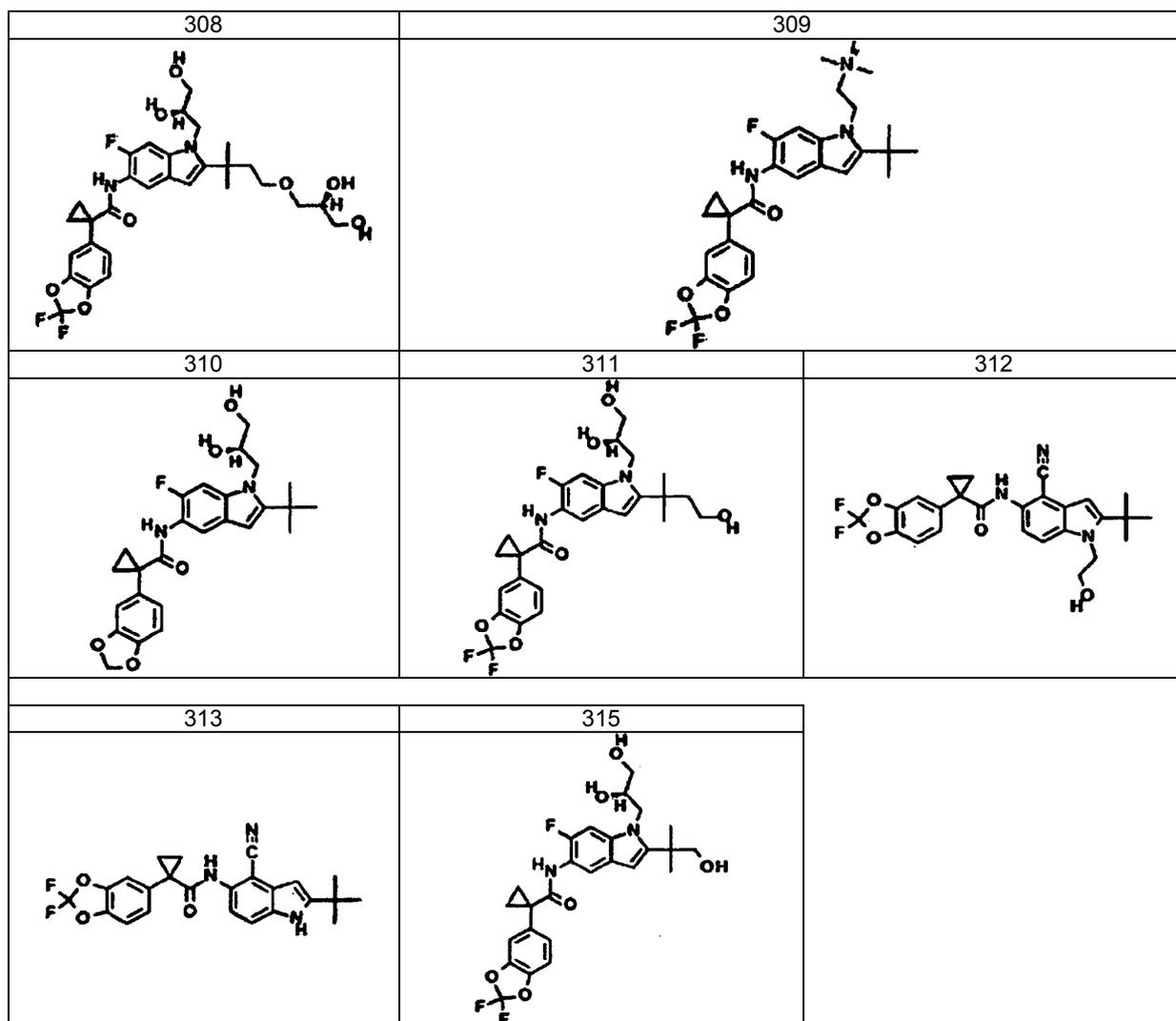
45

50

55

60

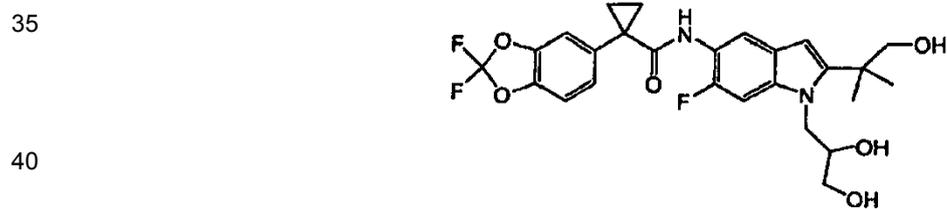
65



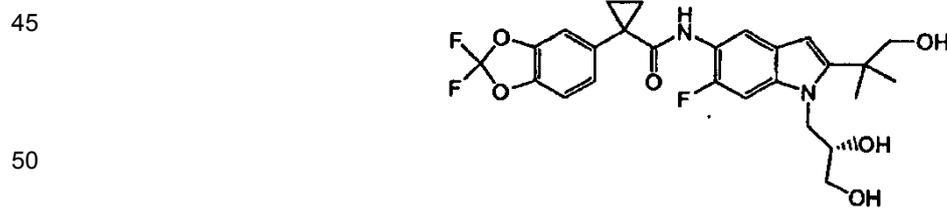
(continuación)

5 10 15	316	318	
20 25 30	320	y	322

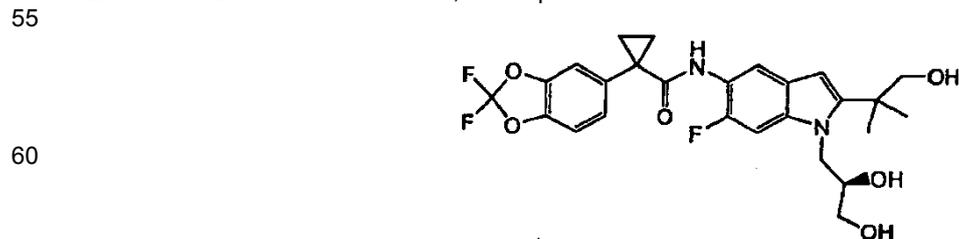
En algunas realizaciones descritas en el presente documento, el compuesto es



En otras realizaciones descritas en el presente documento, el compuesto es



En una realización de la invención, el compuesto es



65 Los compuestos y composiciones farmacéuticamente aceptables son útiles para tratar o reducir la gravedad de una variedad de enfermedades, trastornos o afecciones, que incluyen, pero no se limitan a, fibrosis quística, enfisema

hereditario, hemocromatosis hereditaria, deficiencias en la coagulación-fibrinólisis, tales como deficiencia de proteína C, angioedema hereditario tipo 1, deficiencias del procesamiento de lípidos, tales como hipercolesterolemia familiar, quilomicronemia tipo 1, abetalipoproteinemia, enfermedades de almacenamiento de lisosomas, tales como enfermedad de las células I/pseudo-Hurler, mucopolisacaridosis, Sandhof/Tay-Sachs, Crigler-Najjar tipo II, poliendocrinopatía/hiperinsulinemia, diabetes mellitus, enanismo de Laron, deficiencia de mieloperoxidasa, hipoparatiroidismo primario, melanoma, glicanosis CDG tipo 1, enfisema hereditario, hipertiroidismo congénito, osteogénesis imperfecta, hipofibrinogenemia hereditaria, deficiencia de ACT, diabetes insípida (DI), DI neurohipofisaria, DI nefrogénica, síndrome de Charcot-Marie-Tooth, enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher, enfermedades neurodegenerativas, tales como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, parálisis supranuclear progresiva, enfermedad de Pick, varios trastornos neurológicos de la poliglutamina, tales como Huntington, atrofia muscular espinal y bulbar, atrofia dentato-rubro-pálido-luisiana y distrofia miotónica, además de encefalopatías espongiiformes, tales como enfermedad hereditaria de Creutzfeldt-Jakob, enfermedad de Fabry, síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, EPOC, enfermedad del ojo seco y enfermedad de Sjögren.

Inesperadamente, los compuestos de la presente invención poseen propiedades terapéuticamente ventajosas.

### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

#### I. DEFINICIONES

Como se usa en el presente documento, deben aplicarse las siguientes definiciones, a menos que se indique lo contrario.

El término "transportador de ABC", como se usa en el presente documento, significa una proteína transportadora de ABC o un fragmento de la misma que comprende al menos un dominio de unión, en el que dicha proteína o fragmento de la misma está presente *in vivo* o *in vitro*. El término "dominio de unión", como se usa en el presente documento, significa un dominio sobre el transportador de ABC que puede unirse a un modulador. Véase, por ejemplo, Hwang, T. C. y col., J. Gen. Physiol. (1998): 111(3), 477-90.

El término "CFTR", como se usa en el presente documento, significa regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística o una mutación del mismo que es capaz de regular la actividad, que incluye, pero no se limita a,  $\Delta F508$ -CFTR y G551D-CFTR (véase, por ejemplo, <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>, para mutaciones CFTR).

El término "modular", como se usa en el presente documento, significa aumentar o disminuir, por ejemplo, la actividad, una cantidad medible. Los compuestos que modulan la actividad de transportadores de ABC, tal como la actividad de CFTR, aumentando la actividad del transportador de ABC, por ejemplo, un canal de aniones de CFTR, se llaman agonistas. Los compuestos que modulan la actividad de transportadores de ABC, tal como la actividad de CFTR, disminuyendo la actividad del transportador de ABC, por ejemplo, un canal de aniones de CFTR, se llaman antagonistas. Un agonista interacciona con un transportador de ABC, tal como el canal de aniones de CFTR, para aumentar la capacidad del receptor para transducir una señal intracelular en respuesta a la unión al ligando endógeno. Un antagonista interacciona con un transportador de ABC, tal como CFTR, y compite con el (los) ligando(s) endógeno(s) o sustrato(s) por el (los) sitio(s) de unión sobre el receptor para reducir la capacidad del receptor para transducir una señal intracelular en respuesta a la unión al ligando endógeno.

El término "tratar o reducir la gravedad de una enfermedad mediada por transportadores de ABC" se refiere tanto a tratamientos para enfermedades que se producen directamente por actividades de los transportadores de ABC y/o de CFTR como al alivio de síntomas de enfermedades no directamente producidas por actividades de los transportadores de ABC y/o del canal de aniones de CFTR. Ejemplos de enfermedades cuyos síntomas pueden afectarse por la actividad del transportador de ABC y/o de CFTR incluyen, pero no se limitan a, fibrosis quística, enfisema hereditario, hemocromatosis hereditaria, deficiencias en la coagulación-fibrinólisis, tales como deficiencia de proteína C, angioedema hereditario tipo 1, deficiencias del procesamiento de lípidos, tales como hipercolesterolemia familiar, quilomicronemia tipo 1, abetalipoproteinemia, enfermedades de almacenamiento de lisosomas, tales como enfermedad de las células I/pseudo-Hurler, mucopolisacaridosis, Sandhof/Tay-Sachs, Crigler-Najjar tipo II, poliendocrinopatía/hiperinsulinemia, diabetes mellitus, enanismo de Laron, deficiencia de mieloperoxidasa, hipoparatiroidismo primario, melanoma, glicanosis CDG tipo 1, enfisema hereditario, hipertiroidismo congénito, osteogénesis imperfecta, hipofibrinogenemia hereditaria, deficiencia de ACT, diabetes insípida (DI), DI neurohipofisaria, DI nefrogénica, síndrome de Charcot-Marie-Tooth, enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher, enfermedades neurodegenerativas tales como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, parálisis supranuclear progresiva, enfermedad de Pick, varios trastornos neurológicos de la poliglutamina, tales como Huntington, ataxia espinocerebelosa tipo I, atrofia muscular espinal y bulbar, atrofia dentato-rubro-pálido-luisiana y distrofia miotónica, además de encefalopatías espongiiformes, tales como enfermedad hereditaria de Creutzfeldt-Jakob, enfermedad de Fabry, síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, EPOC, enfermedad del ojo seco y enfermedad de Sjögren.

Para los fines de la presente invención, los elementos químicos se identifican según la tabla periódica de los

elementos, versión CAS, Handbook of Chemistry and Physics, 75ª ed. Adicionalmente, los principios generales de la química orgánica se describen en "Organic Chemistry", Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito: 1999, y "March's Advanced Organic Chemistry", 5ª ed., Ed.: Smith, M.B. y March, J., John Wiley & Sons, Nueva York: 2001, cuyos contenidos enteros se incorporan por este documento por referencia.

5 Como se describe en el presente documento, los compuestos de la invención pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes, tal como se ilustra generalmente anteriormente, o como se ejemplifica por clases particulares, subclases y especies de la invención.

10 Como se usa en el presente documento, el término "alifático" engloba los términos alquilo, alqueno, alquino, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido, como se expone a continuación.

Como se usa en el presente documento, un grupo "alquilo" se refiere a un grupo de hidrocarburo alifático saturado que contiene 1-12 (por ejemplo, 1-8, 1-6 ó 1-4) átomos de carbono. Un grupo alquilo puede ser lineal o ramificado. Ejemplos de grupos alquilo incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, *tert*-butilo, n-pentilo, n-heptilo o 2-etilhexilo. Un grupo alquilo puede estar sustituido (es decir, opcionalmente sustituido) con uno o más sustituyentes tales como halógeno, fosfo, cicloalifático [por ejemplo, cicloalquilo o cicloalqueno], heterocicloalifático [por ejemplo, heterocicloalquilo o heterocicloalqueno], arilo, heteroarilo, alcoxi, aroilo, heteroarilo, acilo [por ejemplo, (alifático)carbonilo, (cicloalifático)carbonilo o (heterocicloalifático)carbonilo], nitro, ciano, amido [por ejemplo, (cicloalquilalquil)carbonilamino, arilcarbonilamino, aralquilcarbonilamino, (heterocicloalquil)carbonilamino, (heterocicloalquilalquil)carbonilamino, heteroarilcarbonilamino, heteroaralquilcarbonilamino, alquilaminocarbonilo, cicloalquilaminocarbonilo, heterocicloalquilaminocarbonilo, arilaminocarbonilo o heteroarilaminocarbonilo], amino [por ejemplo, alifático-amino, cicloalifático-amino o heterocicloalifático-amino], sulfonilo [por ejemplo, alifático-SO<sub>2</sub>-], sulfino, sulfano, sulfoxi, urea, tiourea, sulfamoilo, sulfamida, oxo, carboxi, carbamoilo, cicloalifaticoxi, heterocicloalifaticoxi, ariloxi, heteroariloxi, aralquilo, heteroarilalcoxi, alcoxycarbonilo, alquilcarboniloxi o hidroxilo. Sin limitación, algunos ejemplos de alquilos sustituidos incluyen carboxialquilo (tal como HOOC-alquilo, alcoxycarbonilalquilo y alquilcarbonilalquilo), cianoalquilo, hidroxialquilo, alcoxialquilo, acialquilo, aralquilo, (alcoxiaril)alquilo, (sulfonilamino)alquilo (tal como (alquil-SO<sub>2</sub>-amino)alquilo), aminoalquilo, amidoalquilo, (cicloalifático)alquilo o haloalquilo.

Como se usa en el presente documento, un grupo "alqueno" se refiere a un grupo de carbono alifático que contiene 2-8 (por ejemplo, 2-12, 2-6 ó 2-4) átomos de carbono y al menos un doble enlace. Al igual que un grupo alquilo, un grupo alqueno puede ser lineal o ramificado. Ejemplos de un grupo alqueno incluyen, pero no se limitan a, alilo, isoprenilo, 2-butenilo y 2-hexenilo. Un grupo alqueno puede estar opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes tales como halógeno, fosfo, cicloalifático [por ejemplo, cicloalquilo o cicloalqueno], heterocicloalifático [por ejemplo, heterocicloalquilo o heterocicloalqueno], arilo, heteroarilo, alcoxi, aroilo, heteroarilo, acilo [por ejemplo, (alifático)carbonilo, (cicloalifático)carbonilo, o (heterocicloalifático)carbonilo], nitro, ciano, amido [por ejemplo, (cicloalquilalquil)carbonilamino, arilcarbonilamino, aralquilcarbonilamino, (heterocicloalquil)carbonilamino, (heterocicloalquilalquil)carbonilamino, heteroarilcarbonilamino, heteroaralquilcarbonilamino, alquilaminocarbonilo, cicloalquilaminocarbonilo, heterocicloalquilaminocarbonilo, arilaminocarbonilo o heteroarilaminocarbonilo], amino [por ejemplo, alifático-amino, cicloalifático-amino, heterocicloalifático-amino o alifático-sulfonilamino], sulfonilo [por ejemplo, alquil-SO<sub>2</sub>-, cicloalifático-SO<sub>2</sub>- o aril-SO<sub>2</sub>-], sulfino, sulfano, sulfoxi, urea, tiourea, sulfamoilo, sulfamida, oxo, carboxi, carbamoilo, cicloalifaticoxi, heterocicloalifaticoxi, ariloxi, heteroariloxi, aralquilo, heteroarilalcoxi, alcoxycarbonilo, alquilcarboniloxi o hidroxilo. Sin limitación, algunos ejemplos de alquenos sustituidos incluyen cianoalqueno, alcoxialqueno, acialqueno, hidroxialqueno, aralqueno, (alcoxiaril)alqueno, (sulfonilamino)alqueno (tal como (alquil-SO<sub>2</sub>-amino)alqueno), aminoalqueno, amidoalqueno, (cicloalifático)alqueno o haloalqueno.

Como se usa en el presente documento, un grupo "alquino" se refiere a un grupo de carbono alifático que contiene 2-8 (por ejemplo, 2-12, 2-6 ó 2-4) átomos de carbono y tiene al menos un triple enlace. Un grupo alquino puede ser lineal o ramificado. Ejemplos de un grupo alquino incluyen, pero no se limitan a, propargilo y butinilo. Un grupo alquino puede estar opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes tales como aroilo, heteroarilo, alcoxi, cicloalquilo, heterocicloalquilo, ariloxi, heteroariloxi, aralquilo, nitro, carboxi, ciano, halógeno, hidroxilo, sulfo, mercapto, sulfano [por ejemplo, alifático-sulfano o cicloalifático-sulfano], sulfino [por ejemplo, alifático-sulfino o cicloalifático-sulfino], sulfonilo [por ejemplo, alifático-SO<sub>2</sub>-, alifático-amino-SO<sub>2</sub>- o cicloalifático-SO<sub>2</sub>-], amido [por ejemplo, aminocarbonilo, alquilaminocarbonilo, alquilcarbonilamino, cicloalquilaminocarbonilo, heterocicloalquilaminocarbonilo, cicloalquilcarbonilamino, arilaminocarbonilo, arilcarbonilamino, aralquilcarbonilamino, (heterocicloalquil)carbonilamino, (cicloalquilalquil)carbonilamino, heteroaralquilcarbonilamino, heteroarilcarbonilamino o heteroarilaminocarbonilo], urea, tiourea, sulfamoilo, sulfamida, alcoxycarbonilo, alquilcarboniloxi, cicloalifático, heterocicloalifático, arilo, heteroarilo, acilo [por ejemplo, (cicloalifático)carbonilo o (heterocicloalifático)carbonilo], amino [por ejemplo, alifático-amino], sulfoxi, oxo, carboxi, carbamoilo, (cicloalifático)oxi, (heterocicloalifático)oxi o (heteroaril)alcoxi.

Como se usa en el presente documento, un "amido" engloba tanto "aminocarbonilo" como "carbonilamino". Estos términos, cuando se usan solos o a propósito de otro grupo, se refieren a un grupo amido tal como -N(R<sup>X</sup>)-C(O)-R<sup>Y</sup> o -C(O)-N(R<sup>X</sup>)<sub>2</sub>, cuando se usan terminalmente, y -C(O)-N(R<sup>X</sup>)- o -N(R<sup>X</sup>)-C(O)- cuando se usan internamente, en los

que R<sup>X</sup> y R<sup>Y</sup> se definen más adelante. Ejemplos de grupos amido incluyen alquilamido (tal como alquilcarbonilamino o alquilaminocarbonilo), (heterocicloalifático)amido, (heteroaralquil)amido, (heteroaril)amido, (heterocicloalquil)alquilamido, arilamido, aralquilamido, (cicloalquil)alquilamido o cicloalquilamido.

5 Como se usa en el presente documento, un grupo “amino” se refiere a -NR<sup>X</sup>R<sup>Y</sup> en el que cada uno de R<sup>X</sup> y R<sup>Y</sup> es independientemente hidrógeno, alifático, cicloalifático, (cicloalifático)alifático, arilo, aralifático, heterocicloalifático, (heterocicloalifático)alifático, heteroarilo, carboxi, sulfanilo, sulfonilo, (alifático)carbonilo, (cicloalifático)carbonilo, ((cicloalifático)alifático)carbonilo, arilcarbonilo, (aralifático)carbonilo, (heterocicloalifático)carbonilo, ((heterocicloalifático)alifático)carbonilo, (heteroaril)carbonilo o (heteroaralifático)carbonilo, definiéndose cada uno de los cuales en el presente documento y estando opcionalmente sustituidos. Ejemplos de grupos amino incluyen alquilamino, dialquilamino o arilamino. Si el término “amino” no es el grupo terminal (por ejemplo, alquilcarbonilamino), se representa por -NR<sup>X</sup>-. R<sup>X</sup> tiene el mismo significado que se ha definido anteriormente.

15 Como se usa en el presente documento, un grupo “arilo” usado solo o como parte de un resto mayor como en “aralquilo”, “aralcoxi” o “ariloxialquilo” se refiere a sistemas de anillos monocíclicos (por ejemplo, fenilo); bicíclicos (por ejemplo, indenilo, naftalenilo, tetrahidronaftilo, tetrahidroindenilo); y tricíclico (por ejemplo, fluorenilo, tetrahidrofluorenilo o tetrahidroantraceno, antraceno) en los que el sistema de anillos monocíclicos es aromático o al menos uno de los anillos en un sistema de anillos bicíclicos o tricíclicos es aromático. Los grupos bicíclicos y tricíclicos incluyen anillos carbocíclicos de 2-3 miembros benzocondensados. Por ejemplo, un grupo benzocondensado incluye fenilo condensado con dos o más restos carbocíclicos C<sub>4-8</sub>. Un arilo está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes que incluyen alifático [por ejemplo, alquilo, alquenilo o alquinilo]; cicloalifático; (cicloalifático)alifático; heterocicloalifático; (heterocicloalifático)alifático; arilo; heteroarilo; alcoxi; (cicloalifático)oxi; (heterocicloalifático)oxi; ariloxi; heteroariloxi; (aralifático)oxi; (heteroaralifático)oxi; aroilo; heteroaroiilo; amino; oxo (sobre un anillo carbocíclico no aromático de un arilo bicíclico o tricíclico benzocondensado); nitro; carboxi; amido; acilo [por ejemplo, (alifático)carbonilo; (cicloalifático)carbonilo; ((cicloalifático)alifático)carbonilo; (aralifático)carbonilo; (heterocicloalifático)carbonilo; ((heterocicloalifático)alifático)carbonilo; o (heteroaralifático)carbonilo]; sulfonilo [por ejemplo, alifático-SO<sub>2</sub>- o amino-SO<sub>2</sub>-]; sulfanilo [por ejemplo, alifático-S-]; ciano; halo; hidroxilo; mercapto; sulfoxi; urea; tiourea; sulfamoilo; sulfamida; o carbamoilo. Alternativamente, un arilo puede estar sin sustituir.

Ejemplos no limitantes de arilos sustituidos incluyen haloarilo [por ejemplo, mono-, di (tal como *p,m*-dihaloarilo) y (trihalo)arilo]; (carboxi)arilo [por ejemplo, (alcoxicarbonil)arilo, ((aralquil)carboniloxi)arilo y (alcoxicarbonil)arilo]; (amido)arilo [por ejemplo, (aminocarbonil)arilo, (((alquilanino)alquil)aminocarbonil)arilo, (alquilcarbonil)aminoarilo, (arilaminocarbonil)arilo y (((heteroaril)amino)carbonil)arilo]; aminoarilo [por ejemplo, ((alquilsulfonil)amino)arilo o ((dialquil)amino)arilo]; (cianoalquil)arilo; (alcoxi)arilo; (sulfamoil)arilo [por ejemplo, (aminosulfonil)arilo]; (alquilsulfonil)arilo; (ciano)arilo; (hidroxialquil)arilo; ((alcoxi)alquil)arilo; (hidroxil)arilo, ((carboxi)alquil)arilo; (((dialquil)amino)alquil)arilo; (nitroalquil)arilo; (((alquilsulfonil)amino)alquil)arilo; ((heterocicloalifático)carbonil)arilo; ((alquilsulfonil)alquil)arilo; (cianoalquil)arilo; (hidroxialquil)arilo; (alquilcarbonil)arilo; alquilarilo; (trihaloalquil)arilo; *p*-amino-*m*-alcoxicarbonilarilo; *p*-amino-*m*-cianoarilo; *p*-halo-*m*-aminoarilo; o (*m*-(heterocicloalifático)-*o*-(alquil))arilo.

Como se usa en el presente documento, un “aralifático” tal como un grupo “aralquilo” se refiere a un grupo alifático (por ejemplo, un grupo alquilo C<sub>1-4</sub>) que está sustituido con un grupo arilo. “Alifático”, “alquilo” y “arilo” se definen en el presente documento. Un ejemplo de un aralifático tal como un grupo aralquilo es bencilo.

45 Como se usa en el presente documento, un grupo “aralquilo” se refiere a un grupo alquilo (por ejemplo, un grupo alquilo C<sub>1-4</sub>) que está sustituido con un grupo arilo. Tanto “alquilo” como “arilo” se han definido anteriormente. Un ejemplo de un grupo aralquilo es bencilo. Un aralquilo está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes tales como alifático [por ejemplo, alquilo, alquenilo o alquinilo, que incluyen carboxialquilo, hidroxialquilo o haloalquilo tal como trifluorometilo], cicloalifático [por ejemplo, cicloalquilo o cicloalquenilo], (cicloalquil)alquilo, heterocicloalquilo, (heterocicloalquil)alquilo, arilo, heteroarilo, alcoxi, cicloalquiloxi, heterocicloalquiloxi, ariloxi, heteroariloxi, aralquiloxi, heteroaralquiloxi, aroilo, heteroaroiilo, nitro, carboxi, alcoxicarbonilo, alquilcarboniloxi, amido [por ejemplo, aminocarbonilo, alquilcarbonilamino, cicloalquilcarbonilamino, (cicloalquilalquil)carbonilamino, arilcarbonilamino, aralquilcarbonilamino, (heterocicloalquil)carbonilamino, (heterocicloalquilalquil)carbonilamino, heteroarilcarbonilamino o heteroaralquilcarbonilamino], ciano, halógeno, hidroxilo, acilo, mercapto, alquilsulfanilo, sulfoxi, urea, tiourea, sulfamoilo, sulfamida, oxo o carbamoilo.

Como se usa en el presente documento, un “sistema de anillos bicíclicos” incluye estructuras de 8-12 (por ejemplo, 9, 10 u 11) miembros que forman dos anillos, en las que los dos anillos tienen al menos un átomo en común (por ejemplo, 2 átomos en común). Sistemas de anillos bicíclicos incluyen bicicloalifáticos (por ejemplo, bicicloalquilo o bicicloalquenilo), bicicloheteroalifáticos, arilos bicíclicos y heteroarilos bicíclicos.

Como se usa en el presente documento, un grupo “carbociclo” o “cicloalifático” engloba un grupo “cicloalquilo” y un grupo “cicloalquenilo”, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido como se expone más adelante.

65 Como se usa en el presente documento, un grupo “cicloalquilo” se refiere a un anillo mono- o bicíclico carbocíclico

saturado (condensado o unido por puentes) de 3-10 (por ejemplo, 5-10) átomos de carbono. Ejemplos de grupos cicloalquilo incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, adamantilo, norbornilo, cubilo, octahidro-indenilo, decahidro-naftilo, biciclo[3.2.1]octilo, biciclo[2.2.2]octilo, biciclo[3.3.1]nonilo, biciclo[3.3.2]decilo, biciclo[2.2.2]octilo, adamantilo o ((aminocarbonil)cicloalquil)cicloalquilo.

Un grupo "cicloalqueno", como se usa en el presente documento, se refiere a un anillo carbocíclico no aromático de 3-10 (por ejemplo, 4-8) átomos de carbono que tiene uno o más dobles enlaces. Ejemplos de grupos cicloalqueno incluyen ciclopentenilo, 1,4-ciclohexadienilo, cicloheptenilo, ciclooctenilo, hexahidro-indenilo, octahidro-naftilo, ciclohexenilo, ciclopentenilo, biciclo[2.2.2]octenilo o biciclo[3.3.1]nonenilo.

Un grupo cicloalquilo o cicloalqueno puede estar opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes tales como fósforo, alifático [por ejemplo, alquilo, alqueno o alquino], cicloalifático, (cicloalifático)alifático, heterocicloalifático, (heterocicloalifático)alifático, arilo, heteroarilo, alcoxi, (cicloalifático)oxi, (heterocicloalifático)oxi, ariloxi, heteroariloxi, (aralifático)oxi, (heteroaralifático)oxi, aroilo, heteroarilo, amino, amido [por ejemplo, (alifático)carbonilamino, (cicloalifático)carbonilamino, ((cicloalifático)alifático)carbonilamino, (aril)carbonilamino, (aralifático)carbonilamino, (heterocicloalifático)carbonilamino, ((heterocicloalifático)alifático)carbonilamino, (heteroaril)carbonilamino o (heteroaralifático)carbonilamino], nitro, carboxi [por ejemplo, HOOC-, alcoxicarbonilo o alquilcarboniloxi], acilo [por ejemplo, (cicloalifático)carbonilo, ((cicloalifático)alifático)carbonilo, (aralifático)carbonilo, (heterocicloalifático)carbonilo, ((heterocicloalifático)alifático)carbonilo o (heteroaralifático)carbonilo], ciano, halógeno, hidroxilo, mercapto, sulfonilo [por ejemplo, alquil-SO<sub>2</sub>- y aril-SO<sub>2</sub>-], sulfonilo [por ejemplo, alquil-S(O)-], sulfanilo [por ejemplo, alquil-S-], sulfoxi, urea, tiourea, sulfamilo, sulfamida, oxo o carbamilo.

Como se usa en el presente documento, el término "heterociclo" o "heterocicloalifático" engloba un grupo heterocicloalquilo y un grupo heterocicloalqueno, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido como se expone más adelante.

