

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 654 414**

51 Int. Cl.:

C07D 215/233 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.03.2010 E 14182117 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.09.2017 EP 2821400**

54 Título: **Proceso de preparación de moduladores del regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística**

30 Prioridad:

20.03.2009 US 162148 P

28.09.2009 US 246303 P

05.10.2009 US 248565 P

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

13.02.2018

73 Titular/es:

**VERTEX PHARMACEUTICALS INCORPORATED
(100.0%)
50 Northern Avenue
Boston, MA 02210, US**

72 Inventor/es:

**DEMATTEI, JOHN;
LOOKER, ADAM R.;
NEUBERT-LANGILLE, BOBBIANA;
TRUDEAU, MARTIN;
ROPER, STEFANIE;
RYAN, MICHAEL;
YAP, DAHRIKA MILFRED LAO;
KRUEGER, BRIAN R.;
GROOTENHUIS, PETER D.J.;
VAN GROOR, FREDERICK F.;
BOTFIELD, MARTYN C. y
ZLOKARNIK, GREGOR**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 654 414 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).

Proceso de preparación de moduladores del regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística

Descripción

5

REIVINDICACION DE PRIORIDAD

10

Esta solicitud reivindica prioridad de tres Solicitudes Provisionales U.S. que tienen N° de Serie 61/162.148, presentada el 20 de Marzo del 2009; 61/246.303, presentada el 28 de Septiembre del 2009; y 61/248.565, presentada el 5 de Octubre del 2009.

CAMPO TECNICO DE LA INVENCION

15

La presente invención se refiere a productos intermedios que pueden usarse para producir moduladores del regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística ("CFTR"), y aun proceso para hacer dichos productos intermedios.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

20

La fibrosis quística (FQ) es una enfermedad genética recesiva que afecta a aproximadamente 30.000 niños y adultos en los Estados Unidos y a aproximadamente 30.000 niños y adultos en Europa. A pesar del progreso en el tratamiento de la FQ, no hay cura.

25

La FQ se produce por mutaciones en el gen regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) que codifica un canal de iones cloruro epitelial responsable de ayudar en la regulación de la absorción de sal y agua y la secreción en diversos tejidos. Fármacos de molécula pequeña, conocidos como potenciadores que aumentan la probabilidad de apertura de canales de CFTR, representan una posible estrategia terapéutica para tratar FQ.

30

Específicamente, CFTR es un canal de aniones mediado por AMPc/ATP que se expresa en una variedad de tipos de células, que incluyen células 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 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.

40

Se ha identificado el gen que codifica CFTR y secuenciado (véanse Gregory, R. J. et al. (1990) Nature 347:382-386; Rich, D. P. et al. (1990) Nature 347:358-362), (Riordan, J. R. et al. (1989) Science 245:1066-1073). Un defecto en este gen produce mutaciones en CFTR produciendo fibrosis quística ("FQ"), la enfermedad genética mortal más 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.

50

En pacientes con FQ, 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 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 resistencia al cólera y a deshidratación resultante de diarrea – que quizás explica la frecuencia relativamente alta del gen de FQ dentro de la población.

60

El análisis de secuencias del gen CFTR de cromosomas de FQ ha revelado una variedad de mutaciones causantes de enfermedad (Cutting, G. R. et al. (1990) Nature 346:366-369; Dean, M. et al. (1990) Cell 61:863-870; y Kerem, B-S. et al. (1989) Science 245:1073-1080; Kerem, B-S et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:8447-8451). Hasta la fecha, se han identificado más de 1000 mutaciones causantes de enfermedad en el gen de FQ (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/app>). 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

65

en aproximadamente el 70 % de los casos de fibrosis quística y está asociada a una enfermedad grave.

La delección del residuo 508 en $\Delta F508$ -CFTR previene que la proteína naciente se pliegue correctamente. Esto 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 et al. (1991), Nature Lond. 354: 526-528; Denning et al., 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.

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 Na^+ epitelial, ENaC, co-transportador de $\text{Na}^+ / 2\text{Cl}^- / \text{K}^+$, bomba de $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPasa y los canales de K^+ de la membrana basolateral, que son responsables de la captación de cloruro en la célula.

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 iones 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 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 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.

Como se ha tratado anteriormente, se cree que la delección del residuo 508 en $\Delta F508$ -CFTR previene que la proteína naciente 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.

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

Existe la necesidad de métodos para tratar enfermedades causadas por mutación en CFTR usando tales moduladores de la actividad de CFTR.

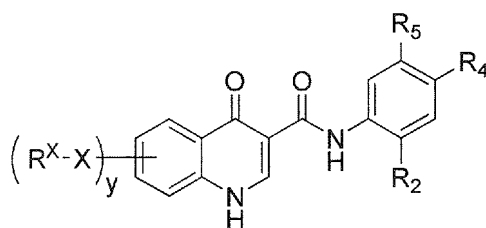
Existe la necesidad de métodos de modulación de la actividad de CFTR en una membrana celular *ex vivo* de un mamífero.

También existe la necesidad de procesos para la preparación de compuestos que modulan la actividad de CFTR. El documento WO2007/134279 A2 describe composiciones farmacéuticas que incluyen N-(2,4-di-terc-butil-5-hidroxifenil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida y métodos de uso de tales composiciones. El documento WO2009/2007/079139 A2 se refiere a formas en estado sólido de N-(2,4-di-terc-butil-5-hidroxifenil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida, composiciones farmacéuticas que comprenden dichas formas sólidas, y métodos para usar dichas formas en estado sólido.

RESUMEN DE LA INVENCION

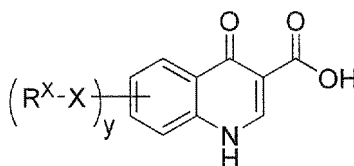
En general, la invención proporciona productos intermedios que pueden usarse para producir moduladores de CFTR, y a procesos para hacer tales productos intermedios.

En la presente se divulga un proceso para la preparación de un compuesto de fórmula 1,



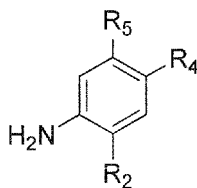
10 **Formula 1**

que comprende acoplar un ácido carboxílico de fórmula 2



20 **Formula 2**

25 con una anilina de fórmula 3



35 **Formula 3**

en presencia de un agente de acoplamiento seleccionado del grupo que consiste en tetrafluoroborato de 2-cloro-1,3-dimetil-2-imidazolio, HBTU, HCTU, 2-cloro-4,6-dimetoxi-1,3,5-triazina, HATU, HOBT/EDC y T3P®.

40 Cada R₂ y R₄ está seleccionado independientemente de hidrógeno, CN, CF₃, halógeno, alquilo C₁₋₆ lineal o ramificado, cicloalifático de 3-12 miembros, fenilo, heteroarilo C₅₋₁₀ o heterocíclico C₃₋₇, en el que dicho heteroarilo o heterocíclico tiene hasta 3 heteroátomos seleccionados de O, S o N, y cada alquilo C₁₋₆ lineal o ramificado, cicloalifático de 3-12 miembros, fenilo, heteroarilo C₅₋₁₀ o heterocíclico C₃₋₇ está independientemente y opcionalmente sustituido con hasta tres sustituyentes seleccionados de -OR', -CF₃, -OCF₃, SR', S(O)R', SO₂R', -SCF₃, halógeno, CN, -COOR', -COR', -O(CH₂)₂N(R')(R'), -O(CH₂)N(R')(R'), -CON(R')(R'), -(CH₂)₂OR', -(CH₂)OR', CH₂CN, fenilo o fenoxi opcionalmente sustituido, -N(R')(R'), -NR'C(O)OR', -NR'C(O)R', -(CH₂)₂N(R')(R') o -(CH₂)N(R')(R').

45 Cada R₅ está seleccionado independientemente de hidrógeno, -OH, NH₂, CN, CHF₂, NHR', N(R')₂, -NHC(O)R', NHC(O)OR', NHSO₂R', -OR', OC(O)OR', OC(O)NHR', OC(O)NR'₂, CH₂OH, CH₂N(R')₂, C(O)OR', SO₂NHR', SO₂N(R')₂ o CH₂NHC(O)OR'.

50 O R₄ y R₅ tomados conjuntamente forman un anillo de 5-7 miembros que contiene 0-3 tres heteroátomos seleccionados de N, O o S, en el que dicho anillo está opcionalmente sustituido con hasta tres sustituyentes R₃.

55 Cada X es independientemente un enlace o es una cadena de alquilideno C₁₋₆ opcionalmente sustituida en la que hasta dos unidades de metileno de X están opcionalmente e independientemente sustituidas con -CO-, -CS-, -COCO-, -CONR'-, -CONRNR'-, -CO₂-, -OCO-, -NR'CO₂-, -O-, -NR'CONR'-, -OCONR'-, -NR'NR', -NR'NR'CO-, -NR'CO-, -S-, -SO-, -SO₂-, -NR'-, -SO₂NR'-, NR'SO₂- o -NR'SO₂NR'-. Cada R^X es independientemente R', halógeno, NO₂, CN, CF₃ o OCF₃.

60 y es un número entero de 0-4.

65 Cada R' está seleccionado independientemente de hidrógeno o un grupo opcionalmente sustituido seleccionado de un grupo alifático C₁₋₈, un anillo monocíclico de 3-8 miembros saturado, parcialmente insaturado o

completamente insaturado que tiene 0-3 heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno o azufre, o sistema de anillos bicíclico de 8-12 miembros saturado, parcialmente insaturado o completamente insaturado que tiene 0-5 heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno o azufre; o dos apariciones de R' se toman conjuntamente con el (los) átomo(s) a los que están unidos para formar un anillo monocíclico o bicíclico de 3-12 miembros saturado, parcialmente insaturado o completamente insaturado opcionalmente sustituido que tiene 0-4 heteroátomos independientemente seleccionados de N, O o S.

Cada R₃ es independientemente -alquilo C₁-C₃, perhaloalquilo C₁-C₃, -O(alquilo C₁-C₃), -CF₃, -OCF₃, -SCF₃, -F, -Cl, -Br, -COOR', -COR', -O(CH₂)₂N(R')(R'), -O(CH₂)N(R')(R'), -CON(R')(R'), -(CH₂)₂OR', -(CH₂)OR', anillo aromático monocíclico o bicíclico opcionalmente sustituido, arilsulfona opcionalmente sustituida, anillo de heteroarilo de 5 miembros opcionalmente sustituido, -N(R')(R'), -(CH₂)₂N(R')(R') o -(CH₂)N(R')(R').

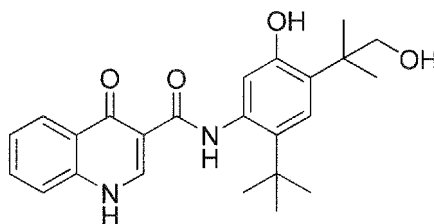
Realizaciones de este aspecto incluyen una o más de las siguientes características. R₅ es independientemente -OC(O)OR', -OC(O)NHR' o -OC(O)N(R')₂, y R' no es hidrógeno; al menos uno de R₄ o R₂ es independientemente un alquilo C₁₋₆ lineal o ramificado que está sustituido con -COOR' o -CON(R')(R'), y R' no es hidrógeno. El proceso comprende además escindir el grupo -OC(O)OR', -OC(O)NHR' o -OC(O)N(R')₂ para formar -OH. El proceso comprende además hidrolizar cada grupo -COOR' o -CON(R')₂ para formar -COOH. La hidrólisis se realiza tratando un compuesto de fórmula 1 con un disolvente alcohólico en presencia de base tal como NaOH, KOH o metóxido de sodio. El disolvente alcohólico usado en la hidrólisis es metanol. El acoplamiento de un compuesto de fórmula 2 y un compuesto de fórmula 3 para producir un compuesto de fórmula 1 se realiza en presencia de una base tal como K₂CO₃, Et₃N, NMM, piridina o DIEA. El acoplamiento de un compuesto de fórmula 2 y un compuesto de fórmula 3 para producir un compuesto de fórmula 1 se realiza en presencia de un disolvente tal como EtOAc, IPAc, THF, MEK, NMP, acetonitrilo, DMF o 2-metiltetrahidrofurano. El acoplamiento de un compuesto de fórmula 2 y un compuesto de fórmula 3 para producir un compuesto de fórmula 1 se realiza a una temperatura de reacción que se mantiene entre aproximadamente 10 °C y 78 °C, tal como entre aproximadamente 20 °C y 30 °C, entre aproximadamente 40 °C y 50 °C, y entre aproximadamente 42 °C y 53 °C. La reacción de acoplamiento se agita durante al menos 2 horas tal como durante al menos 70 horas o durante al menos 3 días.