Como se usa en el presente documento, un grupo "heterocicloalquilo" se refiere a una estructura de anillos de 3-10 miembros mono- o bicíclicos (condensados o unidos por puentes) saturados (por ejemplo, mono- o bicíclicos de 5 a 10 miembros), en la que uno o más de los átomos de anillo es un heteroátomo (por ejemplo, N, O, S, o combinaciones de los mismos). Ejemplos de un grupo heterocicloalquilo incluyen piperidilo, piperazilo, tetrahidropirano, tetrahidrofurilo, 1,4-dioxolano, 1,4-ditiano, 1,3-dioxolano, oxazolidilo, isoxazolidilo, morfolinilo, tiomorfolinilo, octahidrobenzofurilo, octahidrocromenilo, octahidrotiocromenilo, octahidroindolilo, octahidropiridinilo, decahidroquinolinilo, octahidrobenczo[b]tiofenilo, 2-oxa-biciclo[2.2.2]octilo, 1-aza-biciclo[2.2.2]octilo, 3-aza-biciclo[3.2.1]octilo y 2,6-dioxa-triciclo[3.3.1.0<sup>3,7</sup>]nonilo. Un grupo heterocicloalquilo monocíclico puede condensarse con un resto fenilo para formar estructuras, tales como tetrahidroisoquinolina, que se clasificarían como heteroarilos.

Un grupo "heterocicloalqueno", como se usa en el presente documento, se refiere a una estructura de anillos no aromáticos mono- o bicíclicos (por ejemplo, mono- o bicíclicos de 5 a 10 miembros) que tiene uno o más dobles enlaces, y en el que uno o más de los átomos de anillo es un heteroátomo (por ejemplo, N, O o S). Los heterocicloalifáticos monocíclicos y bicíclicos se numeran según la nomenclatura química estándar.

Un grupo heterocicloalquilo o heterocicloalqueno puede estar opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes tales como fósforo, alifático [por ejemplo, alquilo, alqueno o alquino], cicloalifático, (cicloalifático)alifático, heterocicloalifático, (heterocicloalifático)alifático, arilo, heteroarilo, alcoxi, (cicloalifático)oxi, (heterocicloalifático)oxi, ariloxi, heteroariloxi, (aralifático)oxi, (heteroaralifático)oxi, aroilo, heteroarilo, amino, amido [por ejemplo, (alifático)carbonilamino, (cicloalifático)carbonilamino, ((cicloalifático)alifático)carbonilamino, (aril)carbonilamino, (aralifático)carbonilamino, (heterocicloalifático)carbonilamino, ((heterocicloalifático)alifático)carbonilamino, (heteroaril)carbonilamino o (heteroaralifático)carbonilamino], nitro, carboxi [por ejemplo, HOOC-, alcoxicarbonilo o alquilcarboniloxi], acilo [por ejemplo, (cicloalifático)carbonilo, ((cicloalifático)alifático)carbonilo, (aralifático)carbonilo, (heterocicloalifático)carbonilo, ((heterocicloalifático)alifático)carbonilo o (heteroaralifático)carbonilo], nitro, ciano, halógeno, hidroxilo, mercapto, sulfonilo [por ejemplo, alquilsulfonilo o arilsulfonilo], sulfonilo [por ejemplo, alquilsulfonilo], sulfanilo [por ejemplo, alquilsulfanilo], sulfoxi, urea, tiourea, sulfamilo, sulfamida, oxo o carbamilo.

Un grupo "heteroarilo", como se usa en el presente documento, se refiere a un sistema de anillos monocíclicos, bicíclicos o tricíclicos que tiene 4 a 15 átomos de anillo en el que uno o más de los átomos de anillo es un heteroátomo (por ejemplo, N, O, S, o combinaciones de los mismos) y en el que el sistema de anillos monocíclicos es aromático o al menos uno de los anillos en los sistemas de anillos bicíclicos o tricíclicos es aromático. Un grupo heteroarilo incluye un sistema de anillos benzocondensados que tiene 2 a 3 anillos. Por ejemplo, un grupo benzocondensado incluye benzocondensados con uno o dos restos heterocicloalifáticos de 4 a 8 miembros (por ejemplo, indolizilo, indolilo, isoindolilo, 3H-indolilo, indolinilo, benzo[b]furilo, benzo[b]tiofenilo, quinolinilo o isoquinolinilo). Algunos ejemplos de heteroarilo son azetidilo, piridilo, 1H-indazolilo, furilo, pirrolilo, tienilo, tiazolilo, oxazolilo, imidazolilo, tetrazolilo, benzofurilo, isoquinolinilo, benzotiazolilo, xanteno, tioxanteno, fenotiazina, dihidroindol, benzo[1,3]dioxol, benzo[b]furilo, benzo[b]tiofenilo, indazolilo, bencimidazolilo, benzotiazolilo, purilo, cinolilo, quinolilo, quinazolilo, cinolilo, ftalazilo, quinazolilo, quinoxalilo, isoquinolilo, 4H-quinolizilo, benzo-1,2,5-tiadiazolilo o 1,8-naftiridilo.

Sin limitación, heteroarilos monocíclicos incluyen furilo, tiofenilo, 2H-pirrolilo, pirrolilo, oxazolilo, tiazolilo, imidazolilo, pirazolilo, isoxazolilo, isotiazolilo, 1,3,4-tiadiazolilo, 2H-pirano, 4-H-pirano, piridilo, piridazilo, pirimidilo, pirazolilo, pirazilo o 1,3,5-triazilo. Los heteroarilos monocíclicos se numeran según la nomenclatura química estándar.

5 Sin limitación, heteroarilos bicíclicos incluyen indolizilo, indolilo, isoindolilo, 3H-indolilo, indolinilo, benzo[*b*]furilo, benzo[*b*]tiofenilo, quinolinilo, isoquinolinilo, indolizino, isoindolilo, indolilo, benzo[*b*]furilo, benzo[*b*]tiofenilo, indazolilo, bencimidazilo, benzotiazolilo, purinilo, 4H-quinolizilo, quinolilo, isoquinolilo, cinolilo, ftalazilo, quinazolilo, quinoxalilo, 1,8-naftiridilo o pteridilo. Los heteroarilos bicíclicos se numeran según la nomenclatura química estándar.

10 Un heteroarilo está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes tales como alifático [por ejemplo, alquilo, alqueno o alquino]; cicloalifático; (cicloalifático)alifático; heterocicloalifático; (heterocicloalifático)alifático; arilo; heteroarilo; alcoxi; (cicloalifático)oxi; (heterocicloalifático)oxi; ariloxi; heteroariloxi; (aralifático)oxi; (heteroaralifático)oxi; aroilo; heteroarilo; amino; oxo (sobre un anillo carbocíclico o heterocíclico no aromático de un heteroarilo bicíclico o tricíclico); carboxi; amido; acilo [por ejemplo, alifático-carbonilo; (cicloalifático)carbonilo; ((cicloalifático)alifático)carbonilo; (aralifático)carbonilo; (heterocicloalifático)carbonilo; ((heterocicloalifático)alifático)carbonilo; o (heteroaralifático)carbonilo]; sulfonilo [por ejemplo, alifático-sulfonilo o aminosulfonilo]; sulfino [por ejemplo, alifático-sulfino]; sulfano [por ejemplo, alifático-sulfano]; nitro; ciano; halógeno; hidroxilo; mercapto; sulfoxi; urea; tiourea; sulfamilo; sulfamida; o carbamilo. Alternativamente, un heteroarilo puede estar sin sustituir.

20 Ejemplos no limitantes de heteroarilos sustituidos incluyen (halo)heteroarilo [por ejemplo, mono- y di-(halo)heteroarilo]; (carboxi)heteroarilo [por ejemplo, (alcoxicarbonil)heteroarilo]; cianoheteroarilo; aminoheteroarilo [por ejemplo, ((alquilsulfonil)amino)heteroarilo y ((dialquil)amino)heteroarilo]; (amido)heteroarilo [por ejemplo, aminocarbonilheteroarilo, ((alquilcarbonil)amino)heteroarilo, (((alquil)amino)alquil)aminocarbonil)heteroarilo, (((heteroaril)amino)carbonil)heteroarilo, ((heterocicloalifático)carbonil)heteroarilo y ((alquilcarbonil)amino)heteroarilo]; (cianoalquil)heteroarilo; (alcoxi)heteroarilo; (sulfamilo)heteroarilo [por ejemplo, (aminosulfonil)heteroarilo]; (sulfonil)heteroarilo [por ejemplo, (alquilsulfonil)heteroarilo]; (hidroxialquil)heteroarilo; (alcoxialquil)heteroarilo; (hidroxilo)heteroarilo; ((carboxi)alquil)heteroarilo; (((dialquil)amino)alquil)heteroarilo; (heterocicloalifático)heteroarilo; (cicloalifático)heteroarilo; (nitroalquil)heteroarilo; (((alquilsulfonil)amino)alquil)heteroarilo; ((alquilsulfonil)alquil)heteroarilo; (cianoalquil)heteroarilo; (acil)heteroarilo [por ejemplo, (alquilcarbonil)heteroarilo]; (alquil)heteroarilo y (haloalquil)heteroarilo [por ejemplo, trihaloalquilheteroarilo].

35 Un "heteroaralifático" (tal como un grupo heteroaralquilo), como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo alifático (por ejemplo, un grupo alquilo C<sub>1-4</sub>) que está sustituido con un grupo heteroarilo. "Alifático", "alquilo" y "heteroarilo" se han definido anteriormente.

40 Un grupo "heteroaralquilo", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo alquilo (por ejemplo, un grupo alquilo C<sub>1-4</sub>) que está sustituido con un grupo heteroarilo. Tanto "alquilo" como "heteroarilo" se han definido anteriormente. Un heteroaralquilo está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes tales como alquilo (incluyendo carboxialquilo, hidroxialquilo y haloalquilo tal como trifluorometilo), alqueno, alquino, cicloalquilo, (cicloalquil)alquilo, heterocicloalquilo, (heterocicloalquil)alquilo, arilo, heteroarilo, alcoxi, cicloalquiloxi, heterocicloalquiloxi, ariloxi, heteroariloxi, aralquiloxi, heteroaralquiloxi, aroilo, heteroarilo, nitro, carboxi, alcoxycarbonilo, alquilcarboniloxi, aminocarbonilo, alquilcarbonilamino, cicloalquilcarbonilamino, (cicloalquilalquil)carbonilamino, arilcarbonilamino, aralquilcarbonilamino, (heterocicloalquil)carbonilamino, (heterocicloalquilalquil)carbonilamino, heteroarilcarbonilamino, heteroaralquilcarbonilamino, ciano, halógeno, hidroxilo, acilo, mercapto, alquilsulfano, sulfoxi, urea, tiourea, sulfamilo, sulfamida, oxo o carbamilo.

50 Como se usa en el presente documento, "resto cíclico" y "grupo cíclico" se refieren a sistemas de anillos mono-, bi- y tri-cíclicos que incluyen cicloalifático, heterocicloalifático, arilo o heteroarilo, cada uno de los cuales se ha definido previamente.

55 Como se usa en el presente documento, un "sistema de anillos bicíclicos con puentes" se refiere a un sistema de anillos alifáticos heterocíclicos bicíclicos o sistema de anillos cicloalifáticos bicíclicos en el que los anillos están unidos con puentes. Ejemplos de sistemas de anillos bicíclicos unidos con puentes incluyen, pero no se limitan a, adamantano, norbornano, biciclo[3.2.1]octilo, biciclo[2.2.2]octilo, biciclo[3.3.1]nonilo, biciclo[3.2.3]nonilo, 2-oxabicyclo[2.2.2]octilo, 1-azabicyclo[2.2.2]octilo, 3-azabicyclo[3.2.1]octilo y 2,6-dioxa-triciclo[3.3.1.0<sup>3,7</sup>]nonilo. Un sistema de anillos bicíclicos unidos con puentes puede estar opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes tales como alquilo (incluyendo carboxialquilo, hidroxialquilo y haloalquilo tal como trifluorometilo), alqueno, alquino, cicloalquilo, (cicloalquil)alquilo, heterocicloalquilo, (heterocicloalquil)alquilo, arilo, heteroarilo, alcoxi, cicloalquiloxi, heterocicloalquiloxi, ariloxi, heteroariloxi, aralquiloxi, heteroaralquiloxi, aroilo, heteroarilo, nitro, carboxi, alcoxycarbonilo, alquilcarboniloxi, aminocarbonilo, alquilcarbonilamino, cicloalquilcarbonilamino, (cicloalquilalquil)carbonilamino, arilcarbonilamino, aralquilcarbonilamino, (heterocicloalquil)carbonilamino, (heterocicloalquilalquil)carbonilamino, heteroarilcarbonilamino, heteroaralquilcarbonilamino, ciano, halógeno, hidroxilo, acilo, mercapto, alquilsulfano, sulfoxi, urea, tiourea, sulfamilo, sulfamida, oxo o carbamilo.

65 Como se usa en el presente documento, un grupo "acilo" se refiere a un grupo formilo o R<sup>X</sup>-C(O)- (tal como alquil-

C(O)-, también denominado “alquilcarbonilo”) en el que R<sup>X</sup> y “alquilo” se han definido previamente. Acetilo y pivaloilo son ejemplos de grupos acilo.

5 Como se usa en el presente documento, un “arilo” o “heteroarilo” se refiere a un aril-C(O)- o un heteroaril-C(O)-. La porción de arilo y heteroarilo del arilo o heteroarilo está opcionalmente sustituida como se ha definido previamente.

10 Como se usa en el presente documento, un grupo “alcoxi” se refiere a un grupo alquil-O- en el que “alquilo” se ha definido previamente.

10 Como se usa en el presente documento, un grupo “carbamoilo” se refiere a un grupo que tiene la estructura -O-CO-NR<sup>X</sup>R<sup>Y</sup> o -NR<sup>X</sup>-CO-O-R<sup>Z</sup>, en las que R<sup>X</sup> y R<sup>Y</sup> se han definido anteriormente y R<sup>Z</sup> puede ser alifático, arilo, aralifático, heterocicloalifático, heteroarilo o heteroaralifático.

15 Como se usa en el presente documento, un grupo “carboxi” se refiere a -COOH, -COOR<sup>X</sup>, -OC(O)H, -OC(O)R<sup>X</sup>, cuando se usa como grupo terminal; o -OC(O)- o -C(O)O- cuando se usa como grupo interno.

20 Como se usa en el presente documento, un grupo “haloalifático” se refiere a un grupo alifático sustituido con 1-3 halógenos. Por ejemplo, el término haloalquilo incluye el grupo -CF<sub>3</sub>.

20 Como se usa en el presente documento, un grupo “mercapto” se refiere a -SH.

25 Como se usa en el presente documento, un grupo “sulfo” se refiere a -SO<sub>3</sub>H o -SO<sub>3</sub>R<sup>X</sup> cuando se usa terminalmente o -S(O)<sub>3</sub>- cuando se usa internamente.

25 Como se usa en el presente documento, un grupo “sulfamida” se refiere a la estructura -NR<sup>X</sup>-S(O)<sub>2</sub>-NR<sup>Y</sup>R<sup>Z</sup> cuando se usa terminalmente y -NR<sup>X</sup>-S(O)<sub>2</sub>-NR<sup>Y</sup>- cuando se usa internamente, en la que R<sup>X</sup>, R<sup>Y</sup> y R<sup>Z</sup> se han definido anteriormente.

30 Como se usa en el presente documento, un grupo “sulfonamida” se refiere a la estructura -S(O)<sub>2</sub>-NR<sup>X</sup>R<sup>Y</sup> o -NR<sup>X</sup>-S(O)<sub>2</sub>-R<sup>Z</sup> cuando se usa terminalmente; o -S(O)<sub>2</sub>-NR<sup>X</sup>- o -NR<sup>X</sup>-S(O)<sub>2</sub>- cuando se usa internamente, en las que R<sup>X</sup>, R<sup>Y</sup> y R<sup>Z</sup> se han definido anteriormente.

35 Como se usa en el presente documento, un grupo “sulfanilo” se refiere a -S-R<sup>X</sup> cuando se usa terminalmente y -S- cuando se usa internamente, en la que R<sup>X</sup> se ha definido anteriormente. Ejemplos de sulfanilos incluyen alifático-S-, cicloalifático-S-, aril-S-, o similares.

40 Como se usa en el presente documento, un grupo “sulfino” se refiere a -S(O)-R<sup>X</sup> cuando se usa terminalmente y -S(O)- cuando se usa internamente, en la que R<sup>X</sup> se ha definido anteriormente. Grupos sulfino a modo de ejemplo incluyen alifático-S(O)-, aril-S(O)-, (cicloalifático(alifático))-S(O)-, cicloalquil-S(O)-, heterocicloalifático-S(O)-, heteroaril-S(O)-, o similares.

45 Como se usa en el presente documento, un grupo “sulfonilo” se refiere a -S(O)<sub>2</sub>-R<sup>X</sup> cuando se usa terminalmente y -S(O)<sub>2</sub>- cuando se usa internamente, en la que R<sup>X</sup> se ha definido anteriormente. Grupos sulfonilo a modo de ejemplo incluyen alifático-S(O)<sub>2</sub>-, aril-S(O)<sub>2</sub> (cicloalifático(alifático))-S(O)<sub>2</sub>-, cicloalifático-S(O)<sub>2</sub>-, heterocicloalifático-S(O)<sub>2</sub>-, heteroaril-S(O)<sub>2</sub>-, (cicloalifático(amido(alifático)))-S(O)<sub>2</sub>- o similares.

50 Como se usa en el presente documento, un grupo “sulfoxi” se refiere a -O-SO-R<sup>X</sup> o -SO-O-R<sup>X</sup> cuando se usa terminalmente y -O-S(O)- o -S(O)-O- cuando se usa internamente, en las que R<sup>X</sup> se ha definido anteriormente.

50 Como se usa en el presente documento, un grupo “halógeno” o “halo” se refiere a flúor, cloro, bromo o yodo.

55 Como se usa en el presente documento, un “alcoxicarbonilo”, que está englobado por el término carboxi, usado solo o a propósito de otro grupo, se refiere a un grupo tal como alquil-O-C(O)-.

55 Como se usa en el presente documento, un “alcoxialquilo” se refiere a un grupo alquilo tal como alquil-O-alquil-, en la que alquilo se ha definido anteriormente.

60 Como se usa en el presente documento, un “carbonilo” se refiere a -C(O)-.

60 Como se usa en el presente documento, un “oxo” se refiere a =O.

65 Como se usa en el presente documento, el término “fosfo” se refiere a fosfinatos y fosfonatos. Ejemplos de fosfinatos y fosfonatos incluyen -P(O)(R<sup>P</sup>)<sub>2</sub> en la que R<sup>P</sup> es alifático, alcoxi, ariloxi, heteroariloxi, (cicloalifático)oxi, (heterocicloalifático)oxiarilo, heteroarilo, cicloalifático o amino.

Como se usa en el presente documento, un “aminoalquilo” se refiere a la estructura  $(R^X)_2N$ -alquil-.

Como se usa en el presente documento, un “cianoalquilo” se refiere a la estructura  $(NC)$ -alquil-.

5 Como se usa en el presente documento, un grupo “urea” se refiere a la estructura  $-NR^X-CO-NR^YR^Z$  y un grupo “tiourea” se refiere a la estructura  $-NR^X-CS-NR^YR^Z$  cuando se usa terminalmente y  $-NR^X-CO-NR^Y-$  o  $-NR^X-CS-NR^Y-$  cuando se usa internamente, en las que  $R^X$ ,  $R^Y$  y  $R^Z$  se han definido anteriormente.

10 Como se usa en el presente documento, un grupo “guanidina” se refiere a la estructura  $-N=C(N(R^XR^Y))N(R^XR^Y)$  o  $-NR^X-C(=NR^X)NR^XR^Y$  en las que  $R^X$  y  $R^Y$  se han definido anteriormente.

Como se usa en el presente documento, el término grupo “amidino” se refiere a la estructura  $-C(=NR^X)N(R^XR^Y)$  en la que  $R^X$  y  $R^Y$  se han definido anteriormente.

15 En general, el término “vecinal” se refiere a la colocación de sustituyentes sobre un grupo que incluye dos o más átomos de carbono, en el que los sustituyentes están unidos a átomos de carbono adyacentes.

En general, el término “geminal” se refiere la colocación de sustituyentes sobre un grupo que incluye dos o más átomos de carbono, en el que los sustituyentes están unidos al mismo átomo de carbono.

20 Los términos “terminalmente” e “internamente” se refieren a la localización de un grupo dentro de un sustituyente. Un grupo es terminal si el grupo está presente en el extremo del sustituyente sin estar adicionalmente unido al resto de la estructura química. Carboxialquilo, es decir,  $R^XO(O)C$ -alquilo es un ejemplo de un grupo carboxi usado terminalmente. Un grupo es interno si el grupo está presente en el centro de un sustituyente de la estructura química. Alquilarcoxi (por ejemplo, alquil- $C(O)O-$  o alquil- $OC(O)-$ ) y alquilarcoxiarilo (por ejemplo, alquil- $C(O)O$ -aril- o alquil- $O(CO)$ -aril-) son ejemplos de grupos carboxi usados internamente.

30 Como se usa en el presente documento, una “cadena alifática” se refiere a un grupo alifático ramificado o lineal (por ejemplo, grupos alquilo, grupos alquenoilo o grupos alquinoilo). Una cadena alifática lineal tiene la estructura  $-[CH_2]_v-$ , en la que  $v$  es 1-12. Una cadena alifática ramificada es una cadena alifática lineal que está sustituida con uno o más grupos alifáticos. Una cadena alifática ramificada tiene la estructura  $-[CQQ]_v-$  en la que cada  $Q$  es independientemente un hidrógeno o un grupo alifático; sin embargo,  $Q$  debe ser un grupo alifático en al menos un caso. El término cadena alifática incluye cadenas de alquilo, cadenas de alquenoilo y cadenas de alquinoilo, en las que alquilo, alquenoilo y alquinoilo se han definido anteriormente.

35 El término “opcionalmente sustituido” se usa indistintamente con el término “sustituido o sin sustituir”. Como se ha descrito en el presente documento, los compuestos de la invención pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes, tal como se ilustra generalmente anteriormente, o como se ejemplifica por clases particulares, subclases y especies de la invención. Como se describe en el presente documento, las variables  $R_1$ ,  $R_2$  y  $R_3$ , y otras variables contenidas en las fórmulas descritas en el presente documento, engloban grupos específicos, tales como alquilo y arilo. A menos que se indique lo contrario, cada uno de los grupos específicos para las variables  $R_1$ ,  $R_2$  y  $R_3$ , y otras variables contenidas en su interior, pueden estar opcionalmente sustituidas con uno o más sustituyentes descritos en el presente documento. Cada sustituyente de un grupo específico está adicionalmente opcionalmente sustituido con de uno a tres de halógeno, ciano, oxo, alcoxi, hidroxilo, amino, nitro, arilo, cicloalifático, heterocicloalifático, heteroarilo, haloalquilo y alquilo. Por ejemplo, un grupo alquilo puede estar sustituido con alquilsulfanilo y el alquilsulfanilo puede estar opcionalmente sustituido con de uno a tres de halógeno, ciano, oxo, alcoxi, hidroxilo, amino, nitro, arilo, haloalquilo y alquilo. Como ejemplo adicional, la porción de cicloalquilo de un (cicloalquil)carbonilamino puede estar opcionalmente sustituida con de uno a tres de halógeno, ciano, alcoxi, hidroxilo, nitro, haloalquilo y alquilo. Si dos grupos alcoxi están unidos al mismo átomo o átomos adyacentes, los dos grupos alcoxi pueden formar un anillo junto con el (los) átomo(s) a los que están unidos.

55 En general, el término “sustituido”, si va precedido por el término “opcionalmente” o no, se refiere a la sustitución de radicales hidrógeno en una estructura dada con el radical de un sustituyente especificado. Sustituyentes específicos se describen anteriormente en las definiciones y más adelante en la descripción de compuestos y ejemplos de los mismos. A menos que se indique lo contrario, un grupo opcionalmente sustituido puede tener un sustituyente en una cada posición sustituible del grupo, y cuando más de una posición en cualquier estructura dada puede estar sustituida con más de un sustituyente seleccionado de un grupo especificado, el sustituyente puede ser tanto el mismo como diferente en cada posición. Un sustituyente de anillo, tal como un heterocicloalquilo, puede unirse a otro anillo, tal como un cicloalquilo, para formar un sistema de anillos espiro-bicíclicos, por ejemplo, ambos anillos comparten un átomo común. Como reconocerá un experto habitual en la materia, las combinaciones de sustituyentes concebidas por la presente invención son aquellas combinaciones que producen la formación de compuestos estables o químicamente factibles.

65 El término “estable o químicamente factible”, como se usa en el presente documento, se refiere a compuestos que no están sustancialmente alterados cuando se someten a condiciones para permitir su producción, detección y preferentemente su recuperación, purificación y uso para uno o más de los fines desvelados en el presente

documento. En algunas realizaciones, un compuesto estable o compuesto químicamente factible es uno que no está sustancialmente alterado cuando se mantiene a una temperatura de 40 °C o menos, en ausencia de humedad u otras condiciones químicamente reactivas, durante al menos una semana.

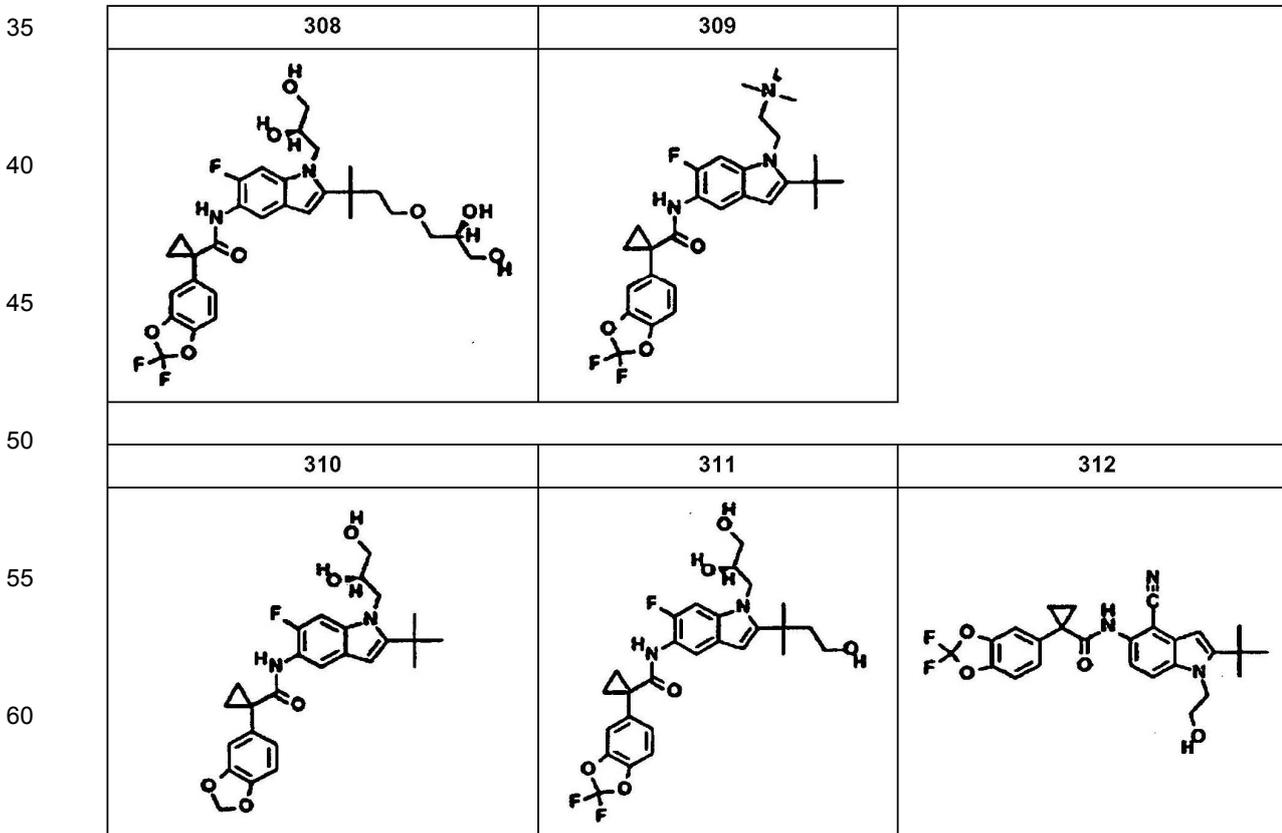
5 Como se usa en el presente documento, una "cantidad eficaz" se define como la cantidad requerida para conferir un efecto terapéutico sobre el paciente tratado, y normalmente se determina basándose en la edad, área superficial, peso y condición del paciente. La interrelación de dosificaciones para animales y seres humanos (basada en miligramos por metro cuadrado de superficie corporal) se describe por Freireich y col., *Cancer Chemother. Rep.*, 50: 219 (1966). El área superficial del cuerpo puede determinarse aproximadamente a partir de la altura y el peso del  
 10 paciente. Véase, por ejemplo, *Scientific Tables*, Geigy Pharmaceuticals, Ardsley, New York, 537 (1970). Como se usa en el presente documento, "paciente" se refiere a un mamífero, que incluye un ser humano.

A menos que se establezca de otro modo, también se indica que las estructuras representadas en el presente documento incluyen todas las formas isoméricas (por ejemplo, enantioméricas, diaestereoméricas y geométricas (o conformacionales)) de la estructura; por ejemplo, las configuraciones R y S para cada centro asimétrico, isómeros de doble enlace (Z) y (E) e isómeros conformacionales (Z) y (E). Por tanto, isómeros estereoquímicos individuales, además de mezclas enantioméricas, diaestereoméricas y geométricas (o conformacionales) de los presentes compuestos, están dentro del alcance de la invención. A menos que se establezca de otro modo, todas las formas tautómeras de los compuestos de la invención están dentro del alcance de la invención. Adicionalmente, a menos  
 20 que se establezca de otro modo, también se indica que las estructuras representadas en el presente documento incluyen compuestos que se diferencian solo en la presencia de uno o más átomos isotópicamente enriquecidos. Por ejemplo, los compuestos que tienen las presentes estructuras, excepto por la sustitución de hidrógeno con deuterio o tritio, o la sustitución de un carbono con un carbono enriquecido en <sup>13</sup>C o <sup>14</sup>C, están dentro del alcance de la presente invención. Tales compuestos son útiles, por ejemplo, como herramientas analíticas o sondas en ensayos biológicos, o como agentes terapéuticos.