En algunas realizaciones, R₅ es independientemente -OC(O)OR', -OC(O)NHR' o -OC(O)N(R')₂, y R' no es hidrógeno; y cada uno de R₂ y R₄ está seleccionado independientemente de hidrógeno, CF₃, alquilo C₁-C₆ lineal o ramificado, cicloalifático de 3-12 miembros o fenilo.

En algunas realizaciones adicionales, R₅ es independientemente -OC(O)OR', y R' no es hidrógeno; y cada uno de R₂ y R₄ es independientemente alquilo C₁-C₆ lineal o ramificado o cicloalifático de 3-12 miembros.

En algunas realizaciones, R₂ y R₄ son *t*-butilo.

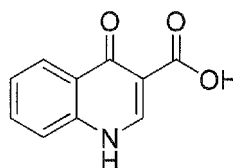
En la presente se describe un proceso para la preparación del compuesto 27



Compuesto 27

que comprende:

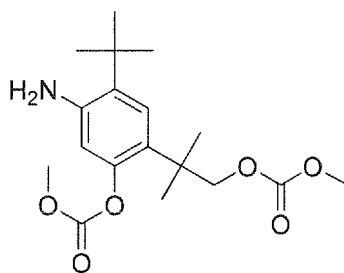
(a) acoplar el compuesto 26



Compuesto 26

con el compuesto 13

5



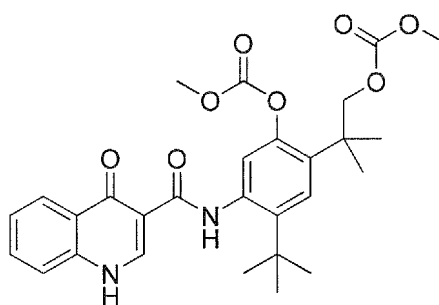
10

Compuesto 13

15

en presencia de EDCI, HOBT y DIEA usando DMF como disolvente, en el que la temperatura de reacción se mantiene entre aproximadamente 20 °C y 30 °C, y la reacción se deja avanzar durante al menos 70 horas, para producir el compuesto **14**

20



25

Compuesto 14 ;

30

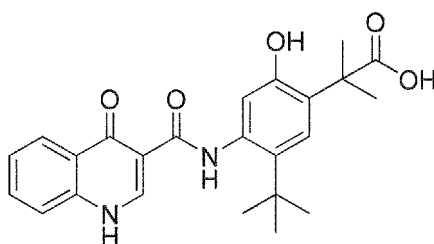
y

35

(b) tratar el compuesto **14** con KOH en metanol.

En la presente se describe un proceso para la preparación del compuesto **28**

40



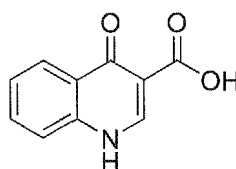
45

Compuesto 28

50 que comprende:

(a) acoplar el compuesto **26**

55



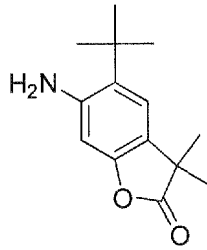
60

Compuesto 26

65

con el compuesto **20**

5



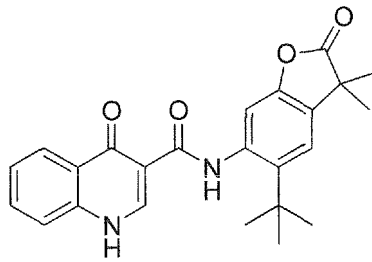
10

Compuesto 20

15

en presencia de HATU y DIEA usando acetonitrilo como disolvente, en el que la temperatura de reacción se mantiene entre aproximadamente 40 °C y 50 °C, y en el que la reacción se deja avanzar durante al menos 3 días, para producir el compuesto **21**

20



25

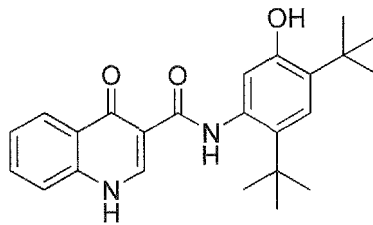
Compuesto 21 ;

30

(b) tratar el compuesto 21 con NaOH en metanol.

En la presente se describe un proceso para la preparación del compuesto **34**

35



40

Compuesto 34

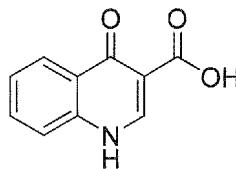
45

que comprende:

50

(a) acoplar el compuesto **26**

55

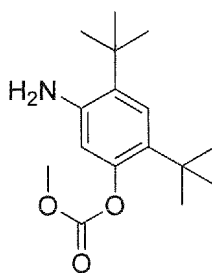


Compuesto 26

60

con el compuesto **32**

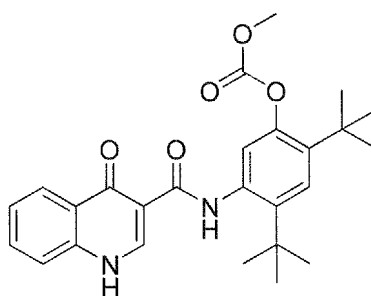
65



10

Compuesto 32

15 en presencia de T3P® y piridina usando 2-metiltetrahidrofurano como disolvente, en el que la temperatura de reacción se mantiene entre aproximadamente 42 °C y 53 °C, y en el que la reacción se deja avanzar durante al menos 2 horas, para producir el compuesto **33**



25

Compuesto 33 ;

30 (b) tratar el compuesto 33 con NaOMe/MeOH en 2-metiltetrahidrofurano.

35 En una realización, el método incluye adicional la etapa de formar una suspensión del compuesto 34 en una mezcla de acetonitrilo y agua, en el que la forma sólida del compuesto **34** se convierte en el compuesto **34**.