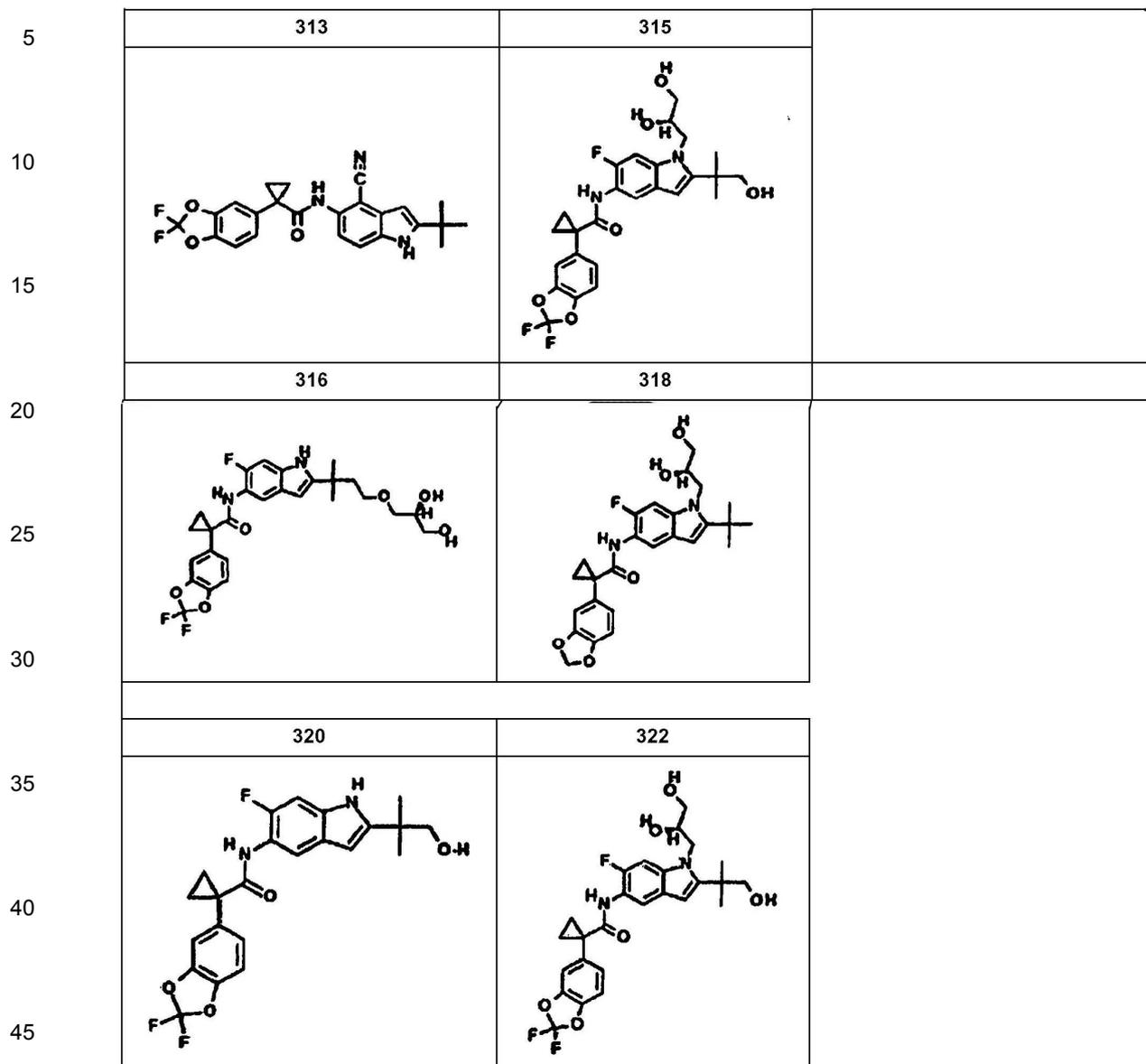
Los compuestos descritos en el presente documento son moduladores de transportadores de ABC útiles y son útiles en el tratamiento de enfermedades mediadas por transportadores de ABC.

30 II. COMPUESTOS

El compuesto 322 es el compuesto de la invención; adicionalmente se describen en el presente documento



(continuación)



En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende (i) un compuesto de la presente invención; y (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización, la composición comprende además un agente adicional seleccionado de un agente mucolítico, broncodilatador, un antibiótico, un agente antiinfeccioso, un agente antiinflamatorio, corrector de CFTR, potenciador de CFTR o un agente nutritivo. En otra realización, la composición comprende además un agente adicional seleccionado de compuestos desvelados en la solicitud de patente de EE.UU. n° de serie 11/165.818, publicada como la solicitud de patente de EE.UU. publicada n° 2006/0074075, presentada el 24 de junio de 2005. En otra realización, la composición comprende además N-(5-hidroxi-2,4-di-*terc*-butil-fenil)-4-oxo-1H-quinolin-3-carboxamida. Estas composiciones son útiles para tratar las enfermedades descritas más adelante que incluyen fibrosis quística. Estas composiciones también son útiles en los kits descritos más adelante.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método *in vitro* de aumento del número de transportadores de ABC funcionales en una membrana de una célula, que comprende la etapa de poner en contacto dicha célula con un compuesto seleccionado de

65

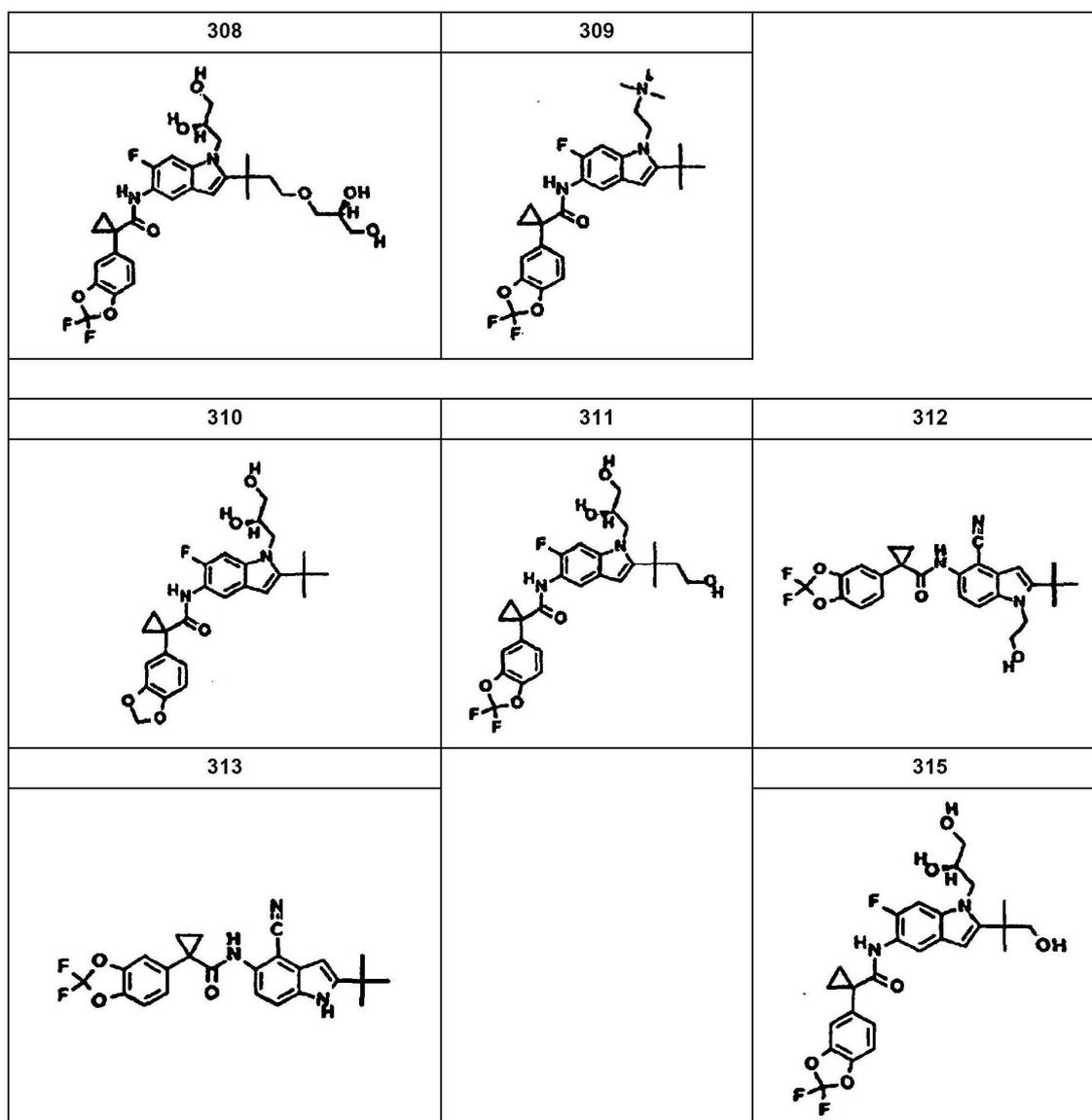
5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

308	309	
310	311	312
313	315	
316		318
320		322
	y	

En una realización de este método, dicha afección, enfermedad o trastorno está seleccionado de fibrosis quística, enfisema hereditario, hemocromatosis hereditaria, deficiencias en la coagulación-fibrinólisis, tales como deficiencia de proteína C, angioedema hereditario tipo 1, deficiencias del procesamiento de lípidos, tales como hipercolesterolemia familiar, quilomiconemia tipo 1, abetalipoproteinemia, enfermedades de almacenamiento de lisosomas, tales como enfermedad de las células I/pseudo-Hurler, mucopolisacaridosis, Sandhof/Tay-Sachs, Crigler-Najjar tipo II, poliendocrinopatía/hiperinsulinemia, diabetes mellitus, enanismo de Laron, deficiencia de mieloperoxidasa, hipoparatiroidismo primario, melanoma, glicanosis CDG tipo 1, enfisema hereditario, hipertiroidismo congénito, osteogénesis imperfecta, hipofibrinogenemia hereditaria, deficiencia de ACT, diabetes insípida (DI), DI neurohipofisaria, DI nefrogénica, síndrome de Charcot-Marie-Tooth, enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher, enfermedades neurodegenerativas, tales como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, parálisis supranuclear progresiva, enfermedad de Pick, varios trastornos neurológicos de la poliglutamina, tales como Huntington, atrofia muscular espinal y bulbar, atrofia dentato-rubro-pálido-luisiana y distrofia miotónica, además de encefalopatías espongiiformes, tales como enfermedad hereditaria de Creutzfeldt-Jakob, enfermedad de Fabry, síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, EPOC, enfermedad del ojo seco y enfermedad de Sjögren.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un kit para su uso en medir la actividad de un transportador de ABC o un fragmento del mismo en una muestra biológica *in vitro* o *in vivo*, que comprende:

(i) una primera composición que comprende un compuesto seleccionado de



(continuación)

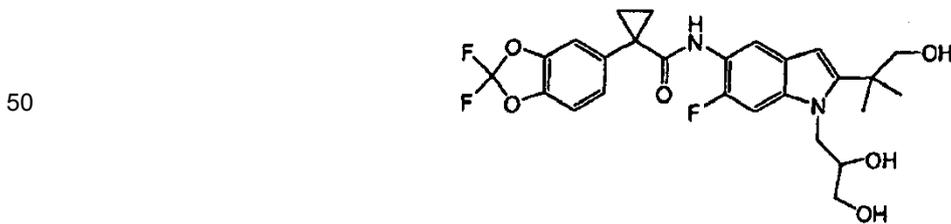
316		318
320		322
	y	

y  
b) medir la actividad de dicho transportador de ABC o un fragmento del mismo.

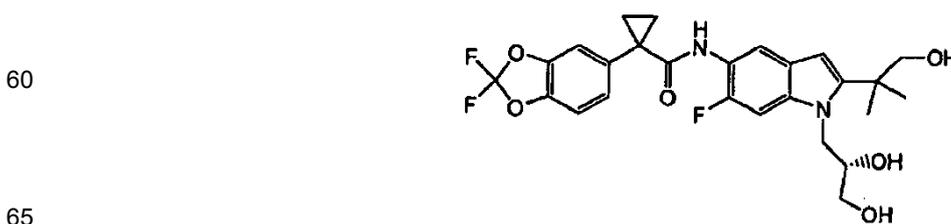
En una realización, el kit comprende además instrucciones para a) poner en contacto una composición adicional con la muestra biológica; b) medir la actividad de dicho transportador de ABC o un fragmento del mismo en presencia de dicho compuesto adicional, y c) comparar la actividad del transportador de ABC en presencia del compuesto adicional con la densidad del transportador de ABC en presencia de dicha primera composición.

En una realización, el kit se usa para medir la densidad de CFTR.

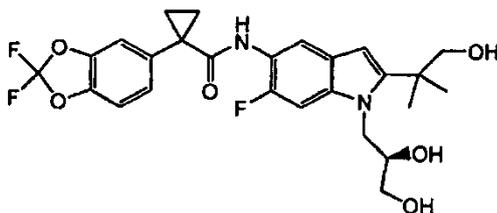
En ciertas realizaciones de todos los aspectos anteriores, el compuesto es



En otras realizaciones de todos los aspectos anteriores, el compuesto es



En una realización de la invención de todos los aspectos anteriores, el compuesto es



#### IV. ESQUEMAS SINTÉTICOS GENÉRICOS

Los compuestos de la presente invención pueden sintetizarse fácilmente a partir de materiales de partida comercialmente disponibles o conocidos por métodos conocidos. Rutas de síntesis a modo de ejemplo para producir compuestos de la presente invención se proporcionan en el presente documento.

#### V. FORMULACIONES, ADMINISTRACIONES Y USOS

Por consiguiente, en otro aspecto de la presente invención, se proporcionan composiciones farmacéuticamente aceptables, en la que estas composiciones comprenden cualquiera de los compuestos que se describen en el presente documento, y opcionalmente comprenden un excipiente, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, estas composiciones comprenden opcionalmente además uno o más agentes terapéuticos adicionales.

También se apreciará que ciertos de los compuestos de la presente invención pueden existir en forma libre para el tratamiento, o si es apropiado, como derivado farmacéuticamente aceptable o un profármaco del mismo. Según la presente invención, un derivado farmacéuticamente aceptable o un profármaco incluye, pero no se limita a, sales farmacéuticamente aceptables, ésteres, sales de tales ésteres, o cualquier otro aducto o derivado que tras la administración a un paciente en necesidad pueda proporcionar, directamente o indirectamente, un compuesto como se ha descrito de otra manera en el presente documento, o un metabolito o residuo del mismo.

Como se usa en el presente documento, el término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellas sales que son, dentro del alcance del criterio médico sensato, adecuadas para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales inferiores sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica y similares, y son proporcionales a una relación beneficio/riesgo razonable. Una "sal farmacéuticamente aceptable" significa cualquier sal no tóxica o sal de un éster de un compuesto de la presente invención que, tras la administración a un receptor, puede proporcionar, tanto directamente como indirectamente, un compuesto de la presente invención o un metabolito inhibitoriamente activo o residuo del mismo.

Las sales farmacéuticamente aceptables son muy conocidas en la técnica. Por ejemplo, S. M. Berge y col. describen sales farmacéuticamente aceptables en detalle en J. Pharmaceutical Sciences, 1977, 66, 1-19. Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la presente invención incluyen aquellas derivadas de ácidos y bases inorgánicos y orgánicos adecuados. Ejemplos de sales de adición de ácido no tóxicas farmacéuticamente aceptables son sales de un grupo amino formadas con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico y ácido perclórico o con ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido oxálico, ácido maleico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido succínico o ácido malónico o usando otros métodos usados en la materia tales como intercambio iónico. Otras sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales adipato, alginato, ascorbato, aspartato, benzenosulfonato, benzoato, bisulfato, borato, butirato, canforato, canforsulfonato, citrato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, formiato, fumarato, glucoheptonato, glicerofosfato, gluconato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, yodhidrato, 2-hidroxi-etanosulfonato, lactobionato, lactato, laurato, laurilsulfato, malato, maleato, malonato, metanosulfonato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, nitrato, oleato, oxalato, palmitato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, fosfato, picrato, pivalato, propionato, estearato, succinato, sulfato, tartrato, tiocianato, p-toluenosulfonato, undecanoato, valerato y similares. Sales derivadas de bases apropiadas incluyen sales de metal alcalino, metal alcalinotérreo, amonio y  $N^+$ (alquilo  $C_{1-4}$ )<sub>4</sub>. La presente invención también prevé la cuaternización de cualquier grupo que contenga nitrógeno básico que contiene de los compuestos desvelados en el presente documento. Pueden obtenerse productos solubles o dispersables en agua o aceite por tal cuaternización. Sales de metales alcalinos o alcalinotérreos representativas incluyen sodio, litio, potasio, calcio, magnesio y similares. Sales farmacéuticamente aceptables adicionales incluyen, cuando convenga, cationes amonio, amonio cuaternario y amina no tóxicos formados usando contraiones tales como haluro, hidróxido, carboxilato, sulfato, fosfato, nitrato, alquil inferior-sulfonato y arilsulfonato.

Como se ha descrito anteriormente, las composiciones farmacéuticamente aceptables de la presente invención comprenden adicionalmente un excipiente, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable, que, como se usa en el presente documento, incluye todos y cada uno de disolventes, diluyentes, u otro vehículo líquido, adyuvantes de

dispersión o suspensión, agentes tensioactivos, agentes isotónicos, espesantes o emulsionantes, conservantes, aglutinantes sólidos, lubricantes y similares, como es apropiado para la forma de dosificación particular deseada. Remington's Pharmaceutical Sciences, decimosexta edición, E. W. Martin (Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1980) desvela diversos vehículos usados en la formulación de las composiciones farmacéuticamente aceptables y técnicas conocidas para la preparación de las mismas. Excepto en la medida de que cualquier medio de vehículo convencional sea incompatible con los compuestos de la invención, tal como produciendo cualquier efecto biológico no deseable o interaccionando de otro modo de un modo perjudicial con cualquier otro componente de la composición farmacéuticamente aceptable, se contempla que su uso está dentro del alcance de la presente invención. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, intercambiadores iónicos, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas del suero, tales como albúmina de suero humano, sustancias tampón tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico o sorbato de potasio, mezclas de glicéridos parciales de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina, hidrogenofosfato de disodio, hidrogenofosfato de potasio, cloruro sódico, sales de cinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, poliacrilatos, ceras, polímeros de bloques de polietileno-polioxipropileno, lanolina, azúcares tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y sus derivados tales como carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa y acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; excipientes tales como manteca de cacao y ceras de supositorio; aceites tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón; aceite de alazor; aceite de sésamo; aceite de oliva; aceite de maíz y aceite de soja; glicoles; tales como propilenglicol o polietilenglicol; ésteres tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; agentes de tamponamiento tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua sin pirógenos; solución salina isotónica; disolución de Ringer; alcohol etílico y disoluciones de tampón de fosfato, además de otros lubricantes compatibles no tóxicos tales como laurilsulfato de sodio y estearato de magnesio, además de agentes colorantes, agentes de desmoldeo, agentes de recubrimiento, edulcorantes, aromatizantes y perfumantes, también puede estar presentes conservantes y antioxidantes en la composición, según el criterio del formulador.

En otro aspecto más, la presente invención proporciona un método para tratar una afección, enfermedad o trastorno en la que está implicada la actividad de transportadores de ABC. En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona un método para tratar una afección, enfermedad o trastorno en la que está implicada una deficiencia de actividad de transportadores de ABC, comprendiendo el método administrar una composición que comprende un compuesto seleccionado de 308-312, 313, 315, 316, 318, 320 y 322 a un sujeto, preferentemente un mamífero, en necesidad del mismo.

En ciertas realizaciones preferidas, la presente invención proporciona un método para tratar fibrosis quística, enfisema hereditario, hemocromatosis hereditaria, deficiencias en la coagulación-fibrinólisis, tales como deficiencia de proteína C, angioedema hereditario tipo 1, deficiencias del procesamiento de lípidos, tales como hipercolesterolemia familiar, quilomicronemia tipo 1, abetalipoproteinemia, enfermedades de almacenamiento de lisosomas, tales como enfermedad de las células I/pseudo-Hurler, mucopolisacaridosis, Sandhof/Tay-Sachs, Crigler-Najjar tipo II, poliendocrinopatía/hiperinsulinemia, diabetes mellitus, enanismo de Laron, deficiencia de mieloperoxidasa, hipoparatiroidismo primario, melanoma, glicanosis CDG tipo I, enfisema hereditario, hipertiroidismo congénito, osteogénesis imperfecta, hipofibrinogenemia hereditaria, deficiencia de ACT, diabetes insípida (DI), DI neurohipofisaria, DI nefrogénica, síndrome de Charcot-Marie-Tooth, enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher, enfermedades neurodegenerativas, tales como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, parálisis supranuclear progresiva, enfermedad de Pick, varios trastornos neurológicos de la poliglutamina, tales como Huntington, ataxia espinocerebelosa tipo I, atrofia muscular espinal y bulbar, atrofia dentato-rubro-pálido-luisiana y distrofia miotónica, además de encefalopatías espongiiformes, tales como enfermedad hereditaria de Creutzfeldt-Jakob (debida a un defecto en el procesamiento de las proteínas priónicas), enfermedad de Fabry, enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, diarrea secretora, enfermedad renal poliquística, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfermedad del ojo seco y síndrome de Sjögren, que comprende la etapa de administrar a dicho mamífero una cantidad eficaz de una composición que comprende un compuesto seleccionado de 308-312, 313, 315, 316, 318, 320 y 322, o una realización preferida del mismo como se expone anteriormente.

Según una realización preferida alternativa, la presente invención proporciona un método para tratar fibrosis quística que comprende la etapa de administrar a dicho mamífero una composición que comprende la etapa de administrar a dicho mamífero una cantidad eficaz de una composición que comprende un compuesto seleccionado de 308-312, 313, 315, 316, 318, 320 y 322, o una realización preferida del mismo como se expone anteriormente.

Según la invención, una "cantidad eficaz" del compuesto o composición farmacéuticamente aceptable es aquella cantidad eficaz para tratar o reducir la gravedad de uno o más de fibrosis quística, enfisema hereditario, hemocromatosis hereditaria, deficiencias en la coagulación-fibrinólisis, tales como deficiencia de proteína C, angioedema hereditario tipo 1, deficiencias del procesamiento de lípidos, tales como hipercolesterolemia familiar, quilomicronemia tipo 1, abetalipoproteinemia, enfermedades de almacenamiento de lisosomas, tales como enfermedad de las células I/pseudo-Hurler, mucopolisacaridosis, Sandhof/Tay-Sachs, Crigler-Najjar tipo II, poliendocrinopatía/hiperinsulinemia, diabetes mellitus, enanismo de Laron, deficiencia de mieloperoxidasa, hipoparatiroidismo primario, melanoma, glicanosis CDG tipo 1, enfisema hereditario, hipertiroidismo congénito,

osteogénesis imperfecta, hipofibrinogenemia hereditaria, deficiencia de ACT, diabetes insípida (DI), DI neurohipofisaria, DI nefrogénica, síndrome de Charcot-Marie-Tooth, enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher, enfermedades neurodegenerativas, tales como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, parálisis supranuclear progresiva, enfermedad de Pick, varios trastornos neurológicos de la poliglutamina, tales como Huntington, ataxia espinocerebelosa tipo I, atrofia muscular espinal y bulbar, atrofia dentato-rubro-pálido-luisiana y distrofia miotónica, además de encefalopatías espongiiformes, tales como enfermedad hereditaria de Creutzfeldt-Jakob, enfermedad de Fabry, enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, diarrea secretora, enfermedad renal poliquística, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfermedad del ojo seco y síndrome de Sjögren.

Los compuestos y composiciones, según el método de la presente invención, pueden administrarse usando cualquier cantidad y cualquier vía de administración eficaz para tratar o reducir la gravedad de uno o más de fibrosis quística, enfisema hereditario, hemocromatosis hereditario, deficiencias en la coagulación-fibrinólisis, tales como deficiencia de proteína C, angioedema hereditario tipo 1, deficiencias del procesamiento de lípidos, tales como hipercolesterolemia familiar, quilomicronemia tipo 1, abetalipoproteinemia, enfermedades de almacenamiento de lisosomas, tales como enfermedad de las células I/pseudo-Hurler, mucopolisacaridosis, Sandhof/Tay-Sachs, Crigler-Najjar tipo II, poliendocrinopatía/hiperinsulinemia, diabetes mellitus, enanismo de Laron, deficiencia de mieloperoxidasa, hipoparatiroidismo primario, melanoma, glicanosis CDG tipo 1, enfisema hereditario, hipertiroidismo congénito, osteogénesis imperfecta, hipofibrinogenemia hereditaria, deficiencia de ACT, diabetes insípida (DI), DI neurohipofisaria, DI nefrogénica, síndrome de Charcot-Marie-Tooth, enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher, enfermedades neurodegenerativas, tales como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, parálisis supranuclear progresiva, enfermedad de Pick, varios trastornos neurológicos de la poliglutamina, tales como Huntington, ataxia espinocerebelosa tipo I, atrofia muscular espinal y bulbar, atrofia dentato-rubro-pálido-luisiana y distrofia miotónica, además de encefalopatías espongiiformes, tales como enfermedad hereditaria de Creutzfeldt-Jakob, enfermedad de Fabry, enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, diarrea secretora, enfermedad renal poliquística, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfermedad del ojo seco y síndrome de Sjögren.

La cantidad exacta requerida variará de sujeto a sujeto, dependiendo de la especie, edad y condición general del sujeto, la gravedad de la infección, el agente particular, su modo de administración, y similares. Los compuestos de la invención se formulan preferentemente en forma unitaria de dosificación para facilitar la administración y uniformidad de la dosificación. La expresión "forma unitaria de dosificación", como se usa en el presente documento, se refiere a una unidad físicamente discreta de agente apropiada para el paciente que va a tratarse. Se entenderá, sin embargo, que el uso diario total de los compuestos y composiciones de la presente invención se decidirá por el médico adjunto dentro del alcance del criterio médico sensato. El nivel de dosis eficaz específica para cualquier paciente u organismo particular dependerá de una variedad de factores que incluyen el trastorno que está tratándose y la gravedad del trastorno; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada; la edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del paciente; el momento de administración, vía de administración y la tasa de eliminación del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; fármacos usados en combinación o coincidentes con el compuesto específico empleado, y factores similares muy conocidos en las ciencias médicas. El término "paciente", como se usa en el presente documento, significa un animal, preferentemente un mamífero, y lo más preferentemente un ser humano.

Las composiciones farmacéuticamente aceptables de la presente invención pueden administrarse a seres humanos y otros animales por vía oral, rectalmente, parenteralmente, intracisternalmente, intravaginalmente, intraperitonealmente, tópicamente (como por polvos, pomadas o gotas), bucalmente, como un spray oral o nasal, o similares, dependiendo de la gravedad de la infección que está tratándose. En ciertas realizaciones, los compuestos de la invención pueden administrarse por vía oral o parenteralmente a niveles de dosificación de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg y preferentemente de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 25 mg/kg, de peso corporal del sujeto por día, una o más veces al día, para obtener el efecto terapéutico deseado.

Las formas de dosificación líquidas para administración por vía oral incluyen, pero no se limitan a, emulsiones, microemulsiones, disoluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además de los compuestos activos, las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes comúnmente usados en la materia tales como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, dimetilformamida, aceites (en particular, aceites de semilla de algodón, cacahuete, maíz, germen, oliva, ricino y de sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurfurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitano, y mezclas del mismo. Además de los diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes tales como agentes humectantes, emulsionantes y agentes de suspensión, edulcorantes, aromatizantes y perfumantes.

Pueden formularse preparaciones inyectables, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles según la técnica conocida usando dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una disolución, suspensión o emulsión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable no tóxico, por ejemplo, como una disolución en 1,3-butanodiol.

Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse están agua, disolución de Ringer, disolución de cloruro sódico U.S.P. e isotónica. Además, se emplean convencionalmente aceites no volátiles estériles como disolvente o medio de suspensión. Para este fin puede emplearse cualquier aceite no volátil suave que incluye mono- o diglicéridos sintéticos. Además, se usan ácidos grasos tales como ácido oleico en la preparación de inyectables.

Las formulaciones inyectables pueden esterilizarse, por ejemplo, por filtración a través de un filtro de retención de bacterias, o incorporando agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse o dispersarse en agua estéril u otro medio inyectable estéril antes de uso.

Con el fin de prolongar el efecto de un compuesto de la presente invención, es frecuentemente deseable ralentizar la absorción del compuesto de la inyección subcutánea o intramuscular. Esto puede llevarse a cabo por el uso de una suspensión líquida de material cristalino o amorfo con poca solubilidad en agua. La tasa de absorción del compuesto depende entonces de su tasa de disolución que, a su vez, puede depender del tamaño del cristal y la forma cristalina. Alternativamente, la absorción retardada de una forma de compuesto parenteralmente administrada se lleva a cabo disolviendo o suspendiendo el compuesto en un vehículo de aceite. Se preparan formas de liberación prolongada inyectables formando matrices microencapsuladas del compuesto en polímeros biodegradables tales como polilactida-poliglicolida. Dependiendo de la relación de compuesto con respecto a polímero y la naturaleza del polímero particular empleado, puede controlarse la tasa de compuesto liberada. Ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). También se preparan formulaciones inyectables de liberación prolongada atrapando el compuesto en liposomas o microemulsiones que son compatibles con los tejidos del cuerpo.

Las composiciones para administración rectal o vaginal son preferentemente supositorios que pueden prepararse mezclando los compuestos de la presente invención con excipientes o vehículos no irritantes adecuados tales como manteca de cacao, polietilenglicol o una cera de supositorio que son sólidos a temperatura ambiente pero líquidos a temperatura corporal y, por tanto, se funden en el recto o cavidad vaginal y liberan el compuesto activo.

Las formas de dosificación sólidas para administración por vía oral incluyen cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos y gránulos. En tales formas de dosificación sólidas, el compuesto activo se mezcla con al menos un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable inerte tal como citrato de sodio o fosfato de dicalcio y/o a) cargas o sustancias de relleno tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y ácido silícico, b) aglutinantes tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidina, sacarosa y goma arábiga, c) humectantes tales como glicerol, d) agentes disgregantes tales como agar-agar, carbonato cálcico, almidón de patata o de tapioca, ácido alginico, ciertos silicatos, y carbonato sódico, e) agentes retardantes de la disolución tales como parafina, f) aceleradores de la absorción tales como compuestos de amonio cuaternario, g) agentes humectantes tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol, h) absorbentes tales como caolín y arcilla de bentonita, y i) lubricantes tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio, y mezclas de los mismos. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, la forma de dosificación también puede comprender agentes de tamponamiento.