40 Realizaciones del aspecto anterior incluyen una o más de las siguientes características. El proceso comprende además disolver el compuesto **34** en una disolución bifásica de 2-metiltetrahidrofurano y HCl 0,1 N, que se agita. El proceso comprende además separar la fase orgánica de la disolución bifásica. El proceso comprende además filtrar y eliminar materia sólida de la fase orgánica. El proceso comprende además reducir el volumen de la fase orgánica aproximadamente el 50 % usando destilación. El proceso comprende además realizar tres veces el procedimiento de: añadir MeOAc, EtOAc, IPAc, *t*-BuOAc, tetrahidrofurano (THF), Et₂O o metil-*t*-butil éter (MTBE) a la fase orgánica hasta que el volumen de la fase orgánica aumente el 100 % y reducir el volumen de la fase orgánica el 50 % usando destilación. El proceso comprende además añadir MeOAc, EtOAc, IPAc, *t*-BuOAc, tetrahidrofurano (THF), Et₂O o metil-*t*-butil éter (MTBE) a la fase orgánica hasta que el volumen de la fase orgánica aumente el 100 %. El proceso comprende además calentar la fase orgánica a temperatura de reflujo, y mantener dicha temperatura de reflujo durante un tiempo de al menos aproximadamente 5 horas. El proceso comprende además enfriar la fase orgánica a una temperatura entre -5 °C y 5 °C durante un periodo de tiempo de 4,5 horas a 5,5 horas.

50 En la presente se describen compuestos producidos por cualquier proceso descrito en el presente documento.

55 En la presente se describe una composición farmacéutica que comprende un compuesto producido por cualquier proceso descrito en el presente documento.

60 En la presente se describe un método de modulación de la actividad de CFTR en una muestra biológica que comprende la etapa de poner en contacto dicha muestra biológica con un compuesto producido por cualquier proceso descrito en el presente documento.

65 En la presente se describe un método para tratar o reducir la gravedad de una enfermedad en un paciente que comprende administrar a dicho paciente una de las composiciones que se definen en el presente documento, y dicha enfermedad está seleccionada de fibrosis quística, asma, EPOC inducida por humo, bronquitis crónica, rinosinusitis, estreñimiento, pancreatitis, insuficiencia pancreática, esterilidad masculina producida por ausencia bilateral congénita de conductos deferentes (CBAVD), enfermedad pulmonar leve, pancreatitis idiopática,

5 aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA), enfermedad hepática, enfisema hereditario, hemocromatosis hereditaria, deficiencias en la coagulación-fibrinólisis, tales como deficiencia de proteína C, angioedema hereditario tipo 1, deficiencias en el procesamiento de lípidos, tales como hipercolesterolemia familiar, quilomiconemia tipo 1, abetalipoproteinemia, enfermedades de almacenamiento de lisosomas, tales como enfermedad de las células
 10 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, 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
 15 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 (debido a defecto en el procesamiento de las proteínas priónicas), enfermedad de Fabry, síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, EPOC, enfermedad del ojo seco, o
 20 enfermedad de Sjögren, osteoporosis, osteopenia, consolidación ósea y crecimiento óseo (incluyendo reparación ósea, regeneración ósea, reducción de la resorción ósea y aumento de la deposición ósea), síndrome de Gorham, canalopatías de cloruro tales como miotonía congénita (formas de Thomson y de Becker), síndrome de Bartter tipo III, enfermedad de Dent, hiperekplexia, epilepsia, hiperekplexia, enfermedad de almacenamiento de lisosomas, síndrome de Angelman y discinesia ciliar primaria (DCP), un término para trastornos heredados de la estructura y/o
 función de los cilios, que incluye DCP con situs inverso (también conocida como síndrome de Kartagener), DCP sin situs inverso y aplasia ciliar.

En ciertas realizaciones, la enfermedad es fibrosis quística.

25 En la presente se describe un kit para su uso en medir la actividad de CFTR o un fragmento del mismo en una muestra biológica *in vitro* o *in vivo*, que comprende:

- 30 i. una composición que comprende un compuesto producido por cualquier proceso descrito en el presente documento; y
 ii. instrucciones para:
- a. poner en contacto la composición con la muestra biológica; y
 - b. medir la actividad de dicho CFTR o un fragmento del mismo.

35 En ciertas realizaciones, el kit comprende además instrucciones para:

- i. poner en contacto un compuesto adicional con la muestra biológica;
- ii. medir la actividad de dicho CFTR o un fragmento del mismo en presencia de dicho compuesto adicional;
- y
- 40 iii. comparar la actividad de CFTR en presencia del compuesto adicional con la densidad de CFTR en presencia de una composición de fórmula 1.

45 Ventajosamente, la invención proporciona procesos para la síntesis de compuestos útiles como moduladores de CFTR con mayor rendimiento y con mayor pureza con respecto a los procesos conocidos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

I. DEFINICIONES

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

55 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. et al., J. Gen. Physiol. (1998): 111(3), 477-90.

60 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).

65 El término “modular”, como se usa en el presente documento, significa aumentar o disminuir por una cantidad medible.

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 en el presente documento por referencia.

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. Se apreciará que la expresión "opcionalmente sustituido" se usa indistintamente con el término "sustituido o sin sustituir". 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.

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. Combinaciones de sustituyentes concebidas por la presente invención son preferentemente aquellas combinaciones que producen la formación de compuestos estables o químicamente factibles.

El término "estable", 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.

El término "alifático" o "grupo alifático", como se usa en el presente documento, significa una cadena lineal (es decir, sin ramificar) o cadena de hidrocarburo ramificada, sustituida o sin sustituir, que está completamente saturada o que contiene una o más unidades de insaturación, o un hidrocarburo monocíclico o hidrocarburo bicíclico que está completamente saturado o que contiene una o más unidades de insaturación, pero que no es aromático (también denominado en el presente documento "carbociclo", "cicloalifático" o "cicloalquilo"), que tiene un único punto de unión con el resto de la molécula. A menos que se especifique de otro modo, grupos alifáticos contienen 1-20 átomos de carbono alifáticos. En algunas realizaciones, los grupos alifáticos contienen 1-10 átomos de carbono alifáticos. En otras realizaciones, los grupos alifáticos contienen 1-8 átomos de carbono alifáticos. En todavía más realizaciones, los grupos alifáticos contienen 1-6 átomos de carbono alifáticos, y en todavía otras realizaciones, los grupos alifáticos contienen 1-4 átomos de carbono alifáticos. En algunas realizaciones, "cicloalifático" (o "carbociclo" o "cicloalquilo") se refiere a un hidrocarburo C₃-C₈ monocíclico o hidrocarburo C₈-C₁₄ bicíclico o tricíclico que está completamente saturado o que contiene una o más unidades de insaturación, pero que no es aromático, que tiene un único punto de unión con el resto de la molécula en el que cualquier anillo individual en dicho sistema de anillos bicíclicos tiene 3-7 miembros. Grupos alifáticos adecuados incluyen, pero no se limitan a, grupos alquilo, alqueno, alquino lineales o ramificados, sustituidos o sin sustituir, e híbridos de los mismos tales como (cicloalquil)alquilo, (cicloalqueno)alquilo o (cicloalquino)alquilo. Grupos cicloalifáticos adecuados incluyen cicloalquilo, cicloalqueno bicíclico (por ejemplo, decalina), bicicloalquilo con puentes tal como norbornilo o [2.2.2]biciclo-octilo, o tricíclico con puentes tal como adamantilo.

El término "heteroalifático", como se usa en el presente documento, significa grupos alifáticos en los que uno o dos átomos de carbono están independientemente sustituidos con uno o más de oxígeno, azufre, nitrógeno, fósforo o silicio. Los grupos heteroalifáticos pueden estar sustituidos o sin sustituir, ramificados o sin ramificar, cíclicos o acíclicos, e incluyen grupos "heterociclo", "heterociclilo", "heterocicloalifático" o "heterocíclico".

El término "heterociclo", "heterociclilo", "heterocicloalifático" o "heterocíclico", como se usa en el presente documento, significa sistemas de anillos no aromáticos, monocíclicos, bicíclicos o tricíclicos en los que uno o más miembros de anillo es un heteroátomo independientemente seleccionado. En algunas realizaciones, el grupo "heterociclo", "heterociclilo", "heterocicloalifático" o "heterocíclico" tiene tres a catorce miembros de anillo en los que uno o más miembros de anillo es un heteroátomo independientemente seleccionado de oxígeno, azufre, nitrógeno o fósforo, y cada anillo en el sistema contiene 3 a 7 miembros de anillo.

El término "heteroátomo" significa uno o más de oxígeno, azufre, nitrógeno, fósforo o silicio (incluyendo cualquier forma oxidada de nitrógeno, azufre, fósforo o silicio; la forma cuaternizada de cualquier nitrógeno básico o; un nitrógeno sustituible de un anillo heterocíclico, por ejemplo, N (como en 3,4-dihidro-2H-pirrolilo), NH (como en pirrolidinilo) o NR⁺ (como en pirrolidinilo N-sustituido)).

El término "insaturado", como se usa en el presente documento, significa que un resto tiene una o más

unidades de insaturación.

El término "alcoxi", o "tioalquilo", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo alquilo, como se ha definido previamente, unido a la cadena de carbono principal mediante un átomo de oxígeno ("alcoxi") o de azufre ("tioalquilo").

Los términos "haloalifático" y "haloalcoxi" significan alifático o alcoxi, según sea el caso, sustituido con uno o más átomos de halógeno. El término "halógeno" o "halo" significa F, Cl, Br o I. Ejemplos de haloalifático incluyen -CH₂, -CH₂F, -CF₃, -CF₂- o perhaloalquilo, tal como -CF₂CF₃.

El término "arilo", usado solo o como parte de un resto mayor como en "aralquilo", "aralcoxi", o "ariloxialquilo", se refiere a sistemas de anillos monocíclicos, bicíclicos y tricíclicos que tienen un total de cinco a catorce miembros de anillo, en los que al menos un anillo en el sistema es aromático y en los que cada anillo en el sistema contiene 3 a 7 miembros de anillo. El término "arilo" puede usarse indistintamente con el término "anillo de arilo". El término "arilo" también se refiere a sistemas de anillos de heteroarilo como se define en el presente documento más adelante.

El término "heteroarilo", usado solo o como parte de un resto mayor como en "heteroaralquilo" o "heteroarilalcoxi", se refiere a sistemas de anillos monocíclicos, bicíclicos y tricíclicos que tienen un total de cinco a catorce miembros de anillo, en los que al menos un anillo en el sistema es aromático, al menos un anillo en el sistema contiene uno o más heteroátomos, y en los que cada anillo en el sistema contiene 3 a 7 miembros de anillo. El término "heteroarilo" puede usarse indistintamente con el término "anillo de heteroarilo" o el término "heteroaromático".

Un grupo arilo (incluyendo aralquilo, aralcoxi, ariloxialquilo y similares) o heteroarilo (incluyendo heteroaralquilo y heteroarilalcoxi y similares) puede contener uno o más sustituyentes. Sustituyentes adecuados sobre el átomo de carbono insaturado de un grupo arilo o heteroarilo están seleccionados de halógeno; -R°; -OR°; -SR°; 1,2-metilen-dioxi; 1,2-etilendioxi; fenilo (Ph) opcionalmente sustituido con R°; -O(Ph) opcionalmente sustituido con R°; -(CH₂)₁₋₂(Ph), opcionalmente sustituido con R°; -CH=CH(Ph), opcionalmente sustituido con R°; -NO₂; -CN; -N(R°)₂; -NR°C(O)R°; -NR°C(O)N(R°)₂; -NR°CO₂R°; -NR°NR°C(O)R°; -NR°NR°C(O)N(R°)₂; -NR°NR°CO₂R°; -C(O)C(O)R°; -C(O)CH₂C(O)R°; -CO₂R°; -C(O)R°; -C(O)N(R°)₂; -OC(O)N(R°)₂; -S(O)₂R°; -SO₂N(R°)₂; -S(O)R°; -NR°SO₂N(R°)₂; -NR°SO₂R°; -C(=S)N(R°)₂; -C(=NH)-N(R°)₂; o -(CH₂)O₂NHC(O)R° en los que cada aparición independiente de R° está seleccionada de hidrógeno, alifático C₁₋₆ opcionalmente sustituido, un heteroarilo o anillo heterocíclico de 5-6 miembros sin sustituir, fenilo, -O(Ph) o -CH₂(Ph), o, a pesar de la definición anterior, dos apariciones independientes de R°, sobre el mismo sustituyente o sustituyentes diferentes, tomadas conjuntamente con el (los) átomo(s) a los que cada grupo R° está unido, forman un anillo de cicloalquilo, heterociclilo, arilo o heteroarilo de 3-8 miembros que tiene 0-3 heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno o azufre. Sustituyentes opcionales sobre el grupo alifático de R° están seleccionados de NH₂, NH(alifático C₁₋₄), N(alifático C₁₋₄)₂, halógeno, alifático C₁₋₄, OH, O(alifático C₁₋₄), NO₂, CN, CO₂H, CO₂(alifático C₁₋₄), O(haloalifático C₁₋₄) o haloalifático C₁₋₄, en los que cada uno de los grupos alifáticos C₁₋₄ anteriores de R° está sin sustituir.