También pueden emplearse composiciones sólidas de un tipo similar como cargas en cápsulas de gelatina rellenas blandas y duras usando excipientes tales como lactosa o azúcar de la leche, además de polietilenglicoles de alto peso molecular y similares. Las formas de dosificación sólidas de comprimidos, comprimidos recubiertos de azúcar, cápsulas, píldoras y gránulos pueden prepararse con recubrimientos y vainas tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos muy conocidos en la técnica de la formulación farmacéutica. Pueden contener opcionalmente opacificantes y también pueden ser de una composición que libera el (los) principio(s) activo(s) solo(s), o preferencialmente, en una cierta parte del tubo intestinal, opcionalmente de una manera retardada. Ejemplos de composiciones de incorporación que pueden usarse incluyen sustancias poliméricas y ceras. También pueden emplearse composiciones sólidas de un tipo similar como cargas en cápsulas de gelatina rellenas blandas y duras usando excipientes tales como lactosa o azúcar de la leche, además de polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

Los compuestos activos también pueden estar en forma microencapsulada con uno o más excipientes como se observa anteriormente. Las formas de dosificación sólidas de comprimidos, comprimidos recubiertos de azúcar, cápsulas, píldoras y gránulos pueden prepararse con recubrimientos y vainas tales como recubrimientos entéricos, recubrimientos de control de la liberación y otros recubrimientos muy conocidos en la técnica de la formulación farmacéutica. En tales formas de dosificación sólidas, el compuesto activo puede mezclarse con al menos un diluyente inerte tal como sacarosa, lactosa o almidón. Tales formas de dosificación también pueden comprender, como es práctica normal, sustancias adicionales distintas de diluyentes inertes, por ejemplo, lubricantes para la formación de comprimidos y otros adyuvantes tales como estearato de magnesio y celulosa microcristalina. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, las formas de dosificación también pueden comprender agentes de tamponamiento. Pueden contener opcionalmente opacificantes y también pueden ser de una composición que libera el (los) principio(s) activo(s) solo, o preferencialmente, en una cierta parte del tubo intestinal, opcionalmente, de una manera retardada. Ejemplos de composiciones de incorporación que pueden usarse incluyen sustancias poliméricas y ceras.

Formas de dosificación para administración tópica o transdérmica de un compuesto de la presente invención incluyen pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, polvos, disoluciones, esprays, inhalantes o parches. El componente activo se mezcla bajo condiciones estériles con un vehículo farmacéuticamente aceptable y cualquier conservante o tampón necesario que pueda requerirse. También se contempla que formulación oftálmica, gotas para los oídos y colirios están dentro del alcance de la presente invención. Adicionalmente, la presente invención contempla el uso de parches transdérmicos, que tienen la ventaja añadida de proporcionar la liberación controlada de un compuesto al cuerpo. Tales formas de dosificación se preparan disolviendo o dispensando el compuesto en el medio apropiado. También pueden usarse potenciadores de la absorción para aumentar el flujo del compuesto a través de la piel. La tasa puede controlarse tanto proporcionando una membrana de control de la tasa como dispersando el compuesto en una matriz de polímero o gel.

Como se ha descrito generalmente anteriormente, los compuestos de la invención son útiles como moduladores de los transportadores de ABC. Así, sin desear ceñirse a teoría particular alguna, los compuestos y composiciones son particularmente útiles para tratar o reducir la gravedad de una enfermedad, afección o trastorno en la que la hiperactividad o inactividad de transportadores de ABC participa en la enfermedad, afección o trastorno. Cuando la hiperactividad o inactividad de un transportador de ABC participa en una enfermedad, afección o trastorno particular, la enfermedad, afección o trastorno también puede denominarse una "enfermedad, afección o trastorno mediada por transportadores de ABC". Por consiguiente, en otro aspecto, la presente invención proporciona un método para tratar o reducir la gravedad de una enfermedad, afección o trastorno en la que la hiperactividad o inactividad de un transportador de ABC participa en el estado de enfermedad.

La actividad de un compuesto utilizado en la presente invención como modulador de un transportador de ABC puede ensayarse según métodos descritos generalmente en la materia y en los ejemplos en el presente documento.

También se apreciará que los compuestos y composiciones farmacéuticamente aceptables de la presente invención pueden emplearse en terapias de combinación, es decir, los compuestos y composiciones farmacéuticamente aceptables pueden administrarse simultáneamente con, antes de, o posterior a, uno o varios de otros procedimientos terapéuticos o médicos deseados. La combinación particular de terapias (terapéuticos o procedimientos) para emplear en una pauta de combinación tendrá en cuenta la compatibilidad de los terapéuticos y/o procedimientos deseados y el efecto terapéutico que se desea lograr. También se apreciará que las terapias empleadas pueden alcanzar un efecto deseado para el mismo trastorno (por ejemplo, un compuesto inventivo puede administrarse simultáneamente con otro agente usado para tratar el mismo trastorno), o pueden alcanzar efectos diferentes (por ejemplo, control de cualquier efecto adverso). Como se usa en el presente documento, agentes terapéuticos adicionales que normalmente se administran para tratar o prevenir una enfermedad, o afección, particular se conocen como "apropiados para la enfermedad, o afección, que está tratándose".

La cantidad de agente terapéutico adicional presente en las composiciones de la presente invención no será superior a la cantidad que normalmente se administraría en una composición que comprende ese agente terapéutico como el único agente activo. Preferentemente, la cantidad de agente terapéutico adicional en las composiciones presentemente desveladas oscilará de aproximadamente el 50 % al 100 % de la cantidad normalmente presente en una composición que comprende ese agente como el único agente terapéuticamente activo.

Los compuestos de la presente invención o composiciones farmacéuticamente aceptables de los mismos también pueden incorporarse en composiciones para el recubrimiento de un dispositivo médico implantable, tal como prótesis, válvulas artificiales, injertos vasculares, prótesis endovasculares y catéteres. Por consiguiente, la presente invención, en otro aspecto, incluye una composición para el recubrimiento de un dispositivo implantable que comprende un compuesto de la presente invención como se describe generalmente anteriormente, y en clases y subclases en el presente documento, y un vehículo adecuado para el recubrimiento de dicho dispositivo implantable. En otro aspecto adicional, la presente invención incluye un dispositivo implantable recubierto con una composición que comprende un compuesto de la presente invención como se describe generalmente anteriormente, y en clases y subclases en el presente documento, y un vehículo adecuado para el recubrimiento de dicho dispositivo implantable. Recubrimientos adecuados y la preparación general de dispositivos implantables recubiertos se describen en las patentes de EE.UU. 6.099.562; 5.886.026; y 5.304.121. Los recubrimientos normalmente son materiales poliméricos biocompatibles tales como un polímero de hidrogel, polimetildisiloxano, policaprolactona, polietilenglicol, ácido poliláctico, etileno-acetato de vinilo, y mezclas de los mismos. Los recubrimientos pueden cubrirse opcionalmente adicionalmente por un recubrimiento superior adecuado de fluorosilicona, polisacáridos, polietilenglicol, fosfolípidos o combinaciones de los mismos para conferir características de liberación controlada a la composición.

Otro aspecto de la invención se refiere a modular la actividad de transportadores de ABC en una muestra biológica o un paciente (por ejemplo, *in vitro* o *in vivo*), método que comprende administrar al paciente, o poner en contacto dicha muestra biológica con un compuesto de fórmula I o una composición que comprende dicho compuesto. El término "muestra biológica", como se usa en el presente documento, incluye, sin limitación, cultivos celulares o extractos de los mismos; material de biopsia obtenido de un mamífero o extractos del mismo; y sangre, saliva, orina, heces, semen, lágrimas, u otros líquidos corporales o extractos de los mismos.

La modulación de la actividad de transportadores de ABC en una muestra biológica es útil para una variedad de fines que son conocidos para un experto en la materia. Ejemplos de tales fines incluyen, pero no se limitan a, el estudio de transportadores de ABC en fenómenos biológicos y patológicos; y la evaluación comparativa de nuevos moduladores de transportadores de ABC.

En otra realización más se proporciona un método de modular la actividad de un canal de aniones *in vitro* o *in vivo* que comprende la etapa de poner en contacto dicho canal con un compuesto seleccionado de 308-312, 313, 315, 316, 318, 320 y 322. En realizaciones preferidas, el canal de aniones es un canal de cloruro o un canal de bicarbonato. En otras realizaciones preferidas, el canal de aniones es un canal de cloruro.

Según una realización alternativa, la presente invención proporciona un método de aumentar el número de transportadores de ABC funcionales en una membrana de una célula, que comprende la etapa de poner en contacto dicha célula con un compuesto seleccionado de 308-312, 313, 315, 316, 318, 320 y 322. El término "transportador de ABC funcional", como se usa en el presente documento, significa un transportador de ABC que puede transportar actividad. En realizaciones preferidas, dicho transportador de ABC funcional es CFTR.

Según otra realización preferida, la actividad del transportador de ABC se mide midiendo el potencial del voltaje transmembrana. Medios para medir el potencial del voltaje a través de una membrana en la muestra biológica pueden emplear cualquiera de los métodos conocidos en la materia, tales como ensayo óptico del potencial de membrana u otros métodos electrofisiológicos.

El ensayo óptico del potencial de membrana utiliza sensores de FRET sensibles al voltaje descritos por Gonzalez y Tsien (véase, Gonzalez, J. E. y R. Y. Tsien (1995) "Voltage sensing by fluorescence resonance energy transfer in single cells" *Biophys J* 69(4): 1272-80, y Gonzalez, J. E. y R. Y. Tsien (1997) "Improved indicators of cell membrane potential that use fluorescence resonance energy transfer" *Chem Biol* 4(4): 269-77) en combinación con instrumentación para medir los cambios de fluorescencia tales como el lector de sonda de tensión/ionización (VIPR) (véase, Gonzalez, J. E., K. Oades, y col. (1999) "Cell-based assays and instrumentation for screening ion-channel targets" *Drug Discov Today* 4(9): 431-439).

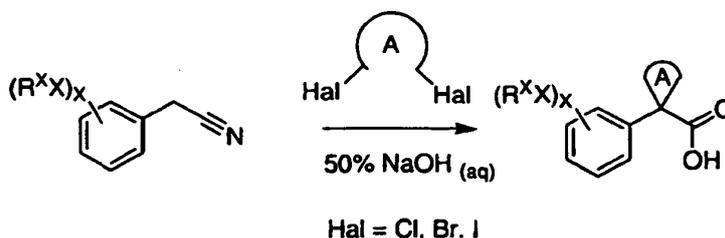
Estos ensayos sensibles al voltaje se basan en el cambio en la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) entre el colorante sensible al voltaje soluble en la membrana DiSBAC<sub>2</sub>(3) y un fosfolípido fluorescente, CC2-DMPE, que está unido a la capa externa de la membrana plasmática y actúa de donante de FRET. Los cambios en el potencial de membrana ( $V_m$ ) hacen que DiSBAC<sub>2</sub>(3) negativamente cargado se redistribuya a través de la membrana plasmática y, por consiguiente, cambie la cantidad de transferencia de energía de CC2-DMPE. Los cambios en la emisión de fluorescencia pueden monitorizarse usando VIPR™ II, que es un sistema de manipulación de líquidos integrado y detector fluorescente diseñado para realizar los cribados basados en células en placas de microtitulación de 96 ó 384 pocillos.

En otro aspecto la presente invención proporciona un kit para su uso en medir la actividad de un transportador de ABC o un fragmento del mismo en una muestra biológica *in vitro* o *in vivo* que comprende (i) una composición que comprende un compuesto seleccionado de 308-312, 313, 315, 316, 318, 320 y 322 o cualquiera de las realizaciones anteriores; y (ii) instrucciones para a.) poner en contacto la composición con la muestra biológica y b.) medir la actividad de dicho transportador de ABC o un fragmento del mismo. En una realización, el kit comprende además instrucciones para a.) poner en contacto una composición adicional con la muestra biológica; b.) medir la actividad de dicho transportador de ABC o un fragmento del mismo en presencia de dicho compuesto adicional, y c.) comparar la actividad del transportador de ABC en presencia del compuesto adicional con la densidad del transportador de ABC en presencia de un compuesto seleccionado de 308-312, 313, 315, 316, 318, 320 y 322. En realizaciones preferidas, el kit se usa para medir la densidad de CFIR.

Con el fin de que la invención descrita en el presente documento pueda entenderse más completamente, se exponen los siguientes ejemplos. Debe entenderse que estos ejemplos son para fines ilustrativos solo y no deben interpretarse de ninguna manera como limitantes de la presente invención.

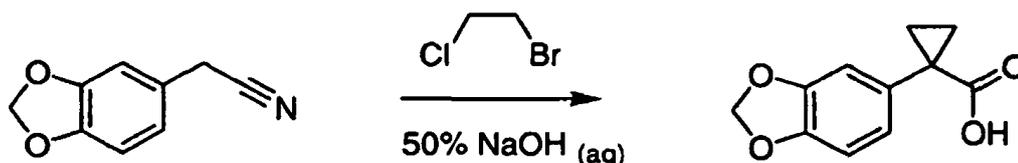
## VI. PREPARACIONES Y EJEMPLOS

### Procedimiento general I: Elemento estructural de ácido carboxílico



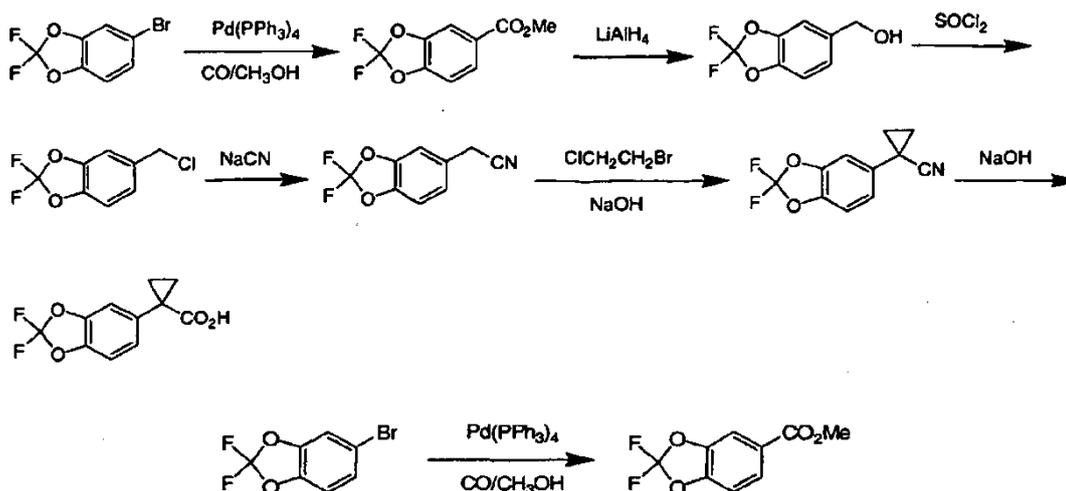
Se añadieron cloruro de benciltrietilamonio (0,025 equivalentes) y el compuesto de dihalógeno apropiado (2,5 equivalentes) a un fenilacetoniitrilo sustituido. La mezcla se calentó a 70 °C y a continuación se añadió lentamente hidróxido sódico al 50 % (10 equivalentes) a la mezcla. La reacción se agitó a 70 °C durante 12-24 horas para garantizar la formación completa del resto cicloalquilo y a continuación se calentó a 130 °C durante 24-48 horas para garantizar la conversión completa del nitrilo en el ácido carboxílico. La mezcla de reacción marrón oscura / negra se diluyó con agua y se extrajo con diclorometano tres veces para eliminar los productos secundarios. La disolución acuosa básica se acidificó con ácido clorhídrico concentrado a pH inferior a uno y el precipitado que empezó a formarse a pH 4 se filtró y se lavó con ácido clorhídrico 1 M dos veces. El material sólido se disolvió en diclorometano y se extrajo dos veces con ácido clorhídrico 1 M y una vez con una disolución acuosa saturada de cloruro sódico. La disolución orgánica se secó sobre sulfato de sodio y se evaporó a sequedad dando el ácido cicloalquilcarboxílico. El rendimiento y las perezas fueron normalmente superiores al 90 %.

### Ejemplo 1: Ácido 1-benzo[1,3]dioxol-5-il-ciclopropanocarboxílico



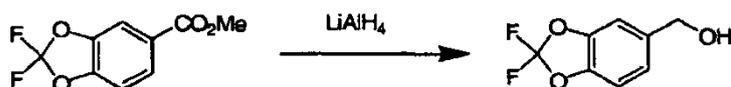
Se calentó una mezcla de 2-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)acetoniitrilo (5,10 g, 31,7 mmoles), 1-bromo-2-cloro-etano (9,00 ml, 109 mmoles) y cloruro de benciltrietilamonio (0,181 g, 0,795 mmoles) a 70 °C y a continuación se añadió lentamente hidróxido sódico acuoso al 50 % (peso/peso) (26 ml) a la mezcla. La reacción se agitó a 70 °C durante 24 horas y a continuación se calentó a 130 °C durante 48 horas. La mezcla de reacción marrón oscura se diluyó con agua (400 ml) y se extrajo una vez con un volumen igual de acetato de etilo y una vez con un volumen igual de diclorometano. La disolución acuosa básica se acidificó con ácido clorhídrico concentrado a pH inferior a uno y el precipitado se filtró y se lavó con ácido clorhídrico 1 M. El material sólido se disolvió en diclorometano (400 ml) y se extrajo dos veces con volúmenes iguales de ácido clorhídrico 1 M y una vez con una disolución acuosa saturada de cloruro sódico. La disolución orgánica se secó sobre sulfato de sodio y se evaporó a sequedad dando un sólido de blanco a ligeramente blanquecino (5,23 g, 80 %). EM-ESI  $m/z$  calc. 206,1, hallado 207,1 ( $M+1$ )<sup>+</sup>. Tiempo de retención 2,37 minutos. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  1,07-1,11 (m, 2H), 1,38-1,42 (m, 2H), 5,98 (s, 2H), 6,79 (m, 2H), 6,88 (m, 1H), 12,26 (s, 1H).

### Ejemplo 2: Ácido 1-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-il)-ciclopropanocarboxílico



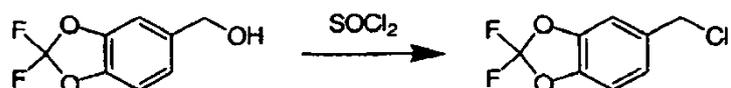
### Éster metílico del ácido 2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-carboxílico

Se agitó una disolución de 5-bromo-2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol (11,8 g, 50,0 mmoles) y tetraquis(trifenilfosfina)paladio (0) [Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, 5,78 g, 5,00 mmoles] en metanol (20 ml) que contenía acetonitrilo (30 ml) y trietilamina (10 ml) bajo una atmósfera de monóxido de carbono (55 psi) a 75 °C (temperatura del baño de aceite) durante 15 horas. La mezcla de reacción enfriada se filtró y el filtrado se evaporó a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice dando éster metílico del ácido 2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-carboxílico en bruto (11,5 g), que se usó directamente en la siguiente etapa.



5 **(2,2-Difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-il)-metanol**

Se añadió éster metílico del ácido 2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-carboxílico en bruto (11,5 g) disuelto en 20 ml de tetrahidrofurano (THF) anhidro lentamente a una suspensión de hidruro de litio y aluminio (4,10 g, 106 mmoles) en THF anhidro (100 ml) a 0 °C. A continuación, la mezcla se calentó hasta temperatura ambiente. Después de agitarse a temperatura ambiente durante 1 hora, la mezcla de reacción se enfrió a 0 °C y se trató con agua (4,1 g), seguido de hidróxido sódico (disolución acuosa al 10 %, 4,1 ml). La suspensión resultante se filtró y se lavó con THF. El filtrado combinado se evaporó a sequedad y el residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice dando (2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-il)-metanol (7,2 g, 38 mmoles, 76 % durante dos etapas) como un aceite incoloro.



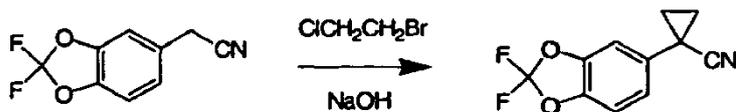
20 **5-Clorometil-2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol**

Se añadió lentamente cloruro de tionilo (45 g, 38 mmoles) a una disolución de (2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-il)-metanol (7,2 g, 38 mmoles) en diclorometano (200 ml) a 0 °C. La mezcla resultante se agitó durante la noche a temperatura ambiente y a continuación se evaporó a sequedad. El residuo se repartió entre una disolución acuosa de bicarbonato sódico saturado (100 ml) y diclorometano (100 ml). La fase acuosa separada se extrajo con diclorometano (150 ml) y la fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó a sequedad dando 5-clorometil-2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol en bruto (4,4 g), que se usó directamente en la siguiente etapa.



35 **(2,2-Difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-il)-acetonitrilo**

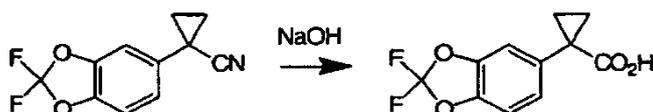
Se agitó una mezcla de 5-clorometil-2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol en bruto (4,4 g) y cianuro de sodio (1,36 g, 27,8 mmoles) en sulfóxido de dimetilo (50 ml) a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se vertió en hielo y se extrajo con acetato de etilo (300 ml). La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio y se evaporó a sequedad dando (2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-il)-acetonitrilo en bruto (3,3 g) que se usó directamente en la siguiente etapa.



45 **1-(2,2-Difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-il)-ciclopropanocarbonitrilo**

Se añadió lentamente hidróxido sódico (disolución acuosa al 50 %, 10 ml) a una mezcla de (2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-il)-acetonitrilo en bruto, cloruro de benciltrietilamonio (3,00 g, 15,3 mmoles) y 1-bromo-2-cloroetano (4,9 g, 38 mmoles) a 70 °C.

La mezcla se agitó durante la noche a 70 °C antes de diluir la mezcla de reacción con agua (30 ml) y se extrajo con acetato de etilo. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio y se evaporaron a sequedad dando 1-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-il)-ciclopropanocarbonitrilo en bruto, que se usó directamente en la siguiente etapa.



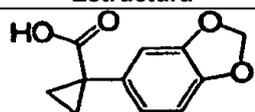
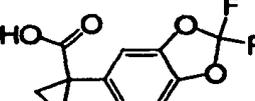
60 **Ácido 1-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-il)-ciclopropanocarboxílico**

Se sometió 1-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-il)-ciclopropanocarbonitrilo (en bruto de la última etapa) a reflujo en hidróxido sódico acuoso al 10 % (50 ml) durante 2,5 horas. La mezcla de reacción enfriada se lavó con éter (100 ml)

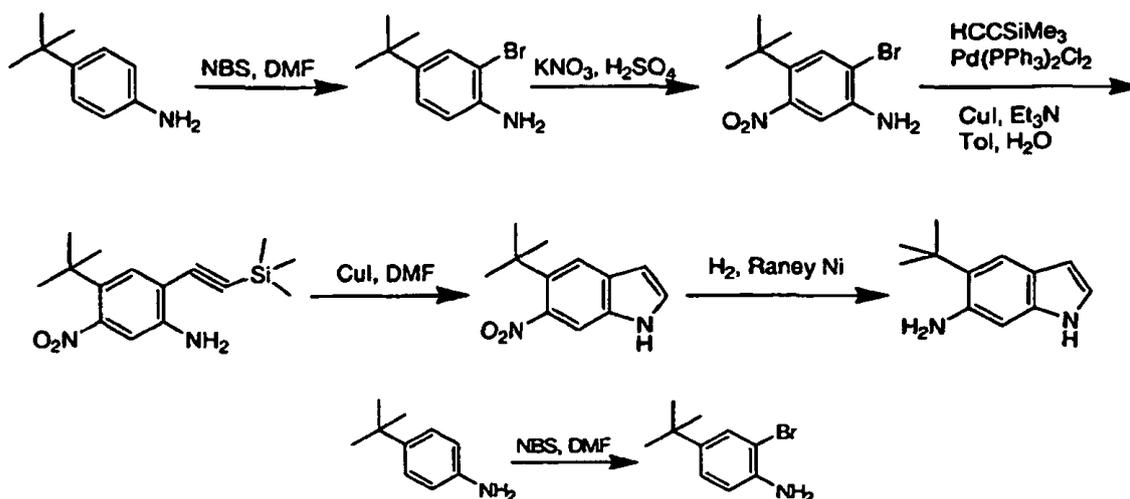
y la fase acuosa se acidificó hasta pH 2 con ácido clorhídrico 2 M. El sólido precipitado se filtró dando ácido 1-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-il)-ciclopropanocarboxílico como un sólido blanco (0,15 g, 1,6 % durante cuatro etapas). EM-ESI  $m/z$  calc. 242,04, hallado 241,58 ( $M+1$ )<sup>+</sup>; RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 7,14-7,04 (m, 2H), 6,98-6,96 (m, 1H), 1,74-1,64 (m, 2H), 1,26-1,08 (m, 2H).

La siguiente Tabla 2 contiene una lista de elementos estructurales de ácido carboxílico que estuvieron comercialmente disponibles, o se prepararon por uno de los tres métodos descritos anteriormente:

Tabla 2: Elementos estructurales de ácido carboxílico.

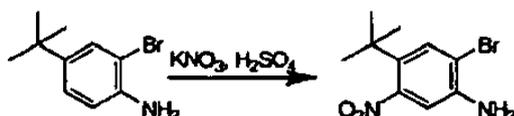
Nombre	Estructura
Acido 1-benzo[1,3]dioxol-5-ilciclopropano-1-carboxílico	
Acido 1-(2,2-difluorobenzo[1,3]dioxol-5-il)ciclopropano-1-carboxílico	

### Ejemplo 3: 5-*tert*-Butil-1H-indol-6-ilamina



### 2-Bromo-4-*tert*-butil-fenilamina

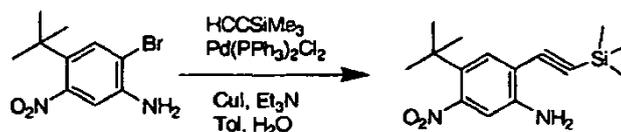
A una disolución de 4-*tert*-butil-fenilamina (447 g, 3,00 moles) en DMF (500 ml) se añadió gota a gota NBS (531 g, 3,00 moles) en DMF (500 ml) a temperatura ambiente. Tras completarse, la mezcla de reacción se diluyó con agua y se extrajo con EtOAc. La fase orgánica se lavó con agua, salmuera, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentró. El producto en bruto se usó directamente en la siguiente etapa sin más purificación.



### 2-Bromo-4-*tert*-butil-5-nitro-fenilamina

Se añadió gota a gota 2-bromo-4-*tert*-butil-fenilamina (160 g, 0,71 moles) a H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (410 ml) a temperatura ambiente dando una disolución transparente. Esta disolución transparente se enfrió a continuación a -5 a -10 °C. Se añadió gota a gota una disolución de KNO<sub>3</sub> (83 g, 0,82 moles) en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (410 ml) mientras que la temperatura se mantuvo entre -5 y -10 °C. Tras completarse, la mezcla de reacción se vertió en hielo / agua y se extrajo con EtOAc. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con 5 % de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y salmuera, se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentraron. El residuo se purificó por una cromatografía en columna (acetato de etilo/éter de petróleo 1:10) dando 2-bromo-4-*tert*-butil-5-nitro-fenilamina como un sólido amarillo (150 g, 78 %).

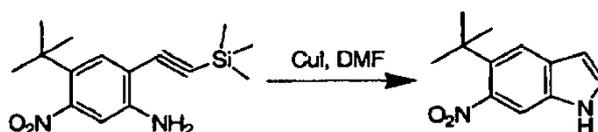
5



#### 4-*tert*-Butil-5-nitro-2-trimetilsilaniletinil-fenilamina

10 A una mezcla de 2-bromo-4-*tert*-butil-5-nitro-fenilamina (27,3 g, 100 mmoles) en tolueno (200 ml) y agua (100 ml) se añadió Et<sub>3</sub>N (27,9 ml, 200 mmoles), Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2,11 g, 3,00 mmoles), CuI (950 mg, 0,500 mmoles) y trimetilsililacetileno (21,2 ml, 150 mmoles) bajo una atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se calentó a 70 °C en un matraz a presión cerrado durante 2,5 h, se enfrió hasta temperatura ambiente y se filtró a través de un tapón corto de Celite. La torta de filtración se lavó con EtOAc. El filtrado combinado se lavó con disolución al 5 % de NH<sub>4</sub>OH y agua, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentró. El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna (0 - 10 % de acetato de etilo/éter de petróleo) para proporcionar 4-*tert*-butil-5-nitro-2-trimetilsilaniletinil-fenilamina como un líquido viscoso marrón (25 g, 81 %).

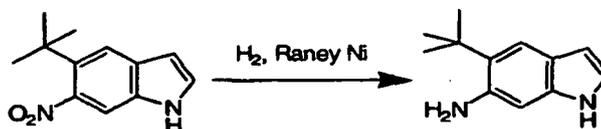
20



#### 5-*tert*-Butil-6-nitro-1H-indol

25 A una disolución de 4-*tert*-butil-5-nitro-2-trimetilsilaniletinil-fenilamina (25 g, 86 mmoles) en DMF (100 ml) se añadió CuI (8,2 g, 43 mmoles) bajo una atmósfera de nitrógeno. La mezcla se calentó a 135 °C en un matraz a presión cerrado durante la noche, se enfrió hasta temperatura ambiente y se filtró a través de un tapón corto de Celite. La torta de filtración se lavó con EtOAc. El filtrado combinado se lavó con agua, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentró. El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna (10 - 20 % de acetato de etilo/hexano) proporcionando 5-*tert*-butil-6-nitro-1H-indol como un sólido amarillo (13 g, 69 %).

35

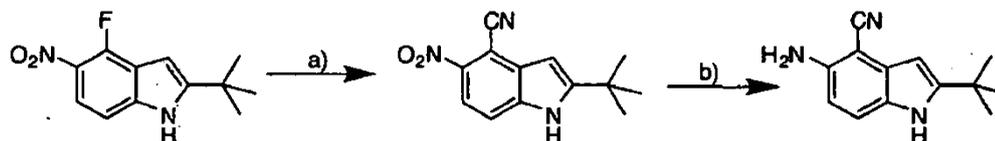


#### 5-*tert*-Butil-1H-indol-6-ilamina

40 Se añadió níquel Raney (3 g) a 5-*tert*-butil-6-nitro-1H-indol (15 g, 67 mmoles) en metanol (100 ml). La mezcla se agitó bajo hidrógeno (1 atm) a 30 °C durante 3 h. El catalizador se separó por filtración. El filtrado se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentró. El aceite viscoso marrón oscuro en bruto se purificó por cromatografía en columna (10 - 20 % de acetato de etilo/éter de petróleo) dando 5-*tert*-butil-1H-indol-6-ilamina como un sólido gris (11 g, 87 %). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 10,3 (s, 1H), 7,2 (s, 1H), 6,9 (m, 1H), 6,6 (s, 1H), 6,1 (m, 1H), 4,4 (s, 2H), 1,3 (s, 9H).