Un grupo alifático o heteroalifático, o un anillo heterocíclico no aromático, puede contener uno o más sustituyentes. Sustituyentes adecuados sobre el carbono saturado de un grupo alifático o heteroalifático, o de un anillo heterocíclico no aromático, están seleccionados de aquellos enumerados anteriormente para el carbono insaturado de un grupo arilo o heteroarilo y adicionalmente incluyen los siguientes: =O, =S, =NNHR*, =NN(R*)₂, =NNHC(O)R*, =NNHCO₂(alquilo), =NNHSO₂(alquilo) o =NR*, en los que cada R* está seleccionado independientemente de hidrógeno o un alifático C₁₋₆ opcionalmente sustituido. Sustituyentes opcionales sobre el grupo alifático de R* están seleccionados de NH₂, NH(alifático C₁₋₄), N(alifático C₁₋₄)₂, halógeno, alifático C₁₋₄, OH, O(alifático C₁₋₄), NO₂, CN, CO₂H, CO₂(alifático C₁₋₄), O(haloalifático C₁₋₄) o halo(alifático C₁₋₄), en los que cada uno de los grupos alifáticos C₁₋₄ anteriores de R* está sin sustituir.

Sustituyentes opcionales sobre el nitrógeno de un anillo heterocíclico no aromático están seleccionados de -R⁺, -N(R⁺)₂, -C(O)R⁺, -CO₂R⁺, -C(O)C(O)R⁺, -C(O)CH₂C(O)R⁺, -SO₂R⁺, -SO₂N(R⁺)₂, -C(=S)N(R⁺)₂, -C(=NH)-N(R⁺)₂ o -NR⁺SO₂R⁺; en los que R⁺ es hidrógeno, un alifático C₁₋₆ opcionalmente sustituido, fenilo opcionalmente sustituido, -O(Ph) opcionalmente sustituido, -CH₂(Ph) opcionalmente sustituido, -(CH₂)₁₋₂(Ph) opcionalmente sustituido, -CH=CH(Ph) opcionalmente sustituido; o un heteroarilo o anillo heterocíclico de 5-6 miembros sin sustituir que tiene uno a cuatro heteroátomos independientemente seleccionados de oxígeno, nitrógeno o azufre, o, a pesar de la definición anterior, dos apariciones independientes de R⁺, sobre el mismo sustituyente o sustituyentes diferentes, tomadas conjuntamente con el (los) átomo(s) a los que cada grupo R⁺ está unido, forman un anillo de cicloalquilo, heterociclilo, arilo o heteroarilo de 3-8 miembros que tiene 0-3 heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno o azufre. Sustituyentes opcionales sobre el grupo alifático o el anillo de fenilo de R⁺ están seleccionados de NH₂, NH(alifático C₁₋₄), N(alifático C₁₋₄)₂, halógeno, alifático C₁₋₄, OH, O(alifático C₁₋₄), NO₂, CN, CO₂H, CO₂(alifático C₁₋₄), O(haloalifático C₁₋₄) o halo(alifático C₁₋₄), en los que cada uno de los anteriores grupos alifáticos C₁₋₄ de R⁺ está sin sustituir.

El término “cadena de alquilideno” se refiere a una cadena de carbono lineal o ramificada que puede estar completamente saturada o tener una o más unidades de insaturación y tiene dos puntos de unión al resto de la molécula. El término “espirocicloalquilideno” se refiere a un anillo carbocíclico que puede estar completamente saturado o tener una o más unidades de insaturación y tiene dos puntos de unión del mismo átomo de carbono del anillo al resto de la molécula.

El término “suspensión”, como se usa en el presente documento, se define como una mezcla que comprende un sólido y un líquido, en la que el sólido es, como mucho, parcialmente soluble en el líquido. El término “suspender” o “suspenso”, como se usa en el presente documento (ejemplo, “el producto sólido se suspendió durante 24 horas”), se define como el acto de crear una suspensión, y agitar dicha suspensión durante una longitud de tiempo.

El término “grupo protector” (PG), como se usa en el presente documento, representa aquellos grupos previstos para proteger un grupo funcional, tales como, por ejemplo, un alcohol, amina, carboxilo, carbonilo, etc., contra reacciones no deseables durante procedimientos de síntesis. Grupos protectores comúnmente usados se desvelan en Greene y Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 3ª Edición (John Wiley & Sons, New York, 1999), que se incorpora en el presente documento por referencia. Ejemplos de grupos protectores de nitrógeno incluyen grupos acilo, aroilo o carbamilo tales como formilo, acetilo, propionilo, pivaloilo, *t*-butilacetilo, 2-cloroacetilo, 2-bromoacetilo, trifluoroacetilo, tricloroacetilo, ftalilo, *o*-nitrofenoxiacetilo, α -clorobutirilo, benzoilo, 4-clorobenzoilo, 4-bromobenzoilo, 4-nitrobenzoilo y auxiliares quirales tales como D, L o D,L-aminoácidos protegidos o sin proteger tales como alanina, leucina, fenilalanina y similares; grupos sulfonilo tales como bencenosulfonilo, *p*-toluenosulfonilo y similares; grupos carbamato tales como benciloxicarbonilo, *p*-clorobenciloxicarbonilo, *p*-metoxibenciloxicarbonilo, *p*-nitrobenciloxicarbonilo, 2-nitrobenciloxicarbonilo, *p*-bromobenciloxicarbonilo, 3,4-dimetoxibenciloxicarbonilo, 3,5-dimetoxibenciloxicarbonilo, 2,4-dimetoxibenciloxicarbonilo, 4-metoxibenciloxicarbonilo, 2-nitro-4,5-dimetoxibenciloxicarbonilo, 3,4,5-trimetoxibenciloxicarbonilo, 1-(*p*-bifenilil)-1-metiletoxicarbonilo, α,α -dimetil-3,5-dimetoxibenciloxicarbonilo, benzhidriloxicarbonilo, *t*-butiloxicarbonilo, diisopropilmetoxicarbonilo, isopropiloxicarbonilo, etoxicarbonilo, metoxicarbonilo, aliloxicarbonilo, 2,2,2-tricloroetoxicarbonilo, fenoxicarbonilo, 4-nitrofenoxicarbonilo, fluorenil-9-metoxicarbonilo, ciclopentiloxicarbonilo, adamantiloxicarbonilo, ciclohexiloxicarbonilo, feniltiocarbonilo y similares, grupos arilalquilo tales como bencilo, trifenilmetilo, benciloximetilo y similares, y grupos sililo tales como trimetilsililo y similares. Otro grupo protector de *N* a modo de ejemplo es *tert*-butiloxicarbonilo (Boc).