#### Ejemplo 4: 5-Amino-2-*tert*-butil-1H-indol-4-carbonitrilo

50



55

a) KCN, DMSO; b) Pd/C, EtOAc

Etapa a: 2-*tert*-butil-5-nitro-1H-indol-4-carbonitrilo

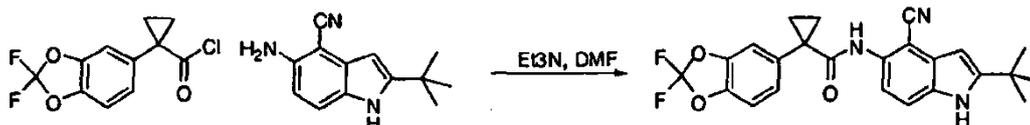
60 A una disolución de 2-*tert*-butil-4-fluoro-5-nitro-1H-indol (4,0 g, 17 mmoles) en DMSO (30 ml) se añadió KCN (3,4 g, 51 mmoles). La mezcla se agitó a 70 °C durante 3 horas, y se vertió en agua (80 ml) y se extrajo con acetato de etilo (50 ml x 3). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentraron a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (7 % de EtOAc en éter de petróleo) proporcionando 2-*tert*-butil-5-nitro-1H-indol-4-carbonitrilo (2,2 g, 53 %). RMN <sup>1</sup>H (DMSO, 300 MHz) δ 12,23 (s, 1H), 8,09 (d, J = 9,0 Hz, 1H), 7,75 (d, J = 9,0 Hz, 1H), 6,50 (s, 1H), 1,38 (s, 9H). EM (ESI) m/z: 244,2 [M+H<sup>+</sup>].

65

Etapa b: 5-amino-2-*tert*-butil-1H-indol-4-carbonitrilo

A una disolución de 2-*tert*-butil-5-nitro-1H-indol-4-carbonitrilo (550 mg, 2,3 mmoles) en EtOAc (10 ml) se añadió Ni Raney (0,1 g) bajo una atmósfera de nitrógeno. La mezcla se agitó bajo atmósfera de hidrógeno (1 atm) a temperatura ambiente durante 1 h. El catalizador se filtró sobre Celite y el filtrado se evaporó a vacío proporcionando 5-amino-2-*tert*-butil-1H-indol-4-carbonitrilo (250 mg, 51 %). RMN <sup>1</sup>H (DMSO, 300 MHz) δ 10,93 (s a, 1H), 7,25 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H), 6,49 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H), 5,94 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H), 5,40 (s a, 2H), 1,30 (s, 9H). EM (ESI) *m/z*: 214,0 [M+H<sup>+</sup>].

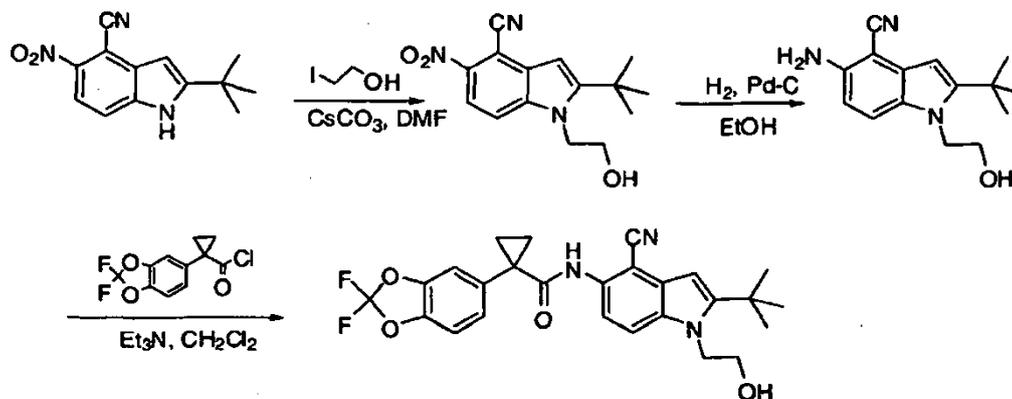
**Ejemplo 6:** N-(2-*tert*-butil-4-ciano-1H-indol-5-il)-1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)ciclopropanocarboxamida



Etapa a: N-(2-*tert*-butil-4-ciano-1H-indol-5-il)-1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)ciclopropanocarboxamida

Se añadió cloruro de 1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)ciclopropanocarbonilo (26 mg, 0,1 mmoles) a una disolución de 5-amino-2-*tert*-butil-1H-indol-4-carbonitrilo (21 mg, 0,1 mmoles) y trietilamina (41,7 µl, 0,3 mmoles) en DMF (1 ml). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche, a continuación se filtró y se purificó por HPLC de fase inversa dando el producto N-(2-*tert*-butil-4-ciano-1H-indol-5-il)-1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)ciclopropanocarboxamida. EM-ESI *m/z* calc. 437,2, hallado 438,7 (M+1)<sup>+</sup>. Tiempo de retención 2,10 minutos. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*6) δ 11,48 (s, 1H), 8,88 (s, 1H), 7,52 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H), 7,41 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 7,32 (dd, *J* = 1,5, 8,3 Hz, 1H), 7,03 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H), 6,21 (d, *J* = 1,8 Hz, 1H), 1,51 - 1,49 (m, 2H), 1,36 (s, 9H), 1,18 - 1,16 (m, 2H).

**Ejemplo 7:** N-(2-*tert*-butil-4-ciano-1-(2-hidroxietyl)-1H-indol-5-il)-1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)ciclopropanocarboxamida



Etapa a: 2-*tert*-butil-1-(2-hidroxietyl)-5-nitro-1H-indol-4-carbonitrilo

Se calentó una mezcla de 2-*tert*-butil-5-nitro-1H-indol-4-carbonitrilo (200 mg, 0,82 mmoles), 2-yodoetanol (77 µl, 0,98 mmoles), carbonato de cesio (534 mg, 1,64 mmoles) y DMF (1,3 ml) a 90 °C durante la noche. A continuación se añadió más 2-yodoetanol (77 µl, 0,98 mmoles) y la reacción se agitó a 90 °C durante 3 días. La mezcla de reacción se repartió entre acetato de etilo y agua. La fase acuosa se lavó con acetato de etilo y a continuación las fases de acetato de etilo combinadas se lavaron con agua (x3) y salmuera, se secaron sobre MgSO<sub>4</sub> y se concentraron. El residuo se purificó por cromatografía en columna (50 - 100 % de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> - hexanos) dando el producto como un sólido amarillo (180 mg, ~25 % de pureza por RMN, el producto co-eluye con el material de partida de indol). EM-ESI *m/z* calc. 287,1, hallado 288,5 (M+1)<sup>+</sup>. Tiempo de retención 1,59 minutos. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*6) δ 12,23 (s, 1H), 8,14 (d, *J* = 9,1 Hz, 1H), 8,02 (d, *J* = 9,1 Hz, 1H), 6,60 (s, 1H), 5,10 (t, *J* = 5,5 Hz, 1H), 4,55 (t, *J* = 6,3 Hz, 2H), 3,78 - 3,73 (m, 2H) y 1,49 (s, 9H) ppm.

Etapa b: 5-amino-2-*tert*-butil-1-(2-hidroxietyl)-1H-indol-4-carbonitrilo

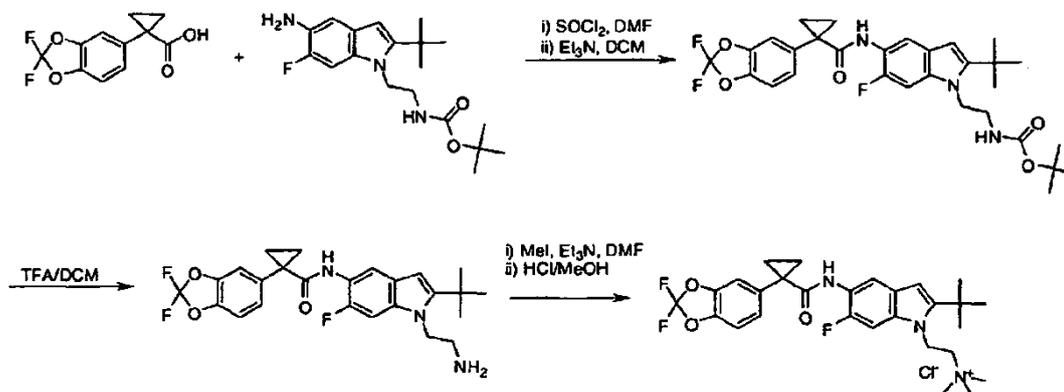
A una disolución de 2-*tert*-butil-1-(2-hidroxietyl)-5-nitro-1H-indol-4-carbonitrilo (180 mg, 0,63 mmoles) en etanol (6 ml) bajo atmósfera de N<sub>2</sub> se añadió Pd-C (5 % en peso, 18 mg). La reacción se lavó con N<sub>2</sub> (g) y a continuación con H<sub>2</sub> (g) y se agitó bajo H<sub>2</sub> (atm) a temperatura ambiente durante 1,5 horas. La reacción se filtró sobre Celite y se

concentró dando el producto (150 mg, 93 %). EM-ESI  $m/z$  calc. 257,2, hallado 258,5 ( $M+1$ )<sup>+</sup>. Tiempo de retención 1,26 minutos.

Etapa c: N-(2-*tert*-butil-4-ciano-1-(2-hidroxietyl)-1H-indol-5-il)-1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)ciclopropanocarboxamida

Se añadió cloruro de 1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)ciclopropanocarbonilo (196 mg, 0,75 mmoles) a una disolución de 5-amino-2-*tert*-butil-1-(2-hidroxietyl)-1H-indol-4-carbonitrilo (150 mg, 0,58 mmoles) y trietilamina (242  $\mu$ l, 1,74 mmoles) en diclorometano (2 ml). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se diluyó con diclorometano y se extrajo con disolución 1 N de HCl (x2), disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (x2), salmuera, se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtró y se concentró. El residuo se disolvió en DMSO y se purificó por HPLC de fase inversa dando el producto N-(2-*tert*-butil-4-ciano-1-(2-hidroxietyl)-1H-indol-5-il)-1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)ciclopropanocarboxamida. EM-ESI  $m/z$  calc. 481,2, hallado 482,5 ( $M+1$ )<sup>+</sup>. Tiempo de retención 1,99 minutos. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  8,93 (s, 1H), 7,71 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 7,51 (s, 1H), 7,42 (d, J = 8,3 Hz, 1H), 7,33 (d, J = 1,6 Hz, 1H), 7,08 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 6,28 (s, 1H), 5,05 (t, J = 5,6 Hz, 1H), 4,42 (t, J = 6,8 Hz, 2H), 3,70 - 3,65 (m, 2H), 1,51 - 1,48 (m, 2H), 1,44 (s, 9H), 1,19 - 1,16 (m, 2H).

**Ejemplo 8: Cloruro de 2-(2-*tert*-butil-5-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)ciclopropanocarboxamido)-6-fluoro-1H-indol-1-il)-N,N,N-trimetiletanamino**



Etapa a: 2-(2-*tert*-butil-5-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)ciclopropanocarboxamido)-6-fluoro-1H-indol-1-il)etilcarbamato de *tert*-butilo

A ácido 1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)ciclopropanocarboxílico (90,14 mg, 0,3722 mmoles) en cloruro de tionilo (81,28  $\mu$ l, 1,117 mmoles) se añadió *N,N*-dimetilformamida (8,204  $\mu$ l, 0,1064 mmoles). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos antes de eliminarse a vacío el exceso de cloruro de tionilo y *N,N*-dimetilformamida dando el cloruro de ácido. El cloruro de ácido se disolvió a continuación en diclorometano (1,5 ml) y se añadió lentamente a una disolución de 2-(5-amino-2-*tert*-butil-6-fluoro-1H-indol-1-il)etilcarbamato de *tert*-butilo (156,1 mg, 0,4467 mmoles) y trietilamina (155,6  $\mu$ l, 1,117 mmoles) en diclorometano (1,5 ml). La mezcla de reacción resultante se agitó a temperatura ambiente durante 21 horas. La mezcla de reacción se diluyó con diclorometano (5 ml) y se lavó con HCl 1 N acuoso (5 ml) y una disolución acuosa saturada de NaHCO<sub>3</sub> (5 ml). La fase orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se evaporó a presión reducida. El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (0-30 % de acetato de etilo en hexano) dando 2-(2-*tert*-butil-5-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)ciclopropanocarboxamido)-6-fluoro-1H-indol-1-il)etilcarbamato de *tert*-butilo como un sólido blanco (140 mg, 66 %). EM-ESI  $m/z$  calc. 573,2, hallado 574,7 ( $M+1$ )<sup>+</sup>. Tiempo de retención 2,41 minutos. RMN <sup>1</sup>H (400,0 MHz, DMSO)  $\delta$  8,35 (s, 1H), 7,53 (s, 1H), 7,44 - 7,41 (m, 2H), 7,34 - 7,29 (m, 2H), 7,13 - 7,10 (m, 1H), 6,17 (s, 1H), 4,24 - 4,20 (m, 2H), 3,20 - 3,17 (m, 2H), 1,48-1,45 (m, 2H), 1,41 (s, 18H) y 1,15-1,12 (m, 2H) ppm.

Etapa b: N-(1-(2-aminoethyl)-2-*tert*-butil-6-fluoro-1H-indol-5-il)-1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)ciclopropanocarboxamida

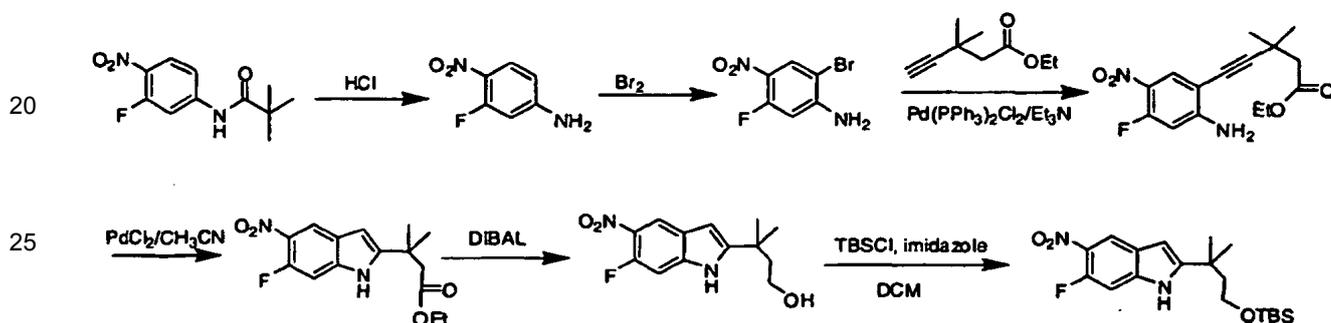
A una disolución de 2-(2-*tert*-butil-5-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)ciclopropanocarboxamido)-6-fluoro-1H-indol-1-il)etilcarbamato de *tert*-butilo (137,5 mg, 0,24 mmoles) en diclorometano (1,8 ml) se añadió ácido trifluoroacético (444  $\mu$ l, 5,8 mmoles) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se diluyó con diclorometano y se lavó con disolución acuosa saturada de NaHCO<sub>3</sub> (3 ml) y salmuera (3 ml). La fase orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se evaporó a presión reducida. El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (0-10 % de metanol en diclorometano) dando N-(1-(2-aminoethyl)-2-*tert*-butil-6-fluoro-1H-indol-5-il)-1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)ciclopropanocarboxamida como un sólido blanco (93,7 mg, 82 %). EM-ESI  $m/z$  calc. 473,19, hallado 474,5 ( $M+1$ )<sup>+</sup>. Tiempo de retención 1,61 minutos.

Etapa c: cloruro de 2-(2-*tert*-butil-5-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)ciclopropanocarboxamido)-6-fluoro-1H-

indol-1-il)-N,N,N-trimetiletanaminio

A una disolución transparente de N-(1-(2-aminoetil)-2-*tert*-butil-6-fluoro-1H-indol-5-il)-1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)ciclopropanocarboxamida (50 mg, 0,1056 mmoles) en *N,N*-dimetilformamida (1 ml) se añadieron yoduro de metilo (336,8 mg, 147,7  $\mu$ l, 2,37 mmoles) y trietilamina (106,9 mg, 147,2  $\mu$ l, 1,05 mmoles) y la mezcla se calentó a 80 °C durante 2 horas. El producto en bruto se purificó por HPLC preparativa en fase inversa. Se disolvieron 22 mg de este producto en HCl 1,25 M en metanol (112  $\mu$ l, 0,14 mmoles) y se calentó a 60 °C durante 1 hora. La reacción se enfrió a temperatura ambiente. El producto se secó primero y a continuación se disolvió en diclorometano y se secó de nuevo. Este procedimiento se repitió cuatro veces dando cloruro de 2-(2-(*tert*-butil-5-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)ciclopropanocarboxamido)-6-fluoro-1H-indol-1-il)-N,N,N-trimetiletanaminio. EM-ESI  $m/z$  calc. 516,25, hallado 516,7 ( $M+1$ )<sup>+</sup>. Tiempo de retención 1,69 minutos. RMN <sup>1</sup>H (400,0 MHz, DMSO)  $\delta$  8,43 (s, 1H), 7,53 (s, 1H), 7,45 - 7,41 (m, 2H), 7,36 - 7,31 (m, 2H), 6,27 (s, 1H), 4,74 - 4,70 (m, 2H), 3,57 - 3,53 (m, 2H), 3,29 (s, 9H), 1,48 - 1,42 (m, 11H) y 1,15 (dd,  $J = 3,9, 6,8$  Hz, 2H) ppm.

#### Ejemplo 9: 2-(4-(*Terc*-butildimetilsililoxi)-2-metilbutan-2-il)-6-fluoro-5-nitro-1H-indol



#### Etapa a: 3-fluoro-4-nitroanilina

Una mezcla de N-(3-fluoro-4-nitro-fenil)-2,2-dimetil-propionamida (87,0 g, 0,36 moles) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (400 ml) y ácido clorhídrico 6 N (800 ml) se calentó a reflujo durante 2 horas. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se diluyó con 1000 ml de acetato de etilo y se añadió en porciones carbonato de potasio (500,0 g). La disolución acuosa se separó y la fase orgánica se lavó con salmuera y se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro. El disolvente se eliminó mediante evaporación a presión reducida; el residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (éter de petróleo / acetato de etilo 30:1) proporcionando 3-fluoro-4-nitroanilina (56,0 g, 99 %). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,07 (t,  $J = 8,7$  Hz, 1H), 7,86 (dd,  $J = 2,1, 13,2$  Hz, 1H), 7,59 (s a, 2H), 7,22 (s, 1H).

#### Etapa b: 2-bromo-5-fluoro-4-nitroanilina

A una disolución de 3-fluoro-4-nitroanilina (56 g, 0,36 moles) en ácido acético (500 ml) se añadió gota a gota bromo (17,7 ml, 0,36 moles) durante 1 hora. La mezcla de reacción se agitó durante 1 hora a 0-5 °C en un baño de hielo. La mezcla de reacción se basificó con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  saturado y se extrajo con acetato de etilo (200 ml x 3). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida dando un residuo que se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (éter de petróleo / acetato de etilo 10 : 1) dando la 2-bromo-5-fluoro-4-nitroanilina (45,6 g, 84 %) como un sólido amarillo. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,29 (d,  $J = 7,6$  Hz, 1H), 6,53 (d,  $J = 12,4$  Hz, 1H), 4,94 (s a, 2H).

#### Etapa c: 5-(2-amino-4-fluoro-5-nitrofenil)-3,3-dimetilpent-4-inoato de etilo

A una disolución de 2-bromo-5-fluoro-4-nitroanilina (45,7 g, 0,19 moles) y 3,3-dimetilpent-4-inoato de etilo (88,3 g, 0,57 moles) en  $\text{Et}_3\text{N}$  (700 ml) se añadió Pd( $\text{PPh}_3$ )<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (13,8 g, 0,02 moles) y CuI (3,6 g, 0,02 moles) bajo  $\text{N}_2$ . La mezcla de reacción se agitó a 70 °C durante 8 horas. La mezcla de reacción se diluyó con 500 ml de acetato de etilo y 1500 ml de agua. La fase orgánica se separó y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (500 ml x 3), las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera y se secaron sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, se filtraron y se evaporaron a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (éter de petróleo / acetato de etilo 10: 1) dando 5-(2-amino-4-fluoro-5-nitrofenil)-3,3-dimetilpent-4-inoato de etilo (34,5 g, 57 %). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,05 (d,  $J = 8,1$  Hz, 1H), 6,36 (d,  $J = 13,2$  Hz, 1H), 5,60 (s a, 2H), 4,16 (q,  $J = 7,2$  Hz, 2H), 2,51 (s, 2H), 1,40 (s, 6H), 1,28 (t,  $J = 7,2$  Hz, 3H).

#### Etapa d: 3-(6-fluoro-5-nitro-1H-indol-2-il)-3-metilbutanoato de etilo

A una mezcla de 5-(2-amino-4-fluoro-5-nitrofenil)-3,3-dimetilpent-4-inoato de etilo (34,5 g, 0,11 moles) y PdCl<sub>2</sub> (10,4 g, 58,6 nmoles) en  $\text{CH}_3\text{CN}$  (350 ml) se calentó a reflujo durante 1,5 horas. La mezcla de reacción se enfrió hasta

temperatura ambiente. Se añadió acetato de etilo (300 ml), el precipitado se separó por filtración y se lavó con metanol. El filtrado se concentró a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (éter de petróleo / acetato de etilo 40: 1) dando 3-(6-fluoro-5-nitro-1H-indol-2-il)-3-metilbutanoato de etilo (34,0 g, 98 %) como un sólido amarillo oscuro. RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 10,11 (s a, 1H), 8,30 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H), 7,14 (d, *J* = 11,7 Hz, 1H), 6,35 (d, *J* = 1,5 Hz, 1H), 4,17 (q, *J* = 7,2 Hz, 2H), 2,69 (s, 2H), 1,51 (s, 6H), 1,25 (t, *J* = 7,2 Hz, 3H).

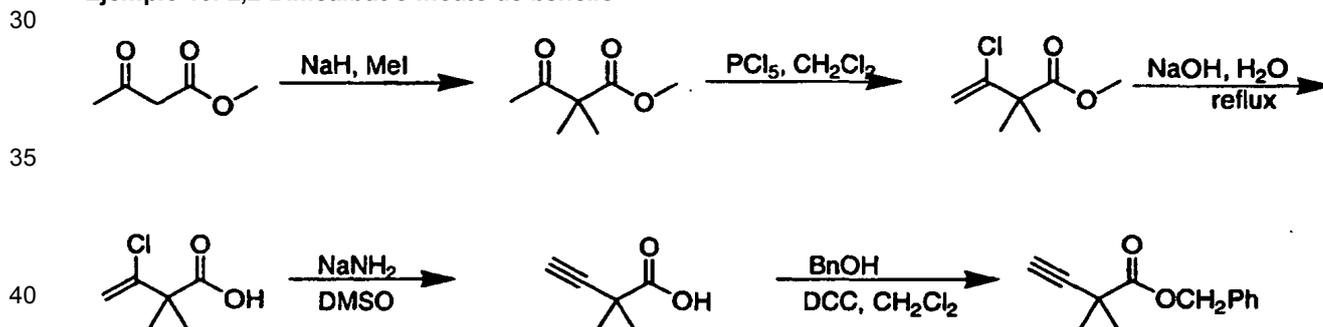
Etapa e: 3-(6-fluoro-5-nitro-1H-indol-2-il)-3-metilbutan-1-ol

A una disolución de 3-(6-fluoro-5-nitro-1H-indol-2-il)-3-metilbutanoato de etilo (34 g, 0,11 moles) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (400 ml) se añadió gota a gota DIBAL-H (283,4 ml, 0,27 moles) durante 2 horas a -78 °C. La mezcla de reacción se agitó durante 10 horas a -78 °C y a continuación se extinguió añadiendo agua (200 ml). El precipitado se separó por filtración y se lavó con metanol. El filtrado se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (200 ml x 3), las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (éter de petróleo / acetato de etilo 50: 1) dando 3-(6-fluoro-5-nitro-1H-indol-2-il)-3-metilbutan-1-ol (6,6 g, 22 %). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9,35 (s a, 1H), 8,30 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H), 7,11 (d, *J* = 12,0 Hz, 1H), 6,35 (d, *J* = 1,2 Hz, 1H), 3,74 (t, *J* = 6,4 Hz, 2H), 1,9 (t, *J* = 6,4 Hz, 2H), 1,4 (s, 6H).

Etapa f: 2-(4-(*terc*-butildimetilsililoxi)-2-metilbutan-2-il)-6-fluoro-5-nitro-1H-indol

A una disolución de 3-(6-fluoro-5-nitro-1H-indol-2-il)-3-metilbutan-1-ol (6,6 g, 25 mmoles) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (80 ml) se añadió TBSCl (3,7 g, 25 nmoles) e imidazol (4,2 g, 62 nmoles) a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas. El precipitado se separó por filtración y se lavó con metanol. El filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (éter de petróleo / acetato de etilo 10: 1) dando el producto deseado como un sólido marrón (5,0 g, 53 %). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9,80 (s a, 1H), 8,30 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H), 7,05 (d, *J* = 11,7 Hz, 1H), 6,33 (t, *J* = 1,2 Hz, 1H), 3,7 (t, *J* = 6,0 Hz, 2H), 1,91 (t, *J* = 6,0 Hz, 2H), 1,42 (s, 6H), 0,94 (s, 9H), 0,12 (s, 6H). EM (ESI) *m/z* (M+H<sup>+</sup>): 381,1.

#### Ejemplo 10: 2,2-Dimetilbut-3-inoato de bencilo



Etapa a: 2,2-dimetil-3-oxobutanoato de metilo

A una suspensión de NaH (28,5 g, 0,718 moles, 60 %) en THF (270 ml) se añadió gota a gota una disolución de éster metílico del ácido 3-oxo-butírico (78,6 g, 0,677 moles) en THF (70 ml) a 0 °C. La mezcla se agitó durante 0,5 horas a 0 °C. Se añadió gota a gota MeI (99,0 g, 0,698 moles) a 0 °C. La mezcla resultante se calentó hasta temperatura ambiente y se agitó durante 1 hora. Se añadió NaH (28,5 g, 0,718 moles, 60 %) en porciones a 0 °C y la mezcla resultante continuó agitándose durante 0,5 h a 0 °C. A continuación se añadió gota a gota MeI (99,0 g, 0,698 moles) a 0 °C. La mezcla de reacción se calentó hasta temperatura ambiente y se agitó durante la noche. La mezcla se vertió en agua con hielo. La fase orgánica se separó. La fase acuosa se extrajo con EtOAc (300 ml x 3). Las fases orgánicas combinadas se secaron y se evaporaron a presión reducida dando 2,2-dimetil-3-oxobutanoato de metilo (52 g, 53 %), que se usó directamente en la siguiente etapa.

Etapa b: 3-cloro-2,2-dimetilbut-3-enoato de metilo

A una suspensión de PCl<sub>5</sub> (161 g, 0,772 moles) en diclorometano (600 ml) se añadió gota a gota 2,2-dimetil-3-oxobutanoato de metilo (52 g, 0,361 moles, en bruto de la última etapa) a 0 °C, seguido de la adición de aproximadamente 20 gotas de DMF seca. La mezcla se calentó a reflujo durante la noche. Después de enfriarse, la mezcla de reacción se vertió lentamente en agua con hielo. La fase orgánica se separó y la fase acuosa se extrajo con diclorometano (300 ml x 3). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con disolución acuosa saturada de NaHCO<sub>3</sub> y se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. El disolvente se evaporó dando el producto, 3-cloro-2,2-dimetilbut-3-enoato de metilo, que se usó sin más purificación (47 g, 82 %).

Etapa c: ácido 3-cloro-2,2-dimetilbut-3-enoico

Se calentó una mezcla de 3-cloro-2,2-dimetilbut-3-enoato de metilo (42,0 g, 0,26 moles) y NaOH (12,4 g, 0,31 moles) en agua (300 ml) a reflujo durante la noche. Después de enfriarse, la mezcla de reacción se extrajo con éter. La fase orgánica contuvo 20 g de 3-cloro-2,2-dimetilbut-3-enoato de metilo (se recuperó el 48 %). La fase acuosa se acidificó con disolución fría al 20 % de HCl y se extrajo con éter (250 ml x 3). Las fases orgánicas combinadas se secaron y se evaporaron a presión reducida dando ácido 3-cloro-2,2-dimetilbut-3-enoico (17 g, 44 %), que se usó directamente en la siguiente etapa.

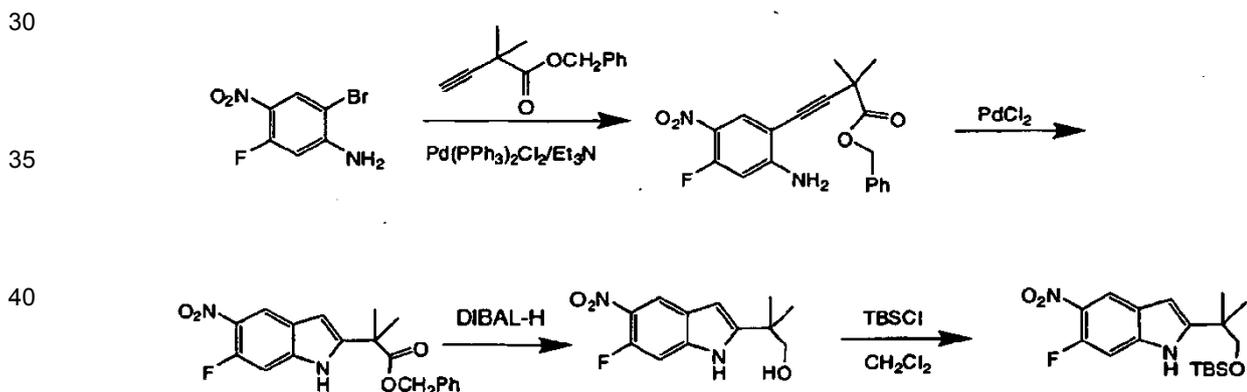
Etapa d: ácido 2,2-dimetilbut-3-inoico

A un matraz de tres bocas (500 ml) se añadió NaNH<sub>2</sub> (17,8 g, 0,458 mmoles, gránulos) y DMSO (50 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente hasta que no se desprendió más NH<sub>3</sub> (g). Se añadió gota a gota una disolución de ácido 3-cloro-2,2-dimetilbut-3-enoico (17,0 g, 114 mmoles) en DMSO (50 ml) a 0 °C. La mezcla se calentó y se agitó a 50 °C durante 5 horas, a continuación se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla se vertió en disolución fría al 20 % de HCl, y a continuación se extrajo tres veces con éter. Los extractos de éter se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentraron dando una relación 6:1 de material de partida y producto de alquino. El residuo se volvió a secar usando éter y Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se volvió a someter a las condiciones de reacción anteriores. La mezcla de reacción se procesó del mismo modo proporcionando ácido 2,2-dimetilbut-3-inoico (12,0 g, 94 %).

2,2-dimetilbut-3-inoato de bencilo

A una disolución con agitación de ácido 2,2-dimetilbut-3-inoico (87,7 g, 0,782 mmoles) y alcohol bencilo (114,6 g, 0,938 moles) en diclorometano (800 ml) se añadió DCC (193,5 g, 0,938 mmoles) a -20 °C. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche y a continuación el disolvente se evaporó a vacío. El residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (2 % de acetato de etilo en éter de petróleo como eluyente) proporcionando 2,2-dimetilbut-3-inoato de bencilo (100 g, rendimiento del 59 %). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ 7,37-7,36 (m, 5H), 5,19 (s, 2H), 2,28 (s, 1H), 1,52 (s, 6H).

**Ejemplo 11: 2-(1-(Terc-butildimetilsililoxi)-2-metilpropan-2-il)-6-fluoro-5-nitro-1H-indol**



Etapa a: 4-(2-amino-4-fluoro-5-nitrofenil)-2,2-dimetilbut-3-inoato de bencilo

A una disolución de 2-bromo-5-fluoro-4-nitroanilina (23,0 g, 0,1 moles) en Et<sub>3</sub>N (250 ml) se añadió anhídrido 2,2-dimetilbut-3-inoico benzoico (59,0 g, 0,29 moles), CuI (1,85 g) y Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2,3 g) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó a 80 °C durante la noche. Después de enfriarse hasta temperatura ambiente, la reacción se inactivó con agua y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (100 ml x 3). La fase orgánica combinada se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, el disolvente se evaporó a vacío. El residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (10 % de acetato de etilo en éter de petróleo) dando 4-(2-amino-4-fluoro-5-nitrofenil)-2,2-dimetilbut-3-inoato de bencilo (20,0 g, 56 %). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 8,05 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,39-7,38 (m, 5H), 6,33 (d, J = 13,2 Hz, 1H), 5,20 (s, 2H), 4,89 (s a, 2H), 1,61 (s, 6H).

Etapa b: 2-(6-fluoro-5-nitro-1H-indol-2-il)-2-metilpropanoato de bencilo

A una disolución de 4-(2-amino-4-fluoro-5-nitrofenil)-2,2-dimetilbut-3-inoato de bencilo (20,0 g, 56 mmoles) en acetonitrilo (100 ml) se añadió PdCl<sub>2</sub> (5,0 g, 28 mmoles) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó a 80 °C durante la noche. La mezcla se separó por filtración y el disolvente se evaporó a vacío, el residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (10 % de EtOAc en éter de petróleo) dando 2-(6-fluoro-5-nitro-1H-indol-2-il)-2-metilpropanoato de bencilo (18,0 g, 90 %). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 8,96 (s a, 1H), 8,33 (d, J = 7,2 Hz, 1H) 7,35-7,28 (m, 5H) 7,08 (d, J = 11,7 Hz, 1H), 6,47 (s, 1H), 5,18 (s, 2H) 1,69 (s, 6H).

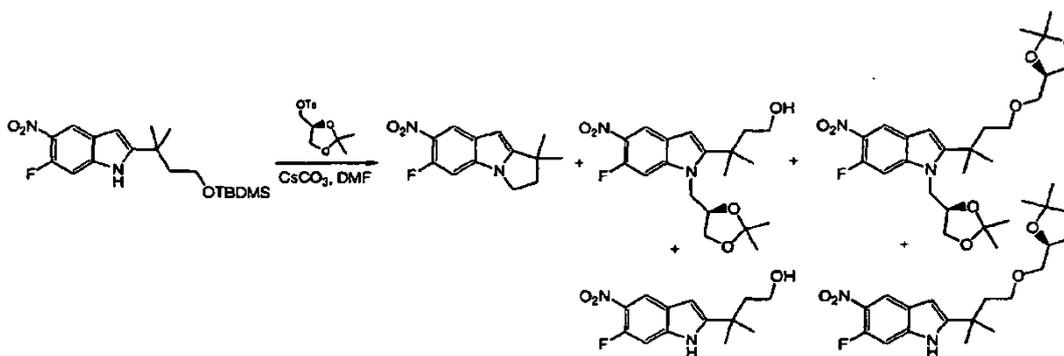
Etapa c: 2-(6-fluoro-5-nitro-1H-indol-2-il)-2-metilpropan-1-ol

A una disolución de 2-(6-fluoro-5-nitro-1H-indol-2-il)-2-metilpropanoato de bencilo (18,0 g, 0,05 moles) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 ml) se añadió DIBAL-H (12 ml) a -78 °C. La mezcla se agitó durante 1 h a esa temperatura y se calentó hasta temperatura ambiente. La reacción se inactivó con agua y la fase acuosa se extrajo con EtOAc (100 ml x 3). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, el disolvente se evaporó a vacío. El residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (10 % de EtOAc en éter de petróleo) dando 2-(6-fluoro-5-nitro-1H-indol-2-il)-2-metilpropan-1-ol (10,0 g, 77 %). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 9,37 (s, 1H), 8,32 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H), 7,11 (d, *J* = 11,7 Hz, 1H), 6,36 (s, 1H), 3,73 (d, *J* = 5,1 Hz 2 H), 1,97 (t, *J* = 5,1 Hz, 1H), 1,39 (s, 6H).

Etapa d: 2-(1-(*tert*-butildimetilsililoxi)-2-metilpropan-2-il)-6-fluoro-5-nitro-1H-indol

A una disolución con agitación de 2-(6-fluoro-5-nitro-1H-indol-2-il)-2-metilpropan-1-ol (10,0 g) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> se añadió TBSCI (8,9 g), imidazol (8,1 g, 0,12 moles) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó durante la noche. El disolvente se evaporó a vacío y el residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (10 % de EtOAc en éter de petróleo) dando 2-(1-(*tert*-butildimetilsililoxi)-2-metilpropan-2-il)-6-fluoro-5-nitro-1H-indol (5,3 g, 38 %). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 9,51 (s, 1H), 8,31 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H), 7,02 (d, *J* = 11,7 Hz, 1H), 6,32 (s, 1H), 3,63 (s, 2H), 1,35 (s, 6H), 0,99 (s, 9H), 0,11 (s, 6H).

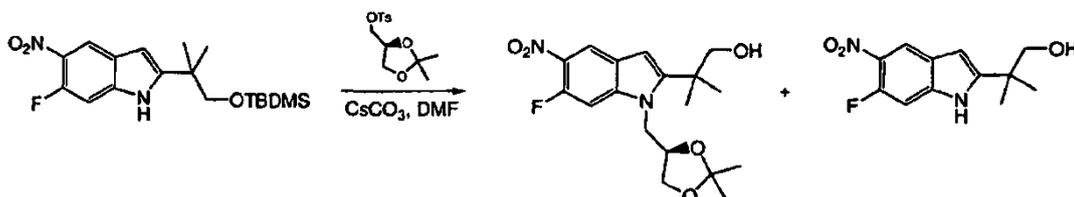
**Ejemplo 12: 6-Fluoro-1,1-dimetil-7-nitro-2,3-dihidro-1H-pirrol[1,2-a]indol, (R)-3-(1-((2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metil)-6-fluoro-5-nitro-1H-indol-2-il)-3-metilbutan-1-ol, 2-(4-(((R)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metoxi)-2-metilbutan-2-il)-1-(((R)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metil)-6-fluoro-5-nitro-1H-indol, 3-(6-fluoro-5-nitro-1H-indol-2-il)-3-metilbutan-1-ol y (R)-2-(4-((2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metoxi)-2-metilbutan-2-il)-6-fluoro-5-nitro-1H-indol**



Etapa a: 6-fluoro-1,1-dimetil-7-nitro-2,3-dihidro-1H-pirrol[1,2-a]indol, (R)-3-(1-((2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metil)-6-fluoro-5-nitro-1H-indol-2-il)-3-metilbutan-1-ol, 2-(4-(((R)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metoxi)-2-metilbutan-2-il)-1-(((R)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metil)-6-fluoro-5-nitro-1H-indol, 3-(6-fluoro-5-nitro-1H-indol-2-il)-3-metilbutan-1-ol y (R)-2-(4-((2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metoxi)-2-metilbutan-2-il)-6-fluoro-5-nitro-1H-indol

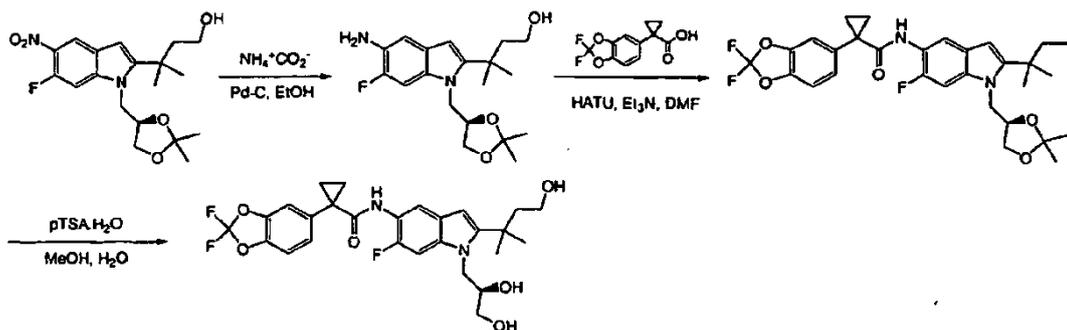
A una disolución de 2-(4-(*tert*-butildimetilsililoxi)-2-metilbutan-2-il)-6-fluoro-5-nitro-1H-indol (1,9 g, 5,0 mmoles) y 4-metilbencenosulfonato de (S)-(2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metilo (2,86 g, 10,0 mmoles) en DMF (10 ml) se añadió Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (4,88 g, 15,0 mmoles). La mezcla se calentó a 90 °C durante 24 horas. La reacción se repartió entre acetato de etilo y agua. La fase acuosa se extrajo con acetato de etilo y las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera y se secaron sobre MgSO<sub>4</sub>. Después de la eliminación del disolvente, el residuo se purificó por cromatografía en columna (10-50 % de acetato de etilo - hexano) proporcionando 6-fluoro-1,1-dimetil-7-nitro-2,3-dihidro-1H-pirrol[1,2-a]indol (600 mg, 48 %). EM-ESI *m/z* calc. 248,1, hallado 249,2 (M+1)<sup>+</sup>. Tiempo de retención 2,00 minutos; 2-(4-(((R)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metoxi)-2-metilbutan-2-il)-1-(((R)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metil)-6-fluoro-5-nitro-1H-indol (270 mg, que contiene algo de (R)-2-(4-((2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metoxi)-2-metilbutan-2-il)-6-fluoro-5-nitro-1H-indol). EM-ESI *m/z* calc. 494,2 y 380,2, hallado 495,4 y 381,4 (M+1)<sup>+</sup>. Tiempo de retención 2,12 y 1,92 minutos; (R)-3-(1-((2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metil)-6-fluoro-5-nitro-1H-indol-2-il)-3-metilbutan-1-ol (1,0 g, que contiene algo de 3-(6-fluoro-5-nitro-1H-indol-2-il)-3-metilbutan-1-ol). EM-ESI *m/z* calc. 380,2 y 266,1, hallado 381,2 y 267,2 (M+1)<sup>+</sup>. Tiempo de retención 1,74 y 1,48 minutos.

**Ejemplo 13: (R)-2-(1-((2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metil)-6-fluoro-5-nitro-1H-indol-2-il)-2-metilpropan-1-ol y 3-(6-fluoro-5-nitro-1H-indol-2-il)-3-metilbutan-1-ol**



Se obtuvo una mezcla que contiene (R)-2-(1-((2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metil)-6-fluoro-5-nitro-1H-indol-2-il)-2-metilpropan-1-ol y 3-(6-fluoro-5-nitro-1H-indol-2-il)-3-metilbutan-1-ol siguiendo el procedimiento mostrado anteriormente a partir de 2-(1-(*tert*-butildimetilsililoxi)-2-metilpropan-2-il)-6-fluoro-5-nitro-1H-indol. (R)-2-(1-((2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metil)-6-fluoro-5-nitro-1H-indol-2-il)-2-metilpropan-1-ol, EM-ESI  $m/z$  calc. 366,2, hallado 367,2 ( $M+1$ )<sup>+</sup>. Tiempo de retención 1,71 minutos; 3-(6-fluoro-5-nitro-1H-indol-2-il)-3-metilbutan-1-ol, EM-ESI  $m/z$  calc. 252,1, hallado 253,4 ( $M+1$ )<sup>+</sup>. Tiempo de retención 1,42 minutos.

**Ejemplo 14: (R)-1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)-N-(1-(2,3-dihidroxiopropil)-6-fluoro-2-(4-hidroxi-2-metilbutan-2-il)-1H-indol-5-il)ciclopropanocarboxamida**



Etapa a: (R)-3-(5-amino-1-((2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metil)-6-fluoro-1H-indol-2-il)-3-metilbutan-1-ol

A una disolución de (R)-3-(1-((2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metil)-6-fluoro-5-nitro-1H-indol-2-il)-3-metilbutan-1-ol que contiene algo de 3-(6-fluoro-5-nitro-1H-indol-2-il)-3-metilbutan-1-ol (500 mg, 1,3 mmoles) en etanol (10 ml) se añadió formiato de amonio (500 mg, 7,9 mmoles) y Pd/C (10 %, 139 mg, 0,13 mmoles). La mezcla se sometió a reflujo durante 5 min. El catalizador de Pd se eliminó mediante filtración a través de Celite y se lavó con etanol. El filtrado se evaporó a sequedad y se purificó por cromatografía en columna (30-50 % de acetato de etilo-hexanos) proporcionando (R)-3-(5-amino-1-((2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metil)-6-fluoro-1H-indol-2-il)-3-metilbutan-1-ol (220 mg, 48 %, contiene algo de 3-(5-amino-6-fluoro-1H-indol-2-il)-3-metilbutan-1-ol). EM-ESI  $m/z$  calc. 350,2 hallado 351,4 ( $M+1$ )<sup>+</sup>. Tiempo de retención 0,94 minutos.

Etapa b: (R)-1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)-N-(1-((2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metil)-6-fluoro-2-(4-hidroxi-2-metilbutan-2-il)-1H-indol-5-il)ciclopropanocarboxamida

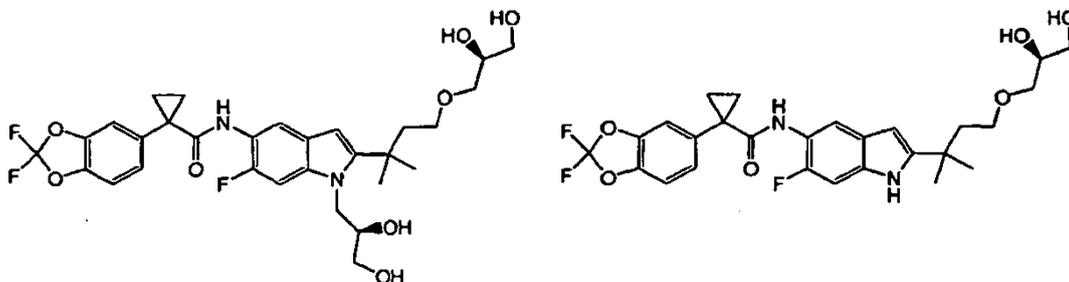
A una mezcla de ácido 1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)ciclopropanocarboxílico (183 mg, 0,75 mmoles), (R)-3-(5-amino-1-((2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metil)-6-fluoro-1H-indol-2-il)-3-metilbutan-1-ol que contiene algo de 3-(5-amino-6-fluoro-1H-indol-2-il)-3-metilbutan-1-ol (220 mg, 0,63 mmoles) y HATU (287 mg, 0,75 mmoles) en DMF (3,0 ml) se añadió trietilamina (0,21 ml, 1,5 mmoles). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche y a continuación se repartió entre acetato de etilo y agua. La fase acuosa se extrajo con acetato de etilo y las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera y se secaron sobre MgSO<sub>4</sub>. Después de la eliminación del disolvente, el residuo se purificó por cromatografía en columna (20-40 % de acetato de etilo - hexanos) proporcionando (R)-1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)-N-(1-((2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metil)-6-fluoro-2-(4-hidroxi-2-metilbutan-2-il)-1H-indol-5-il)ciclopropanocarboxamida (315 mg, 87 %, contiene algo de 1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)-N-(6-fluoro-2-(4-hidroxi-2-metilbutan-2-il)-1H-indol-5-il)ciclopropanocarboxamida). EM-ESI  $m/z$  calc. 574,2 hallado 575,7 ( $M+1$ )<sup>+</sup>. Tiempo de retención 2,08 minutos.

Etapa c: (R)-1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)-N-(1-(2,3-dihidroxiopropil)-6-fluoro-2-(4-hidroxi-2-metilbutan-2-il)-1H-indol-5-il)ciclopropanocarboxamida

A una disolución de (R)-1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)-N-(1-((2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metil)-6-fluoro-2-(4-hidroxi-2-metilbutan-2-il)-1H-indol-5-il)ciclopropanocarboxamida que contiene algo de 1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)-N-(6-fluoro-2-(4-hidroxi-2-metilbutan-2-il)-1H-indol-5-il)ciclopropanocarboxamida (315 mg, 0,55 mmoles) en metanol (3 ml) y agua (0,3 ml) se añadió p-TsOH.H<sub>2</sub>O (21 mg, 0,11 mmoles). La mezcla se calentó a 80 °C durante 30 minutos. La reacción se repartió entre acetato de etilo y agua y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo dos veces. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub> y salmuera y se secaron sobre MgSO<sub>4</sub>. Después de la eliminación del disolvente, el residuo se purificó por cromatografía en columna (20-80 % de acetato de etilo - hexanos) proporcionando (R)-1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)-N-(1-(2,3-dihidroxiopropil)-6-fluoro-2-(4-hidroxi-2-metilbutan-2-il)-1H-indol-5-il)ciclopropanocarboxamida (92 mg, 31 %). EM-ESI  $m/z$  calc. 534,2, hallado 535,5 ( $M+1$ )<sup>+</sup>. Tiempo de retención 1,72 minutos. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8,32 (s, 1H), 7,53 (d, J = 1,0 Hz, 1H), 7,43 - 7,31 (m, 4H), 6,17 (s, 1H), 4,97 - 4,92 (m, 2H), 4,41 (dd, J = 2,4, 15,0 Hz, 1H), 4,23 (t, J = 5,0 Hz, 1H), 4,08 (dd, J = 8,6, 15,1 Hz, 1H), 3,87 (s,

1H), 3,48 - 3,44 (m, 1H), 3,41 - 3,33 (m, 1H), 3,20 (dd, J = 7,4, 12,7 Hz, 2H), 1,94 - 1,90 (m, 2H), 1,48 - 1,45 (m, 2H), 1,42 (s, 3H), 1,41 (s, 3H) y 1,15 - 1,12 (m, 2H) ppm.

**Ejemplo 15:** 1-(2,2-Difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)-N-(2-(4-((S)-2,3-dihidroxiopropoxi)-2-metilbutan-2-il)-1-((R)-2,3-dihidroxiopropil)-6-fluoro-1H-indol-5-il)ciclopropanocarboxamida y (S)-1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)-N-(2-(4-(2,3-dihidroxiopropoxi)-2-metilbutan-2-il)-6-fluoro-1H-indol-5-il)ciclopropanocarboxamida

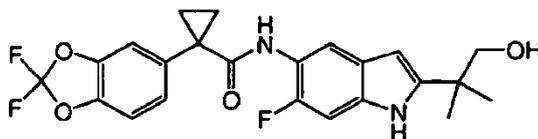


1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)-N-(2-(4-((S)-2,3-dihidroxiopropoxi)-2-metilbutan-2-il)-1-((R)-2,3-dihidroxiopropil)-6-fluoro-1H-indol-5-il)ciclopropanocarboxamida y (S)-1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)-N-(2-(4-(2,3-dihidroxiopropoxi)-2-metilbutan-2-il)-6-fluoro-1H-indol-5-il)ciclopropanocarboxamida

Se prepararon 1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)-N-(2-(4-((S)-2,3-dihidroxiopropoxi)-2-metilbutan-2-il)-1-((R)-2,3-dihidroxiopropil)-6-fluoro-1H-indol-5-il)ciclopropanocarboxamida y (S)-1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)-N-(2-(4-(2,3-dihidroxiopropoxi)-2-metilbutan-2-il)-6-fluoro-1H-indol-5-il)ciclopropanocarboxamida siguiendo un esquema similar al que se muestra anteriormente a partir de 2-(4-(((R)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metoxi)-2-metilbutan-2-il)-1-(((R)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metil)-6-fluoro-5-nitro-1H-indol que contiene algo de (R)-2-(4-(((S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metoxi)-2-metilbutan-2-il)-6-fluoro-5-nitro-1H-indol.

1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)-N-(2-(4-((S)-2,3-dihidroxiopropoxi)-2-metilbutan-2-il)-1-((R)-2,3-dihidroxiopropil)-6-fluoro-1H-indol-5-il)ciclopropanocarboxamida, EM-ESI  $m/z$  calc. 608,2, hallado 609,5 ( $M+1$ )<sup>+</sup>. Tiempo de retención 1,67 minutos. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*6) δ 8,32 (s, 1H), 7,53 (s, 1H), 7,43 - 7,31 (m, 4H), 6,19 (s, 1H), 4,95 - 4,93 (m, 2H), 4,51 (d, J = 5,0 Hz, 1H), 4,42 - 4,39 (m, 2H); 4,10 - 4,04 (m, 1H), 3,86 (s, 1H), 3,49 - 3,43 (m, 2H), 3,41 - 3,33 (m, 1H), 3,30 - 3,10 (m, 6H), 2,02 - 1,97 (m, 2H), 1,48 - 1,42 (m, 8H) y 1,13 (dd, J = 4,0, 6,7 Hz, 2H) ppm; (S)-1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)-N-(2-(4-(2,3-dihidroxiopropoxi)-2-metilbutan-2-il)-6-fluoro-1H-indol-5-il)ciclopropanocarboxamida, EM-ESI  $m/z$  calc. 534,2, hallado 535,5 ( $M+1$ )<sup>+</sup>. Tiempo de retención 1,81 minutos. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*6) δ 10,91 (d, J = 1,5 Hz, 1H), 8,30 (s, 1H), 7,53 (s, 1H), 7,42 - 7,33 (m, 3H), 7,03 (d, J = 10,9 Hz, 1H), 6,07 (d, J = 1,6 Hz, 1H), 4,56 (d, J = 5,0 Hz, 1H), 4,43 (t, J = 5,7 Hz, 1H), 3,51 - 3,46 (m, 1H), 3,31 - 3,13 (m, 6H), 1,88 (t, J = 7,3 Hz, 2H), 1,48 - 1,45 (m, 2H), 1,31 (s, 6H) y 1,15 - 1,12 (m, 2H) ppm.

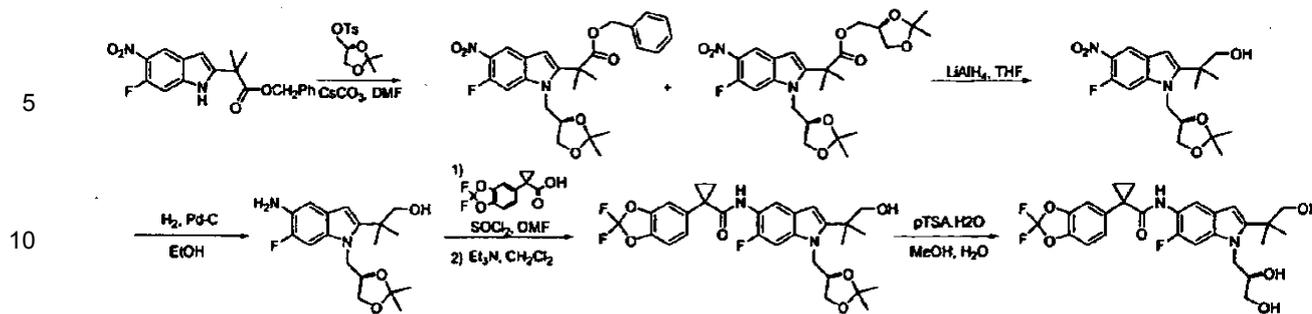
**Ejemplo 16:** 1-(2,2-Difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)-N-(6-fluoro-2-(1-hidroxi-2-metilpropan-2-il)-1H-indol-5-il)ciclopropanocarboxamida



1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)-N-(6-fluoro-2-(1-hidroxi-2-metilpropan-2-il)-1H-indol-5-il)ciclopropanocarboxamida

Se preparó 1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)-N-(6-fluoro-2-(1-hidroxi-2-metilpropan-2-il)-1H-indol-5-il)ciclopropanocarboxamida siguiendo el esquema mostrado anteriormente a partir de una mezcla que contiene (R)-2-(1-(((R)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metil)-6-fluoro-5-nitro-1H-indol-2-il)-2-metilpropan-1-ol y 3-(6-fluoro-5-nitro-1H-indol-2-il)-3-metilbutan-1-ol. EM-ESI  $m/z$  calc. 446,2, hallado 447,5 ( $M+1$ )<sup>+</sup>. Tiempo de retención 1,88 minutos. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,68 (s, 1H), 8,20 (d, J = 7,7 Hz, 1H), 7,30 - 7,21 (m, 3H), 7,12 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 6,94 (d, J = 11,2 Hz, 1H), 6,18 (s, 1H), 3,64 (s, 2H), 1,75 (dd, J = 3,8, 6,8 Hz, 2H), 1,34 (s, 6H) y 1,14 (dd, J = 3,9, 6,9 Hz, 2H) ppm.

**Ejemplo 17:** (R)-1-(2,2-Difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)-N-(1-(2,3-dihidroxiopropil)-6-fluoro-2-(1-hidroxi-2-metilpropan-2-il)-1H-indol-5-il)ciclopropanocarboxamida



15 Etapa a: 2-(1-((2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metil)-6-fluoro-5-nitro-1H-indol-2-il)-2-metilpropanoato de (R)-bencilo y 2-(1-(((R)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metil)-6-fluoro-5-nitro-1H-indol-2-il)-2-metilpropanoato de ((S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metilo

20 Se añadió carbonato de cesio (8,23 g, 25,3 mmoles) a una mezcla de 2-(6-fluoro-5-nitro-1H-indol-2-il)-2-metilpropanoato de bencilo (3,0 g, 8,4 mmoles) y 4-metilbencenosulfonato de (S)-(2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metilo (7,23 g, 25,3 mmoles) en DMF (17 ml). La reacción se agitó a 80 °C durante 46 horas bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla se repartió a continuación entre acetato de etilo y agua. La fase acuosa se extrajo con acetato de etilo. Las fases de acetato de etilo combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtraron y se concentraron. El producto en bruto, un aceite marrón viscoso que contiene los dos productos mostrados anteriormente, se llevó directamente a la siguiente etapa sin más purificación. 2-(1-((2,2-Dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metil)-6-fluoro-5-nitro-1H-indol-2-il)-2-metilpropanoato de (R)-bencilo, EM-ESI *m/z* calc. 470,2, hallado 471,5 (M+1)<sup>+</sup>. Tiempo de retención 2,20 minutos. 2-(1-(((R)-2,2-Dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metil)-6-fluoro-5-nitro-1H-indol-2-il)-2-metilpropanoato de ((S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metilo, EM-ESI *m/z* calc. 494,5, hallado 495,7 (M+1)<sup>+</sup>. Tiempo de retención 2,01 minutos.

30 Etapa b: (R)-2-(1-((2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metil)-6-fluoro-5-nitro-1H-indol-2-il)-2-metilpropan-1-ol

35 La mezcla de reacción en bruto obtenida en la etapa (a) se disolvió en THF (42 ml) y se enfrió en un baño de agua con hielo. Se añadió gota a gota LiAlH<sub>4</sub> (16,8 ml de disolución 1 M, 16,8 mmoles). Después de completarse la adición, la reacción se agitó durante 5 minutos adicionales. La reacción se inactivó añadiendo agua (1 ml), disolución al 15 % de NaOH (1 ml) y a continuación agua (3 ml). La mezcla se filtró sobre Celite, y los sólidos se lavaron con THF y acetato de etilo. El filtrado se concentró y se purificó por cromatografía en columna (30-60 % de acetato de etilo-hexanos) para obtener el producto como un aceite marrón (2,68 g, 87 % durante 2 etapas). EM-ESI *m/z* calc. 366,4, hallado 367,3 (M+1)<sup>+</sup>. Tiempo de retención 1,68 minutos. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8,34 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 7,65 (d, J = 13,4 Hz, 1H), 6,57 (s, 1H), 4,94 (t, J = 5,4 Hz, 1H), 4,64 - 4,60 (m, 1H), 4,52 - 4,42 (m, 2H), 4,16 - 4,14 (m, 1H), 3,76 - 3,74 (m, 1H), 3,63 - 3,53 (m, 2H), 1,42 (s, 3H), 1,38 - 1,36 (m, 6H) y 1,19 (s, 3H) ppm

45 Etapa c: (R)-2-(5-amino-1-((2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metil)-6-fluoro-1H-indol-2-il)-2-metilpropan-1-ol

45 Se disolvió (R)-2-(1-((2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metil)-6-fluoro-5-nitro-1H-indol-2-il)-2-metilpropan-1-ol (2,5 g, 6,82 mmoles) en etanol (70 ml) y la reacción se lavó con N<sub>2</sub>. A continuación se añadió Pd-C (250 mg, 5 % en peso). La reacción se lavó con nitrógeno de nuevo y a continuación se agitó bajo H<sub>2</sub> (atm). Después de 2,5 horas solo se observó la conversión parcial al producto por CL-EM. La reacción se filtró a través de Celite y se concentró. El residuo se volvió a someter a las condiciones anteriores. Después de 2 horas la CL-EM indicó la conversión completa en producto. La mezcla de reacción se filtró a través de Celite. El filtrado se concentró dando el producto como un sólido negro (1,82 g, 79 %). EM-ESI *m/z* calc. 336,2, hallado 337,5 (M+1)<sup>+</sup>. Tiempo de retención 0,86 minutos. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 7,17 (d, J = 12,6 Hz, 1H), 6,76 (d, J = 9,0 Hz, 1H), 6,03 (s, 1H), 4,79 - 4,76 (m, 1H), 4,46 (s, 2H), 4,37 - 4,31 (m, 3H), 4,06 (dd, J = 6,1, 8,3 Hz, 1H), 3,70 - 3,67 (m, 1H), 3,55 - 3,52 (m, 2H), 1,41 (s, 3H), 1,32 (s, 6H) y 1,21 (s, 3H) ppm.