Ejemplos de grupos protectores útiles para ácidos son ésteres de alquilo sustituido tales como 9-fluorenilmetilo, metoximetilo, metiltiometilo, tetrahidropirano, tetrahidrofuranilo, metoxietoximetilo, 2-(trimetilsilil)etoximetilo, benciloximetilo, pivaloiloximetilo, fenilacetoximetilo, triisopropilsililmetilo, cianometilo, acetol, fenacilo, ésteres de fenacilo sustituido, 2,2,2-tricloroetilo, 2-haloetilo, ω -cloroalquilo, 2-(trimetilsilil)etilo, 2-metiltioetilo, *t*-butilo, 3-metil-3-pentilo, diciticlopropilmetilo, ciclopentilo, ciclohexilo, alilo, metalilo, cinamilo, fenilo, ésteres de sililo, ésteres de bencilo y bencilo sustituido, ésteres de 2,6-dialquilfenilo tales como pentafluorofenilo, 2,6-dialquilfenilo. Otros grupos protectores para ácidos son ésteres de metilo o etilo.

Métodos de añadir (un proceso generalmente denominado “protección”) y eliminar (proceso generalmente denominado “desprotección”) tales grupos protectores de amina y ácido son muy conocidos en la técnica y están disponibles, por ejemplo, en P. J. Kocienski, Protecting Groups, Thieme, 1994, que se incorpora por este documento por referencia en su totalidad y en Greene y Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 3ª Edición (John Wiley & Sons, New York, 1999).

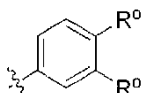
Ejemplos de disolventes adecuados que pueden usarse en la presente invención son, pero no se limitan a, agua, metanol, diclorometano (DCM), acetonitrilo, dimetilformamida (DMF), acetato de metilo (MeOAc), acetato de etilo (EtOAc), acetato de isopropilo (IPAc), acetato de *t*-butilo (*t*-BuOAc), alcohol isopropílico (IPA), tetrahidrofurano (THF), metiletilcetona (MEK), *t*-butanol, éter dietílico (Et₂O), metil-*t*-butil éter (MTBE), 1,4-dioxano y *N*-metilpirrolidona (NMP).

Ejemplos de agentes de acoplamiento adecuados que pueden usarse en la presente invención son, pero no se limitan a, clorhidrato de 1-(3-(dimetilamino)propil)-3-etil-carbodiimida (EDCI), hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HBTU), 1-hidroxibenzotriazol (HOBT), hexafluorofosfato de 2-(1H-7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HATU), tetrafluoroborato de 2-cloro-1,3-dimetil-2-imidazolilo, 1-H-benzotriazolium-1-[bis(dimetilamino)metileno]-5-clorohexafluorofosfato (HCTU), 2-cloro-4,6-dimetoxi-1,3,5-triazina y anhídrido 2-propanofosfónico (T3P®).

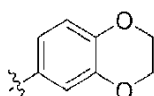
Ejemplos de bases adecuadas que pueden usarse en la presente invención son, pero no se limitan a, carbonato de potasio (K₂CO₃), *N*-metilmorfolina (NMM), trietilamina (Et₃N; TEA), diisopropiletilamina (*t*-Pr₂EtN; DIEA), piridina, hidróxido potásico (KOH), hidróxido sódico (NaOH) y metóxido de sodio (NaOMe; NaOCH₃).

En algunas realizaciones, dos apariciones independientes de R°, como se representa en la estructura a continuación, se toman conjuntamente con el (los) átomo(s) a los que están unidos para formar un anillo de cicloalquilo, heterocíclico, arilo o heteroarilo de 3-8-miembros que tiene 0-3 heteroátomos independientemente

seleccionados de nitrógeno, oxígeno o azufre. Anillos a modo de ejemplo que se forman cuando dos apariciones independientes de R° se toman conjuntamente con el (los) átomo(s) a los que están unidos incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: a) dos apariciones independientes de R° que están unidas al mismo átomo y se toman conjuntamente con ese átomo para formar un anillo, por ejemplo, N(R°)₂, en el que ambas apariciones de R° se toman conjuntamente con el átomo de nitrógeno para formar un grupo piperidin-1-ilo, piperazin-1-ilo o morfolin-4-ilo; y b) dos apariciones independientes de R° que están unidas a diferentes átomos y se toman conjuntamente con ambos de aquellos átomos para formar un anillo, por ejemplo, cuando un grupo fenilo está sustituido con dos apariciones de OR°



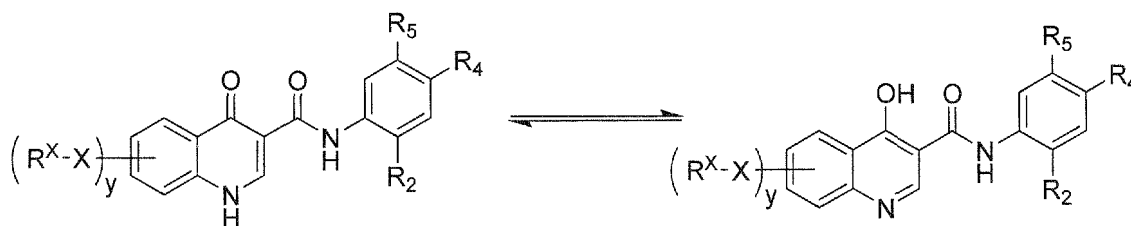
estas dos apariciones de R° se toman conjuntamente con los átomos de oxígeno a los que están unidos para formar un anillo que contiene oxígeno de 6 miembros condensado:



Se apreciará que puede formarse una variedad de otros anillos cuando dos apariciones independientes de R° se toman conjuntamente con el (los) átomo(s) a los que cada variable está unida y que los ejemplos detallados anteriormente no pretenden ser limitantes.