55 Etapa d: (R)-1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)-N-(1-((2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metil)-6-fluoro-2-(1-hidroxi-2-metilpropan-2-il)-1H-indol-5-il)ciclopropanocarboxamida

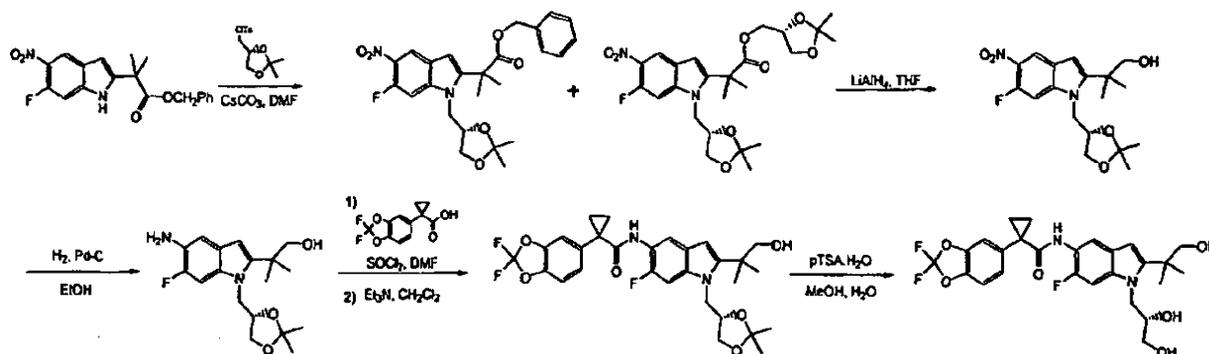
60 Se añadió DMF (3 gotas) a una mezcla con agitación de ácido 1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)ciclopropanocarboxílico (1,87 g, 7,7 mmoles) y cloruro de tionilo (1,30 ml, 17,9 mmoles). Después de 1 hora se había formado una disolución transparente. La disolución se concentró a vacío y a continuación se añadió tolueno (3 ml) y la mezcla se concentró de nuevo. La etapa con tolueno se repitió una vez más y el residuo se puso a alto vacío durante 10 minutos. El cloruro de ácido se disolvió a continuación en diclorometano (10 ml) y se añadió a una mezcla de (R)-2-(5-amino-1-((2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metil)-6-fluoro-1H-indol-2-il)-2-metilpropan-1-ol (1,8 g, 5,4 mmoles) y trietilamina (2,24 ml, 16,1 mmoles) en diclorometano (45 ml). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se lavó con disolución 1 N de HCl, disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub> y salmuera, se secó

sobre  $\text{MgSO}_4$  y se concentró dando el producto como un sólido espumoso negro (3 g, 100 %). EM-ESI  $m/z$  calc. 560,6, hallado 561,7 ( $M+1$ )<sup>+</sup>. Tiempo de retención 2,05 minutos. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  8,31 (s, 1H), 7,53 (s, 1H), 7,42 - 7,40 (m, 2H), 7,34 - 7,30 (m, 3H), 6,24 (s, 1H), 4,51 - 4,48 (m, 1H), 4,39 - 4,34 (m, 2H), 4,08 (dd,  $J = 6,0, 8,3$  Hz, 1H), 3,69 (t,  $J = 7,6$  Hz, 1H), 3,58 - 3,51 (m, 2H), 1,48 - 1,45 (m, 2H), 1,39 (s, 3H), 1,34 - 1,33 (m, 6H), 1,18 (s, 3H) y 1,14 - 1,12 (m, 2H) ppm

Etapa e: (R)-1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)-N-(1-(2,3-dihidroxi-2-metilpropan-2-il)-1H-indol-5-il)ciclopropanocarboxamida

Se disolvió (R)-1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)-N-(1-((2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metil)-6-fluoro-2-(1-hidroxi-2-metilpropan-2-il)-1H-indol-5-il)ciclopropanocarboxamida (3,0 g, 5,4 mmoles) en metanol (52 ml). Se añadió agua (5,2 ml), seguido de *p*-TsOH.H<sub>2</sub>O (204 mg, 1,1 mmoles). La reacción se calentó a 80 °C durante 45 minutos. La disolución se concentró y a continuación se repartió entre acetato de etilo y disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub>. La fase de acetato de etilo se secó sobre  $\text{MgSO}_4$  y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía en columna (50-100 % de acetato de etilo - hexanos) dando el producto como un sólido espumoso de color crema (1,3 g, 47 %, ee >98 % por SFC). EM-ESI  $m/z$  calc. 520,5, hallado 521,7 ( $M+1$ )<sup>+</sup>. Tiempo de retención 1,69 minutos. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  8,31 (s, 1H), 7,53 (s, 1H), 7,42 - 7,38 (m, 2H), 7,33 - 7,30 (m, 2H), 6,22 (s, 1H), 5,01 (d,  $J = 5,2$  Hz, 1H), 4,90 (t,  $J = 5,5$  Hz, 1H), 4,75 (t,  $J = 5,8$  Hz, 1H), 4,40 (dd,  $J = 2,6, 15,1$  Hz, 1H), 4,10 (dd,  $J = 8,7, 15,1$  Hz, 1H), 3,90 (s, 1H), 3,65 - 3,54 (m, 2H), 3,48 - 3,33 (m, 2H), 1,48 - 1,45 (m, 2H), 1,35 (s, 3H), 1,32 (s, 3H) y 1,14 - 1,11 (m, 2H) ppm.

**Ejemplo 18: (S)-1-(2,2-Difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)-N-(1-(2,3-dihidroxi-2-metilpropan-2-il)-1H-indol-5-il)ciclopropanocarboxamida**



Etapa a: 2-(1-((2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metil)-6-fluoro-5-nitro-1H-indol-2-il)-2-metilpropanoato de (S)-bencilo y 2-(1-(((S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metil)-6-fluoro-5-nitro-1H-indol-2-il)-2-metilpropanoato de ((R)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metilo

Se añadió carbonato de cesio (2,74 g, 8,4 mmoles) a una mezcla de 2-(6-fluoro-5-nitro-1H-indol-2-il)-2-metilpropanoato de bencilo (1,0 g, 2,8 mmoles) y 4-metilbencenosulfonato de (S)-((2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metilo) (3,21 g, 11,2 mmoles) en DMF (5,6 ml). La reacción se agitó a 80 °C durante 64 horas bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla se repartió a continuación entre acetato de etilo y agua. La fase acuosa se extrajo con acetato de etilo. Las fases de acetato de etilo combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre  $\text{MgSO}_4$ , se filtraron y se concentraron. El producto en bruto, un aceite marrón viscoso que contiene los dos productos mostrados anteriormente, se llevó directamente a la siguiente etapa sin más purificación. 2-(1-((2,2-Dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metil)-6-fluoro-5-nitro-1H-indol-2-il)-2-metilpropanoato de (S)-bencilo, EM-ESI  $m/z$  calc. 470,2, hallado 471,5 ( $M+1$ )<sup>+</sup>. Tiempo de retención 2,22 minutos. 2-(1-(((S)-2,2-Dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metil)-6-fluoro-5-nitro-1H-indol-2-il)-2-metilpropanoato de ((R)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metilo, EM-ESI  $m/z$  calc. 494,5, hallado 495,5 ( $M+1$ )<sup>+</sup>. Tiempo de retención 2,03 minutos.

Etapa b: (S)-2-(1-((2,2-Dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metil)-6-fluoro-5-nitro-1H-indol-2-il)-2-metilpropan-1-ol

La mezcla de la mezcla de reacción en bruto de 2-(1-((2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metil)-6-fluoro-5-nitro-1H-indol-2-il)-2-metilpropanoato de (S)-bencilo y 2-(1-(((S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metil)-6-fluoro-5-nitro-1H-indol-2-il)-2-metilpropanoato de ((R)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metilo se disolvió en THF (15 ml) y se enfrió en un baño de agua con hielo. Se añadió gota a gota  $\text{LiAlH}_4$  (2,8 ml de disolución 1 M, 2,8 mmoles). Después de completarse la adición, la reacción se agitó durante 5 minutos. La reacción se inactivó añadiendo agua (0,5 ml), disolución al 15 % de NaOH (0,5 ml) y a continuación agua (1,5 ml). La mezcla se filtró sobre Celite, y los sólidos se lavaron con THF y acetato de etilo. El filtrado se concentró y se purificó por cromatografía en columna (30-60 % de acetato de etilo - hexanos) para obtener el producto como un aceite marrón (505 mg, 49 % durante 2 etapas). EM-ESI  $m/z$  calc. 366,4, hallado 367,3 ( $M+1$ )<sup>+</sup>. Tiempo de retención 1,68 minutos. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  8,34 (d,  $J = 7,6$  Hz, 1H), 7,65 (d,  $J = 7,6$  Hz, 1H), 7,42 - 7,38 (m, 2H), 7,33 - 7,30 (m, 2H), 6,22 (s, 1H), 5,01 (d,  $J = 5,2$  Hz, 1H), 4,90 (t,  $J = 5,5$  Hz, 1H), 4,75 (t,  $J = 5,8$  Hz, 1H), 4,40 (dd,  $J = 2,6, 15,1$  Hz, 1H), 4,10 (dd,  $J = 8,7, 15,1$  Hz, 1H), 3,90 (s, 1H), 3,65 - 3,54 (m, 2H), 3,48 - 3,33 (m, 2H), 1,48 - 1,45 (m, 2H), 1,35 (s, 3H), 1,32 (s, 3H) y 1,14 - 1,11 (m, 2H) ppm.

= 13,5 Hz, 1H), 6,57 (s, 1H), 4,94 (t, J = 5,4 Hz, 1H), 4,64 - 4,60 (m, 1H), 4,52 - 4,42 (m, 2H), 4,14 (dd, J = 6,2, 8,4 Hz, 1H), 3,74 (dd, J = 7,0, 8,3 Hz, 1H), 3,63 - 3,53 (m, 2H), 1,42 (s, 3H), 1,37 (m, 6H) y 1,19 (s, 3H) ppm.

Etapa c: (S)-2-(5-amino-1-((2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metil)-6-fluoro-1H-indol-2-il)-2-metilpropan-1-ol

5 Se disolvió (S)-2-(1-((2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metil)-6-fluoro-5-nitro-1H-indol-2-il)-2-metilpropan-1-ol (500 mg, 1,4 mmoles) en etanol (15 ml) y la reacción se lavó con N<sub>2</sub>. A continuación se añadió Pd-C (50 mg, 5 % en peso). La reacción se lavó con nitrógeno de nuevo y a continuación se agitó bajo H<sub>2</sub> (atm). Después de 1 hora solo se observó conversión parcial en el producto por CL-EM. La reacción se filtró a través de Celite y se concentró. El residuo se volvió a someter a las condiciones anteriores. Después de 1 hora la CL-EM indicó la conversión completa en producto. La mezcla de reacción se filtró a través de Celite. El filtrado se concentró dando el producto como un sólido negro (420 mg, 91 %). EM-ESI *m/z* calc. 336,2, hallado 337,5 (M+1)<sup>+</sup>. Tiempo de retención 0,90 minutos. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*6) δ 7,17 (d, J = 12,6 Hz, 1H), 6,76 (d, J = 9,0 Hz, 1H), 6,03 (s, 1H), 4,78 (s a, 1H), 4,46 (s, 2H), 4,41 - 4,27 (m, 3H), 4,06 (dd, J = 6,1, 8,3 Hz, 1H), 3,70 - 3,67 (m, 1H), 3,53 (dd, J = 10,7, 17,2 Hz, 2H), 1,40 (s, 3H), 1,32 (s, 6H) y 1,21 (s, 3H) ppm.

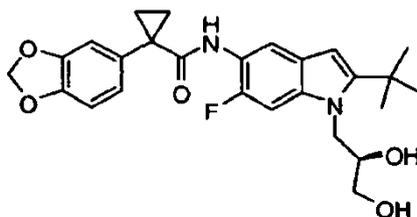
Etapa d: (S)-1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)-N-(1-((2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metil)-6-fluoro-2-(1-hidroxi-2-metilpropan-2-il)-1H-indol-5-il)ciclopropanocarboxamida

20 Se añadió DMF (3 gotas) a una mezcla con agitación de ácido 1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)ciclopropanocarboxílico (187 mg, 0,8 mmoles) y cloruro de tionilo (0,13 ml, 1,8 mmoles). Después de 30 minutos se había formado una disolución transparente. Se mezcló una pequeña cantidad de piperidina para probar que el cloruro de ácido se había formado. La disolución se concentró en rotavapor y a continuación se añadió tolueno (1 ml) y la mezcla se concentró de nuevo. La etapa con tolueno se repitió una vez más y el residuo se puso a alto vacío durante 10 minutos. El cloruro de ácido se disolvió a continuación en diclorometano (2 ml) y se añadió a una mezcla de (S)-2-(5-amino-1-((2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metil)-6-fluoro-1H-indol-2-il)-2-metilpropan-1-ol (200 mg, 0,6 mmoles) y trietilamina (0,25 ml, 1,8 mmoles) en diclorometano (4 ml). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 45 minutos. La reacción se lavó con disolución 1 N de HCl, disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub> y salmuera, se secó sobre MgSO<sub>4</sub> y se concentró dando el producto como un sólido espumoso negro (320 mg, 96 %). EM-ESI *m/z* calc. 560,6, hallado 561,5 (M+1)<sup>+</sup>. Tiempo de retención 2,05 minutos. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*6) δ 8,31 (s, 1H), 7,53 (s, 1H), 7,42 - 7,40 (m, 2H), 7,34 - 7,30 (m, 3H), 6,24 (s, 1H), 4,84 (t, J = 5,5 Hz, 1H), 4,51 - 4,46 (m, 1H), 4,41 - 4,32 (m, 2H), 4,08 (dd, J = 6,0, 8,3 Hz, 1H), 3,71 - 3,67 (m, 1H), 3,58 - 3,50 (m, 2H), 1,48 - 1,45 (m, 2H), 1,40 (s, 3H), 1,34 - 1,33 (m, 6H), 1,18 (s, 3H) y 1,14 - 1,12 (m, 2H) ppm.

35 Etapa e: (S)-1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)-N-(1-(2,3-dihidroxipropil)-6-fluoro-2-(1-hidroxi-2-metilpropan-2-il)-1H-indol-5-il)ciclopropanocarboxamida

40 Se disolvió (S)-1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)-N-(1-((2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metil)-6-fluoro-2-(1-hidroxi-2-metilpropan-2-il)-1H-indol-5-il)ciclopropanocarboxamida (290 g, 0,5 mmoles) en metanol (5 ml). Se añadió agua (0,5 ml), seguido de *p*-TsOH.H<sub>2</sub>O (20 mg, 0,1 mmoles). La reacción se calentó a 80 °C durante 45 minutos. La disolución se repartió a continuación entre acetato de etilo y disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub>. La fase de acetato de etilo se secó sobre MgSO<sub>4</sub> y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía en columna (50-100 % de acetato de etilo - hexanos) dando el producto como un sólido espumoso de color crema (146 mg, 54 %, ee >97 % por SFC). EM-ESI *m/z* calc. 520,5, hallado 521,5 (M+1)<sup>+</sup>. Tiempo de retención 1,67 minutos. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*6) δ 8,31 (s, 1H), 7,53 (d, J = 1,1 Hz, 1H), 7,42 - 7,37 (m, 2H), 7,33 - 7,30 (m, 2H), 6,22 (s, 1H), 5,01 (d, J = 5,0 Hz, 1H), 4,91 (t, J = 5,5 Hz, 1H), 4,75 (t, J = 5,8 Hz, 1H), 4,42 - 4,38 (m, 1H), 4,10 (dd, J = 8,8, 15,1 Hz, 1H), 3,90 (s, 1H), 3,64 - 3,54 (m, 2H), 3,48 - 3,33 (m, 2H), 1,48 - 1,45 (m, 2H), 1,35 (s, 3H), 1,32 (s, 3H) y 1,14 - 1,11 (m, 2H) ppm.

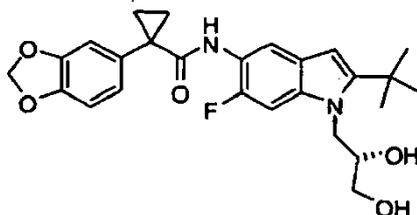
50 **Ejemplo 19:** (R)-1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-N-(2-*tert*-butil-1-(2,3-dihidroxipropil)-6-fluoro-1H-indol-5-il)ciclopropanocarboxamida



60 Se preparó (R)-1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-N-(2-*tert*-butil-1-(2,3-dihidroxipropil)-6-fluoro-1H-indol-5-il)ciclopropanocarboxamida usando un procedimiento experimental similar al Ejemplo 72 a partir de ácido 1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)ciclopropanocarboxílico y 2-*tert*-butil-6-fluoro-5-nitro-1H-indol.

65 **Ejemplo 20:** (S)-1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-N-(2-*tert*-butil-1-(2,3-dihidroxipropil)-6-fluoro-1H-indol-5-il)ciclopropanocarboxamida

## ii) ciclopropanocarboxamida



Se preparó (S)-1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-N-(2-*tert*-butil-1-(2,3-dihidroxiopropil)-6-fluoro-1H-indol-5-yl)ciclopropanocarboxamida usando un procedimiento experimental similar al Ejemplo 72 a partir de ácido 1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)ciclopropanocarboxílico y 2-*tert*-butil-6-fluoro-5-nitro-1H-indol.

Un experto en las ciencias químicas puede usar los ejemplos y esquemas junto con metodologías sintéticas conocidas para sintetizar los compuestos de la presente invención, que incluyen los compuestos en la Tabla 3, a continuación.

Tabla 3: Datos físicos de compuestos a modo de ejemplo.

Nº Comp.	LC/MS M+1	LC/RT Min	NMR
308	516.7	1.69	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) <sup>TM</sup> 8.32 (s, 1H), 7.53 (s, 1H), 7.43 - 7.31 (m, 4H), 6.19 (s, 1H), 4.95 - 4.93 (m, 2H), 4.51 (d, J = 5.0 Hz, 1H), 4.42 - 4.39 (m, 2H), 4.10 - 4.04 (m, 1H), 3.86 (s, 1H), 3.49 - 3.43 (m, 2H), 3.41 - 3.33 (m, 1H), 3.30 - 3.10 (m, 6H), 2.02 - 1.97 (m, 2H), 1.48 - 1.42 (m, 8H) and 1.13 (dd, J = 4.0, 6.7 Hz, 2H) ppm
309	535.7	1.79	<sup>1</sup> H NMR (400.0 MHz, DMSO) d 8.43 (s, 1H), 7.53 (s, 1H), 7.45 - 7.41 (m, 2H), 7.36 - 7.31 (m, 2H), 6.27 (s, 1H), 4.74 - 4.70 (m, 2H), 3.57 - 3.53 (m, 2H), 3.29 (s, 9H), 1.48 - 1.42 (m, 11H), and 1.15 (dd, J = 3.9, 6.8 Hz, 2H) ppm.
310	609.5	1.64	
311	535.7	1.7	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) <sup>TM</sup> 8.32 (s, 1H), 7.53 (d, J = 1.0 Hz, 1H), 7.43 - 7.31 (m, 4H), 6.17 (s, 1H), 4.97 - 4.92 (m, 2H), 4.41 (dd, J = 2.4, 15.0 Hz, 1H), 4.23 (t, J = 5.0 Hz, 1H), 4.08 (dd, J = 8.6, 15.1 Hz, 1H), 3.87 (s, 1H), 3.48 - 3.44 (m, 1H), 3.41 - 3.33 (m, 1H), 3.20 (dd, J = 7.4, 12.7 Hz, 2H), 1.94 - 1.90 (m, 2H), 1.48 - 1.45 (m, 2H), 1.42 (s, 3H), 1.41 (s, 3H) and 1.15 - 1.12 (m, 2H) ppm.
312	443	2.31	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) <sup>TM</sup> 8.93 (s, 1H), 7.71 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.42 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.33 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 7.08 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 6.28 (s, 1H), 5.05 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 4.42 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 3.70 - 3.65 (m, 2H), 1.51 - 1.48 (m, 2H), 1.44 (s, 9H), 1.19 - 1.16 (m, 2H) ppm.
313	521.5	1.69	<sup>1</sup> H NMR (400.0 MHz, CD <sub>3</sub> CN) d 7.69 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.44 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 7.39 (dd, J = 1.7, 8.3 Hz, 1H), 7.31 (s, 1H), 7.27 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.20 (d, J = 12.0 Hz, 1H), 6.34 (s, 1H), 4.32 (d, J = 6.8 Hz, 2H), 4.15 - 4.09 (m, 1H), 3.89 (dd, J = 6.0, 11.5 Hz, 1H), 3.63 - 3.52 (m, 3H), 3.42 (d, J = 4.6 Hz, 1H), 3.21 (dd, J = 6.2, 7.2 Hz, 1H), 3.04 (t, J = 5.8 Hz, 1H), 1.59 (dd, J = 3.8, 6.8 Hz, 2H), 1.44 (s, 3H), 1.33 (s, 3H) and 1.18 (dd, J = 3.7, 6.8 Hz, 2H) ppm
315	482.5	1.99	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO) 8.93 (s, 1H), 7.71 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.42 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.33 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 7.08 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 6.28 (s, 1H), 5.05 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 4.42 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 3.70 - 3.65 (m, 2H), 1.51 - 1.48 (m, 2H), 1.44 (s, 9H), 1.19 - 1.16 (m, 2H)
316	438.7	2.1	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO) 11.48 (s, 1H), 8.88 (s, 1H), 7.52 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.41 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.32 (dd, J = 1.5, 8.3 Hz, 1H), 7.03 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 6.21 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 1.51 - 1.49 (m, 2H), 1.36 (s, 9H), 1.18 - 1.16 (m, 2H) ppm.
318	469.016	1.66	
320	465.7	1.79	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO) 9.26 (s, 1H), 7.65 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 7.49 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.36 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 7.11 (dd, J = 1.9, 8.9 Hz, 1H), 6.89 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 6.14 (s, 1H), 4.42 - 4.37 (m, 1H), 4.16 - 4.10 (m, 1H), 3.90 - 3.88 (m, 1H), 3.73 (s, 3H), 3.46 - 3.42 (m, 2H), 1.41 (s, 9H), 1.36 (d, J = 5.0 Hz, 1H), 1.21 (s, 3H), 0.99 (d, J = 5.0 Hz, 1H), 0.84 (s, 3H)
322	521.5	1.67	<sup>1</sup> H NMR (400.0 MHz, DMSO) d 8.31 (s, 1H), 7.53 (d, J = 1.1 Hz, 1H), 7.42 - 7.37 (m, 2H), 7.33 - 7.30 (m, 2H), 6.22 (s, 1H), 5.01 (d, J = 5.0 Hz, 1H), 4.91 (t, J = 5.5 Hz, 1H), 4.75 (t, J = 5.8 Hz, 1H), 4.42 - 4.38 (m, 1H), 4.10 (dd, J = 8.8, 15.1 Hz, 1H), 3.90 (s, 1H), 3.64 - 3.54 (m, 2H), 3.48 - 3.33 (m, 2H), 1.48 - 1.45 (m, 2H), 1.35 (s, 3H), 1.32 (s, 3H) and 1.14 - 1.11 (m, 2H) ppm

**Ejemplo 21: Ensayos para detectar y medir las propiedades de corrección de  $\Delta F508$ -CFTR de compuestos**

Métodos ópticos de potencial de membrana para ensayar las propiedades de modulación de  $\Delta F508$ -CFTR de compuestos.

5 El ensayo utiliza colorantes sensibles al voltaje fluorescentes para medir cambios en el potencial de membrana usando un lector de placa fluorescente (por ejemplo, FLIPR III, Molecular Devices, Inc.) como lectura para el aumento en  $\Delta F508$ -CFTR funcional en células NIH 3T3. La fuerza motriz para la respuesta es la creación de un gradiente de ión cloruro conjuntamente con la activación de canales por una etapa de una sola adición de líquido después de que las células se hayan tratado previamente con compuestos y posteriormente cargado con un colorante sensible al voltaje.

Identificación de compuestos de corrección

15 Para identificar moléculas pequeñas que corrigen el defecto del tráfico asociado a  $\Delta F508$ -CFTR, se desarrolló un formato de ensayo de HTS de una sola adición. Las placas de ensayo que contienen células se incuban durante ~2-4 horas en estufa de incubación de cultivo de tejido a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>, 90 % de humedad. A continuación, las células están listas para la exposición al compuesto después de adherirse al fondo de las placas de ensayo.

20 Las células se incubaron en medio sin suero durante 16-24 h en estufa de incubación de cultivo de tejido a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>, 90 % de humedad en presencia o ausencia (control negativo) de compuesto de prueba. Las células se aclararon posteriormente 3X con disolución de Krebs-Ringer y se cargaron con un colorante de redistribución sensible al voltaje. Para activar  $\Delta F508$ -CFTR, se añadieron forskolina 10  $\mu$ M y el potenciador de CFTR genisteína (20  $\mu$ M), junto con medio libre de Cl<sup>-</sup> a cada pocillo. La adición de medio libre de Cl<sup>-</sup> promovió la salida de Cl<sup>-</sup> en respuesta a la activación de  $\Delta F508$ -CFTR y la despolarización de la membrana resultante se monitorizó ópticamente usando colorantes sensibles al voltaje.

Identificación de compuestos potenciadores

30 Para identificar potenciadores de  $\Delta F508$ -CFTR, se desarrolló un formato de ensayo de HTS de adición doble. Este ensayo de HTS utiliza colorantes sensibles al voltaje fluorescentes para medir cambios en el potencial de membrana sobre FLIPR III como una medición del aumento en la apertura (conductancia) de  $\Delta F508$ -CFTR en células  $\Delta F508$ -CFTR NIH3T3 corregidas por la temperatura. La fuerza motriz para la respuesta es un gradiente de ión Cl<sup>-</sup> conjuntamente con la activación de canales con forskolina en una etapa de una sola adición de líquido usando un lector de placa fluorescente tal como FLIPR III después de que las células se hayan tratado previamente con compuestos potenciadores (o control de vehículo DMSO) y posteriormente cargado con un colorante de redistribución.

Disoluciones:

40 Disolución del baño n° 1: (en mM) NaCl 160, KCl 4,5, CaCl<sub>2</sub> 2, MgCl<sub>2</sub> 1, HEPES 10, pH 7,4 con NaOH.

Disolución del baño libre de cloruro: Las sales de cloruro en la disolución del baño n° 1 se sustituyen con sales de gluconato.

45 Cultivo celular

50 Se usan fibroblastos de ratón NIH3T3 que expresan establemente  $\Delta F508$ -CFTR para las mediciones ópticas del potencial de membrana. Las células se mantienen a 37 °C en 5 % de CO<sub>2</sub> y 90 % de humedad en medio Eagle modificado por Dulbecco complementado con glutamina 2 mM, 10 % de suero bovino fetal, 1 X NEAA,  $\beta$ -ME, 1 X pen/estrep y HEPES 25 mM en matraces de cultivo de 175 cm<sup>2</sup>. Para todos los ensayos ópticos, las células se sembraron a ~20.000/pocillo en placas recubiertas con Matrigel de 384 pocillos y se cultivaron durante 2 h a 37 °C antes cultivar a 27 °C durante 24 h para el ensayo de potenciador. Para los ensayos de corrección, las células se cultivan a 27 °C o 37 °C con y sin compuestos durante 16 - 24 horas.

55 Ensayos electrofisiológicos para ensayar las propiedades de modulación de  $\Delta F508$ -CFTR de compuestos.

1. Ensayo en cámara de Ussing

60 Se realizaron experimentos en cámara de Ussing sobre células epiteliales de las vías respiratorias polarizadas que expresan  $\Delta F508$ -CFTR para caracterizar adicionalmente los moduladores de  $\Delta F508$ -CFTR identificados en los ensayos ópticos. Se aislaron epitelios de las vías respiratorias sin FQ y con FQ de tejido bronquial, se cultivaron como se ha descrito previamente (Gaietta, L.J.V., Lantero, S., Gazzolo, A., Sacco, O., Romano, L., Rossi, G.A., & Zegarra-Moran, O. (1998) *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 34, 478-481) y se sembraron sobre filtros Costar® Snapwell™ que se recubrieron previamente con medio acondicionado con NIH3T3. Después de cuatro días se eliminó el medio apical y las células se cultivaron en una interfase aire-líquido durante >14 días antes de uso. Esto produjo una

monocapa de células columnares completamente diferenciadas que fueron ciliadas, rasgos que son característicos de epitelios de las vías respiratorias. Se aislaron HBE sin FQ de no fumadores que no tenían ninguna enfermedad pulmonar conocida. Se aislaron FQ-HBE de pacientes homocigóticos para  $\Delta F508$ -CFTR.

5 Se montaron HBE cultivados sobre insertos de cultivo celular Costar® Snapwell™ en una cámara de Ussing (Physiologic Instruments, Inc., San Diego, CA), y se midieron la resistencia transepitelial y la corriente de cortocircuito en presencia de un gradiente de  $\text{Cl}^-$  de basolateral a apical ( $I_{\text{SC}}$ ) usando un sistema de fijación de voltaje (Departamento de Bioingeniería, Universidad de Iowa, IA). Brevemente, se examinaron HBE bajo condiciones de registro de fijación de voltaje ( $V_{\text{mantenimiento}} = 0 \text{ mV}$ ) a  $37^\circ\text{C}$ . La disolución basolateral contuvo (en mM) NaCl 145,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,83,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3,3,  $\text{MgCl}_2$  1,2,  $\text{CaCl}_2$  1,2, Glucosa 10, 10 HEPES (pH ajustado a 7,35 con NaOH) y la disolución apical contuvo (en mM) Gluconato de Na 145,  $\text{MgCl}_2$  1,2,  $\text{CaCl}_2$  1,2, glucosa 10, HEPES 10 (pH ajustado a 7,35 con NaOH).

15 Identificación de compuestos de corrección

El protocolo típico utilizó un gradiente de concentración de  $\text{Cl}^-$  de la membrana de basolateral a apical. Para fijar este gradiente, se usó Ringer normal sobre la membrana basolateral, mientras que el NaCl apical se sustituyó con gluconato de sodio equimolar (valorado a pH 7,4 con NaOH) dando un gran gradiente de concentración de  $\text{Cl}^-$  a través del epitelio. Todos los experimentos se realizaron con monocapas intactas. Para activar completamente  $\Delta F508$ -CFTR, se añadieron forskolina ( $10 \mu\text{M}$ ), inhibidor de PDE, IBMX ( $100 \mu\text{M}$ ) y potenciador de CFTR, genisteína ( $50 \mu\text{M}$ ) al lado apical.

20 Como se ha observado en otros tipos de células, la incubación a bajas temperaturas de células FRT y células epiteliales bronquiales humanas aisladas de pacientes enfermos con FQ (FQ-HBE) que expresan  $\Delta F508$ -CFTR aumenta la densidad funcional de CFTR en la membrana plasmática. Para determinar la actividad de compuestos de corrección, las células se incubaron con compuesto de prueba durante 24-48 horas a  $37^\circ\text{C}$  y posteriormente se lavaron 3X antes del registro. La  $I_{\text{SC}}$  mediada por AMPc y genisteína en células tratadas con compuesto se normalizó a controles a  $37^\circ\text{C}$  y se expresó como el porcentaje de actividad de actividad de CFTR en HBE no mutados. La preincubación de las células con el compuesto de corrección aumentó significativamente la  $I_{\text{SC}}$  mediada por AMPc y genisteína en comparación con los controles a  $37^\circ\text{C}$ .

25 Identificación de compuestos potenciadores

El protocolo típico utilizó un gradiente de concentración de  $\text{Cl}^-$  de la membrana de basolateral a apical. Para fijar este gradiente, se usó Ringer normal sobre la membrana basolateral, mientras que el NaCl apical se sustituyó con gluconato de sodio equimolar (valorado a pH 7,4 con NaOH) dando un gran gradiente de concentración de  $\text{Cl}^-$  a través del epitelio. Se añadieron forskolina ( $10 \mu\text{M}$ ) y todos los compuestos de prueba al lado apical de los insertos de cultivo celular. La eficacia de los potenciadores de  $\Delta F508$ -CFTR putativos se comparó con la del potenciador conocido, genisteína.

40 2. Registro de pinzamiento zonal

Se monitorizó la corriente de  $\text{Cl}^-$  total en células  $\Delta F508$ -NIH3T3 usando la configuración de registro de parches perforados como se ha descrito previamente (Rae, J., Cooper, K., Gates, P., & Watsky, M. (1991) J. Neurosci. Methods 37,15-26). Se realizaron registros de fijación de voltaje a  $22^\circ\text{C}$  usando un amplificador de pinzamiento zonal Axopatch 200B (Axon Instruments Inc., Foster City, CA). La disolución de la pipeta contuvo (en mM) N-metil-D-glucamina (NMDG)-Cl 150,  $\text{MgCl}_2$  2,  $\text{CaCl}_2$  2, EGTA 10, HEPES 10 y  $240 \mu\text{g/ml}$  de anfotericina-B (pH ajustado a 7,35 con HCl). El medio extracelular contuvo (en mM) NMDG-Cl 150,  $\text{MgCl}_2$  2,  $\text{CaCl}_2$  2, HEPES 10 (pH ajustado a 7,35 con HCl). Se realizaron la generación de pulsos, la adquisición de datos y el análisis usando un PC equipado con una interfaz Digidata 1320 A/D conjuntamente con Clampex 8 (Axon Instruments Inc.). Para activar  $\Delta F508$ -CFTR, se añadieron forskolina  $10 \mu\text{M}$  y genisteína  $20 \mu\text{M}$  al baño y la relación de corriente-voltaje se monitorizó cada 30 s.

55 Identificación de compuestos de corrección

Para determinar la actividad de los compuestos de corrección para aumentar la densidad de  $\Delta F508$ -CFTR funcional en la membrana plasmática, los presentes inventores usaron las técnicas de registro de parches perforados anteriormente descritas para medir la densidad de corriente tras 24 h de tratamiento con los compuestos de corrección. Para activar completamente  $\Delta F508$ -CFTR, se añadieron forskolina  $10 \mu\text{M}$  y genisteína  $20 \mu\text{M}$  a las células. Bajo las condiciones de registro de los presentes inventores, la densidad de corriente tras la incubación de 24 h a  $27^\circ\text{C}$  fue superior a la observada tras la incubación de 24 h a  $37^\circ\text{C}$ . Estos resultados están de acuerdo con los efectos conocidos de la incubación a baja temperatura sobre la densidad de  $\Delta F508$ -CFTR en la membrana plasmática. Para determinar los efectos de los compuestos de corrección sobre la densidad de corriente de CFTR, las células se incubaron con  $10 \mu\text{M}$  del compuesto de prueba durante 24 horas a  $37^\circ\text{C}$  y la densidad de corriente se comparó con los controles a  $27^\circ\text{C}$  y  $37^\circ\text{C}$  (% de actividad). Antes del registro, las células se lavaron 3X con medio de registro extracelular para eliminar cualquier compuesto de prueba restante. La preincubación con  $10 \mu\text{M}$  de

compuestos de corrección aumentó significativamente la corriente dependiente de AMPc y de genisteína en comparación con los controles a 37 °C.

#### Identificación de compuestos potenciadores

5 La capacidad de potenciadores de  $\Delta F508$ -CFTR para aumentar la corriente de  $Cl^-$  de  $\Delta F508$ -CFTR macroscópica ( $I_{\Delta F508}$ ) en células NIH3T3 que expresan establemente  $\Delta F508$ -CFTR también se investigó usando técnicas de registro de parches perforados. Los potenciadores identificados de los ensayos ópticos provocaron un aumento dependiente de la dosis en  $I_{\Delta F508}$  con potencia y eficacia similar observada en los ensayos ópticos. En todas las  
10 células examinadas, el potencial inverso antes y durante la aplicación del potenciador fue aproximadamente -30 mV, que es la  $E_{Cl}$  calculada (-28 mV).

#### Cultivo celular

15 Se usan fibroblastos de ratón NIH3T3 que expresan establemente  $\Delta F508$ -CFTR para los registros de células completas. Las células se mantienen a 37 °C en 5 % de  $CO_2$  y 90 % de humedad en medio Eagle modificado por Dulbecco complementado con glutamina 2 mM, 10 % de suero bovino fetal, 1 X NEAA,  $\beta$ -ME, 1 X pen/estrep y HEPES 25 mM en matraces de cultivo de 175 cm<sup>2</sup>. Para los registros de células completas, se sembraron 2.500 -  
20 5.000 células sobre cubreobjetos de vidrio recubiertos con poli-L-lisina y se cultivaron durante 24 - 48 h a 27 °C antes de uso para probar la actividad de potenciadores; y se incubaron con o sin el compuesto de corrección a 37 °C para medir la actividad de correctores.

#### 3.Lecturas de un solo canal

25 Se observó actividad de apertura de CFTR no mutado y  $\Delta F508$ -CFTR corregido por la temperatura expresado en células NIH3T3 usando registros de parches de membrana invertidos escindidos como se ha descrito previamente (Dalemans, W., Barbry, P., Champigny, G., Jallat, S., Dott, K., Dreyer, D., Crystal, R.G., Pavirani, A., Lecocq, J-P.,  
30 Lazdunski, M. (1991) Nature 354, 526 - 528) usando un amplificador de pinzamiento zonal Axopatch 200B (Axon Instruments Inc.). La pipeta contuvo (en mM): NMDG 150, ácido aspártico 150,  $CaCl_2$  5,  $MgCl_2$  2 y HEPES 10 (pH ajustado a 7,35 con base Tris). El baño contuvo (en mM): NMDG-Cl 150,  $MgCl_2$  2, EGTA 5, TES 10 y base Tris 14 (pH ajustado a 7,35 con HCl). Después de la escisión, tanto CFTR no mutado como  $\Delta F508$ -CFTR se activaron añadiendo Mg-ATP 1 mM, 75 nM de la subunidad catalítica de proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA; Promega Corp. Madison, WI) y NaF 10 mM para inhibir proteínas fosfatasa, que previno el agotamiento de corriente. El potencial de la pipeta se mantuvo a 80 mV. La actividad del canal se analizó a partir de parches de  
35 membrana que contenían  $\leq 2$  canales activos. El número máximo de aperturas simultáneas determinó el número de canales activos durante el transcurso de un experimento. Para determinar la amplitud de la corriente de un solo canal, los datos registrados a partir de 120 s de actividad de CFTR-F508 se filtraron "fuera de línea" a 100 Hz y a continuación se usaron para construir histogramas de todos los puntos que se ajustaron con funciones multigaussianas usando el software de análisis Bio-Patch (Bio-Logic Comp. Francia). La corriente microscópica total y la probabilidad de apertura ( $P_o$ ) se determinaron a partir de 120 s de la actividad del canal. Se determinó  $P_o$  usando el software Bio-Patch o a partir de la relación  $P_o = I/i(N)$  en la que  $I$  = corriente media,  $i$  = amplitud de corriente de un único canal y  $N$  = número de canales activos en el parche.

#### Cultivo celular

45 Se usan fibroblastos de ratón NIH3T3 que expresan establemente  $\Delta F508$ -CFTR para las lecturas de pinzamiento zonal de membrana escindida. Las células se mantienen a 37 °C en 5 % de  $CO_2$  y 90 % de humedad en medio Eagle modificado por Dulbecco complementado con glutamina 2 mM, 10 % de suero bovino fetal, 1 X NEAA,  $\beta$ -ME, 1 X pen/estrep y HEPES 25 mM en matraces de cultivo de 175 cm<sup>2</sup>. Para las lecturas de un único canal, se sembraron 2.500 - 5.000 células sobre cubreobjetos de vidrio recubiertos con poli-L-lisina y se cultivaron durante 24 -  
50 48 h a 27 °C antes de uso.

Se encontró que los compuestos de la presente invención presentaron actividad de corrección como se mide en el ensayo descrito anteriormente.

55 Los compuestos de la invención son útiles como moduladores de transportadores del casete de unión a ATP. Usando los procedimientos descritos anteriormente, se ha medido que las actividades, es decir,  $CE_{50}$ , de los compuestos de la presente invención son de aproximadamente 3,8 nM a aproximadamente 13,5  $\mu$ M. Además, usando aquellos métodos descritos anteriormente, se ha medido que las eficacias de los compuestos de la presente invención son de aproximadamente el 35 % a aproximadamente el 110 %.

En la Tabla 4 se aplican los siguientes significados:

65  $CE_{50}$ : "+++" significa <2  $\mu$ M; "++" significa entre 2  $\mu$ M y 5  $\mu$ M; "+" significa entre 5  $\mu$ M y 25  $\mu$ M.

% de eficacia: "+" significa < 25 %; "++" significa entre 25 % y 100 %; "+++" significa > 100 %.

Tabla 4.

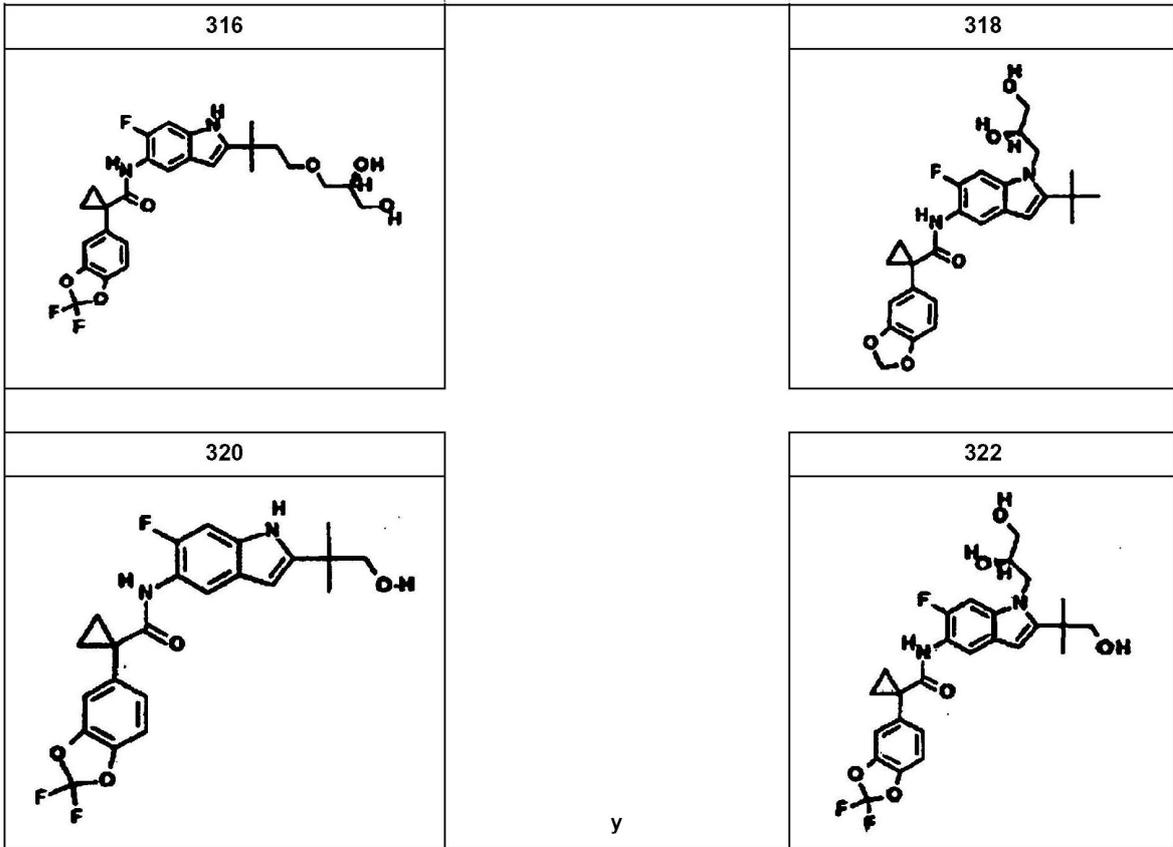
Nº Comp.	Agrupada EC50	Agrupada Max. Eficiencia
308	++	+++
309	+++	+++
310	+++	+++
311	+++	+++
312	+++	+++
313	+++	+++
315	+++	+++
316	+++	+++
318	+++	+++
320	++	++

La presente invención describe adicionalmente los aspectos definidos en las siguientes cláusulas (que forman parte de la presente descripción, pero no se consideran reivindicaciones según la decisión J 15/88 de la Cámara Legal de Recursos de la Oficina Europea de patentes):

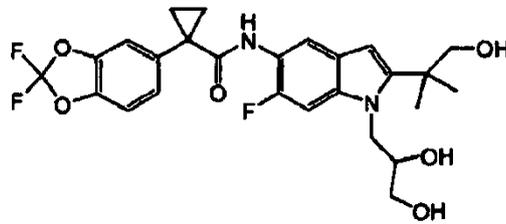
1. Un compuesto seleccionado de

308	309	
310	311	312
313	315	

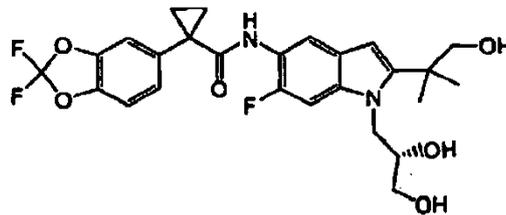
(continuación)



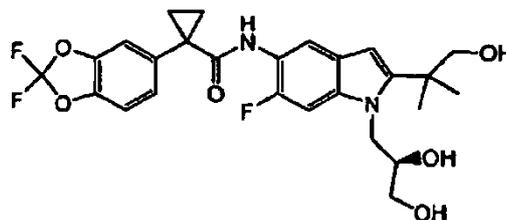
2. El compuesto



3. El compuesto



4. El compuesto

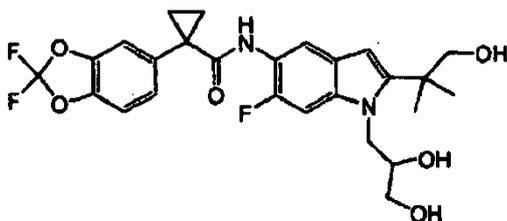


5. Una composición farmacéutica que comprende

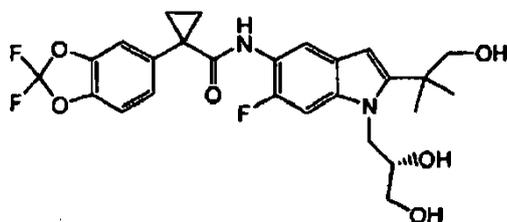
- (i) un compuesto según la cláusula 1; y
- (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 6. La composición de la cláusula 5, que comprende además un agente adicional seleccionado de un agente mucolítico, broncodilatador, un antibiótico, un agente antiinfeccioso, un agente antiinflamatorio, corrector de CFTR, potenciador de CFTR, o un agente nutritivo.

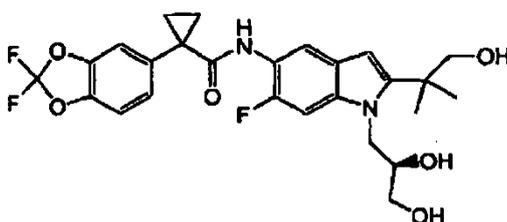
10 7. La composición de las cláusulas 5 ó 6, en la que el compuesto es



20 8. La composición de las cláusulas 5 ó 6, en la que el compuesto es



30 9. La composición de las cláusulas 5 ó 6, en la que el compuesto es



40 10. Un método de aumento del número de transportadores de ABC funcionales en una membrana de una célula, que comprende la etapa de poner en contacto dicha célula con un compuesto seleccionado de

308	309	

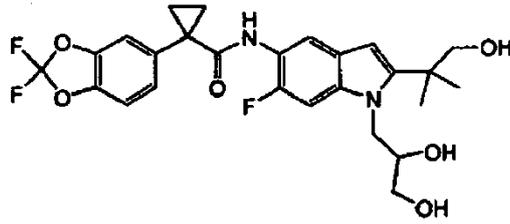
(continuación)

	310	311	312
5			
10			
15			
	313	315	
20			
25			
30			
	316	318	
35			
40			
45			
	320		322
50			
55			
60			
		y	

11. El método de la cláusula 10, en el que el transportador de ABC es CFTR.

12. El método de las cláusulas 10 ó 11, en el que el compuesto es

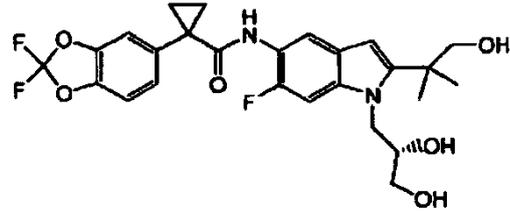
5



10

13. El método de las cláusulas 10 ó 11, en el que el compuesto es

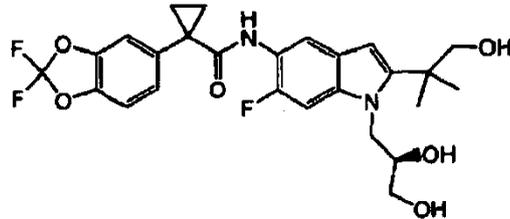
15



20

14. El método de las cláusulas 10 ó 11, en el que el compuesto es

25



30

15. Un método para tratar una afección, enfermedad o trastorno en un paciente en la que está implicada la actividad de transportadores de ABC, que comprende la etapa de administrar a dicho paciente un compuesto seleccionado de

35

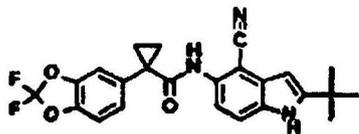
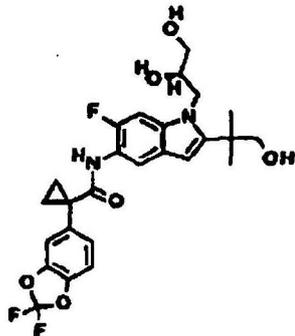
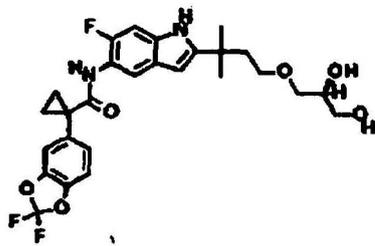
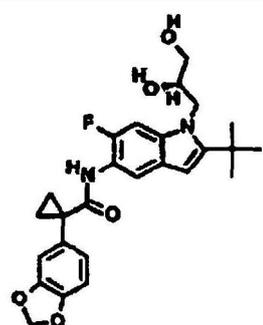
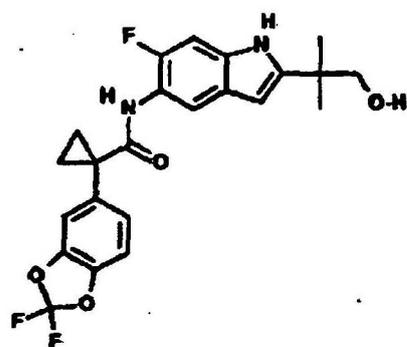
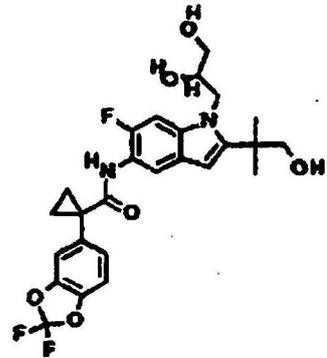
308	309	
310	311	312

55

60

65

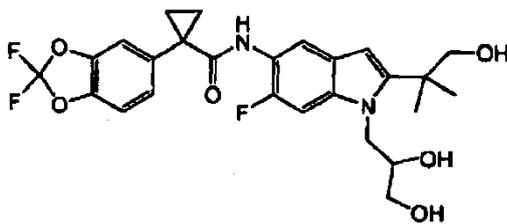
(continuación)

<p>5</p> <p>10</p> <p>15</p>	<p>313</p> 		<p>315</p> 
<p>20</p> <p>25</p> <p>30</p>	<p>316</p> 		<p>318</p> 
<p>35</p> <p>40</p> <p>45</p>	<p>320</p> 	<p>y</p>	<p>322</p> 

50 16. El método según la cláusula 15, en el que dicha afección, enfermedad o trastorno está seleccionado de fibrosis quística, enfisema hereditario, hemocromatosis hereditaria, deficiencias en la coagulación-fibrinólisis, tales como deficiencia de proteína C, angioedema hereditario tipo 1, deficiencias del procesamiento de lípidos, tales como hipercolesterolemia familiar, quilomicronemia tipo 1, abetalipoproteinemia, enfermedades de almacenamiento de lisosomas, tales como enfermedad de las células I/pseudo-Hurler, mucopolisacaridosis, Sandhoff/Tay-Sachs, Crigler-Najjar tipo II, poliendocrinopatía/hiperinsulinemia, diabetes mellitus, enanismo de Laron, deficiencia de mieloperoxidasa, hipoparatiroidismo primario, melanoma, glicanosis CDG tipo 1, enfisema hereditario, hipertiroidismo congénito, osteogénesis imperfecta, hipofibrinogenemia hereditaria, deficiencia de ACT, diabetes insípida (DI), DI neurohipofisaria, DI nefrogénica, síndrome de Charcot-Marie-Tooth, enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher, enfermedades neurodegenerativas, tales como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, parálisis supranuclear progresiva, enfermedad de Pick, varios trastornos neurológicos de la poliglutamina, tales como Huntington, ataxia espinocerebelosa tipo I, atrofia muscular espinal y bulbar, atrofia dentato-rubro-pálido-luisiana y distrofia miotónica, además de encefalopatías espongiiformes, tales como enfermedad hereditaria de Creutzfeldt-Jakob, enfermedad de Fabry, síndrome de Sträussler-Scheinker, EPOC, enfermedad del ojo seco y enfermedad de Sjögren.

65 17. El método de las cláusulas 15 ó 16, en el que el compuesto es

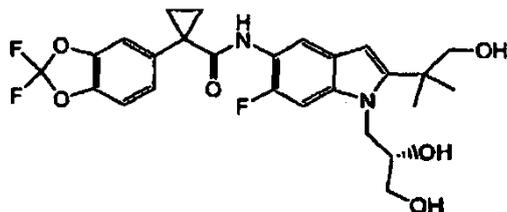
5



10

18. El método de las cláusulas 15 ó 16, en el que el compuesto es

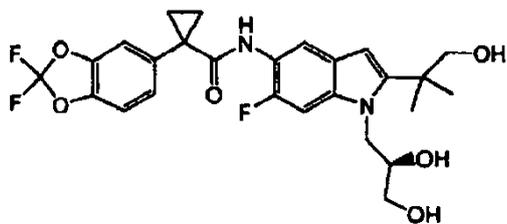
15



20

19. El método de las cláusulas 15 ó 16, en el que el compuesto es

25



30

20. Un kit para su uso en medir la actividad de un transportador de ABC o un fragmento del mismo en una muestra biológica *in vitro* o *in vivo*, que comprende:

35

- (i) una primera composición que comprende un compuesto seleccionado de la cláusula 1; y
- (ii) instrucciones para:

40

- a) poner en contacto la composición con la muestra biológica;
- b) medir la actividad de dicho transportador de ABC o un fragmento del mismo.

21. El kit según la cláusula 20, que comprende además instrucciones para

45

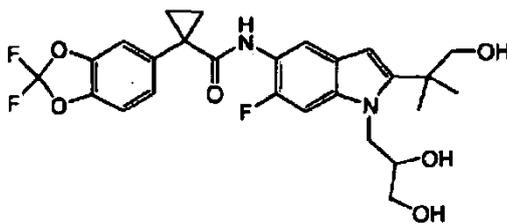
- a) poner en contacto una composición adicional con la muestra biológica;
- b) medir la actividad de dicho transportador de ABC o un fragmento del mismo en presencia de dicho compuesto adicional, y
- c) comparar la actividad del transportador de ABC en presencia del compuesto adicional con la densidad del transportador de ABC en presencia de dicha primera composición.

50

22. El kit de la cláusula 20, en el que el kit se usa para medir la densidad de CFTR.

23. El kit de cualquiera de las cláusulas 20-22, en el que el compuesto es

55

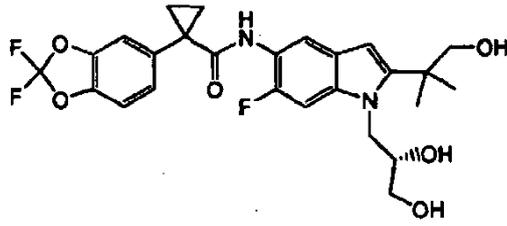


60

24. El kit de cualquiera de las cláusulas 20-22, en el que el compuesto es

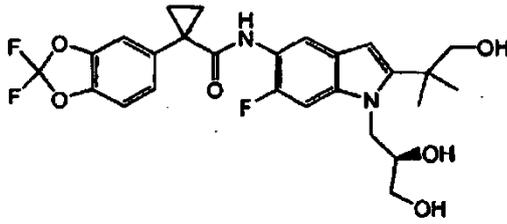
65

5



10 25. El kit de cualquiera de las cláusulas 20-22, en el que el compuesto es

15

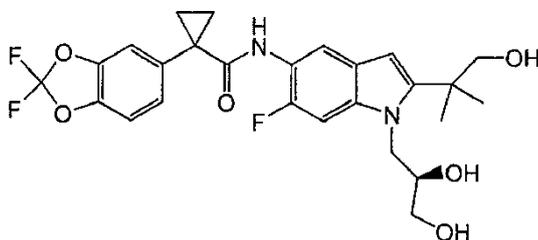


20

## Reivindicaciones

1. Un compuesto que es:

5



10

15 2. Una composición farmacéutica que comprende (i) un compuesto según la reivindicación 1; y (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

3. La composición de la reivindicación 2, que comprende además un agente adicional seleccionado de un agente mucolítico, broncodilatador, un antibiótico, un agente antiinfeccioso, un agente antiinflamatorio, corrector de CFTR, potenciador de CFTR, o un agente nutritivo.

20

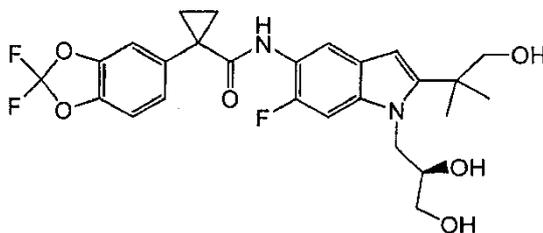
4. La composición de la reivindicación 3, en la que el agente adicional es un potenciador de CFTR.

5. La composición de la reivindicación 4, en la que el potenciador es N-(5-hidroxi-2,4-di-*tert*-butil-fenil)-4-oxo-1H-quinolin-3-carboxamida.

25

6. Un método *in vitro* de aumentar el número de transportadores de ABC funcionales en una membrana de una célula *in vitro*, que comprende la etapa de poner en contacto dicha célula con un compuesto que es:

30

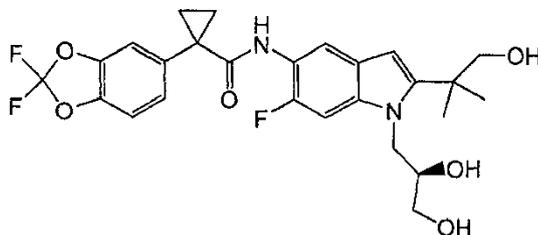


35

40 7. El método *in vitro* de la reivindicación 6, en el que el transportador de ABC es CFTR.

8. Un compuesto que es:

45



50

55 para su uso en el tratamiento de una afección, enfermedad o trastorno en un paciente en la que está implicada la actividad de transportadores de ABC, en el que dicha afección, enfermedad o trastorno está seleccionado de fibrosis quística, enfisema hereditario, hemocromatosis hereditaria, deficiencias en la coagulación-fibrinólisis, tales como deficiencia de proteína C, angioedema hereditario tipo 1, deficiencias del procesamiento de lípidos, tales como hipercolesterolemia familiar, quilomicronemia tipo 1, abetalipoproteinemia, enfermedades de almacenamiento de lisosomas, tales como enfermedad de células I/pseudo-Hurler, mucopolisacaridosis, Sandhof/Tay-Sachs, Crigler-Najjar tipo II, poliendocrinopatía/hiperinsulinemia, diabetes mellitus, enanismo de Laron, deficiencia de mieloperoxidasa, hipoparatiroidismo primario, melanoma, glicanosis CDG tipo 1, enfisema hereditario, hipertiroidismo congénito, osteogénesis imperfecta, hipofibrinogenemia hereditaria, deficiencia de ACT, diabetes insípida (DI), DI neurohipofisaria, DI nefrogénica, síndrome de Charcot-Marie-Tooth, enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher, enfermedades neurodegenerativas, tales como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, parálisis supranuclear progresiva, enfermedad de Pick, varios trastornos neurológicos de la poliglutamina, tales como Huntington, ataxia espinocerebelosa tipo I, atrofia muscular espinal y bulbar, atrofia

65

dentato-rubro-pálido-luisiana y distrofia miotónica, además de encefalopatías espongiiformes, tales como enfermedad hereditaria de Creutzfeldt-Jakob, enfermedad de Fabry, síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, EPOC, enfermedad del ojo seco y enfermedad de Sjögren.

- 5 9. El compuesto para su uso de la reivindicación 8, en el que la afección, enfermedad o trastorno es fibrosis quística.
10. Un kit para su uso en medir la actividad de un transportador de ABC o un fragmento del mismo en una muestra biológica *in vitro* o *in vivo*, que comprende:
- 10 (i) una primera composición que comprende el compuesto de la reivindicación 1; y  
(ii) instrucciones para:
- 15 a) poner en contacto la composición con la muestra biológica;  
b) medir la actividad de dicho transportador de ABC o un fragmento del mismo.
11. El kit para su uso según la reivindicación 10, que comprende además instrucciones para
- 20 a) poner en contacto una composición adicional con la muestra biológica;  
b) medir la actividad de dicho transportador de ABC o un fragmento del mismo en presencia de dicho compuesto adicional, y  
c) comparar la actividad del transportador de ABC en presencia del compuesto adicional con la densidad del transportador de ABC en presencia de dicha primera composición.
- 25 12. El kit para su uso de la reivindicación 10, en el que el kit se usa para medir la densidad de CPTR.