Sustituyentes de anillo sobre, por ejemplo, sistemas de anillos de mono y poliario, alifáticos, heteroalifáticos pueden unirse sobre cualquier posición de anillo para la que es químicamente factible unir un sustituyente.

A menos que se establezca de otro modo, las estructuras representadas en el presente documento también pretenden incluir 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, (Z) y (E) isómeros de doble enlace y (Z) y (E) isómeros conformacionales. Por tanto, isómeros estereoquímicos individuales, además de mezclas enantioméricas, diaestereoméricas y geométricas (o conformacionales) del presente compuesto, 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. Es decir, cuando R^x-X- en un compuesto de fórmula 1 es hidrógeno, dicho compuesto de fórmula 1 puede existir como un tautómero:



Tautómero de la Fórmula 1

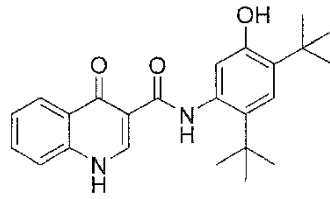
Adicionalmente, a menos que se establezca de otro modo, las estructuras representadas en el presente documento también pretenden incluir compuestos que se diferencian solo en la presencia de uno o más átomos isotópicamente enriquecidos. Por ejemplo, los compuestos que tienen las presentes estructuras, excepto por la sustitución de hidrógeno por deuterio o tritio, o la sustitución de un carbono por un ¹³C o ¹⁴C, están dentro del alcance de la presente invención. Tales compuestos son útiles, por ejemplo, como herramientas analíticas, sondas en ensayos biológicos o como agentes terapéuticos.

II. PROCESOS DE LA INVENCION

En general, la invención proporciona productos intermedios que pueden usarse para producir moduladores de CFTR y para procesos para hacer dichos productos intermedios.

En la presente se describe un proceso para la preparación de un compuesto que tiene la estructura

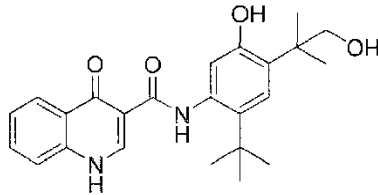
5



10

En la presente se describe un proceso para la preparación de un compuesto que tiene la estructura

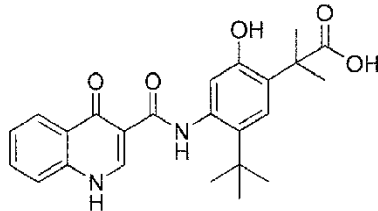
15



20

En la presente se describe un proceso para la preparación de un compuesto que tiene la estructura

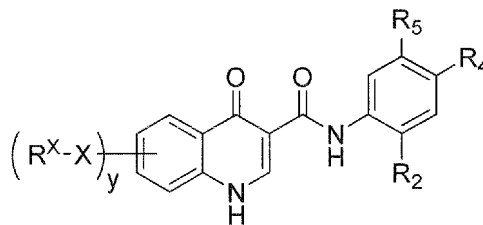
25



30

En la presente se describe un proceso para la preparación de un compuesto de fórmula 1,

35



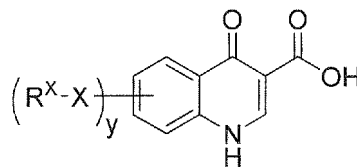
40

Formula 1

45

que comprende acoplar un ácido carboxílico de fórmula 2

50



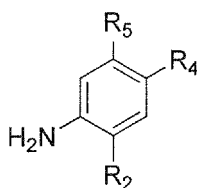
55

Formula 2

60

con una anilina de fórmula 3

65



Formula 3

en presencia de un agente de acoplamiento seleccionado del grupo que consiste en tetrafluorborato de 2-cloro-1,3-dimetil-2-imidazolio, HBTU, HCTU, 2-cloro-4,6-dimetoxi-1,3,5-triazina, HATU, HOBT/EDC y T3P®.

Cada R_2 y R_4 está seleccionado independientemente de hidrógeno, CN, CF_3 , halógeno, alquilo C_{1-6} lineal o ramificado, cicloalifático de 3-12 miembros, fenilo, heteroarilo C_{5-10} o heterocíclico C_{3-7} , en el que dicho heteroarilo o heterocíclico tiene hasta 3 heteroátomos seleccionados de O, S o N, y cada alquilo C_{1-6} lineal o ramificado, cicloalifático de 3-12 miembros, fenilo, heteroarilo C_{5-10} o heterocíclico C_{3-7} está independientemente y opcionalmente sustituido con hasta tres sustituyentes seleccionados de $-OR'$, $-CF_3$, $-OCF_3$, SR' , $S(O)R'$, SO_2R' , $-SCF_3$, halógeno, CN, $-COOR'$, $-COR'$, $-O(CH_2)_2N(R')(R')$, $-O(CH_2)N(R')(R')$, $-CON(R')(R')$, $-(CH_2)_2OR'$, $-(CH_2)OR'$, CH_2CN , fenilo o fenoxi opcionalmente sustituido, $-N(R')(R')$, $-NR'(O)R'$, $-NR'(O)R'$, $-(CH_2)_2N(R')(R')$ o $-(CH_2)N(R')(R')$.

Cada R_5 está seleccionado independientemente de hidrógeno, $-OH$, NH_2 , CN, CHF_2 , NHR' , $N(R')_2$, $-NHC(O)R'$, $NHC(O)OR'$, $NHSO_2R'$, $-OR'$, $OC(O)OR'$, $OC(O)NHR'$, $OC(O)NR'_2$, CH_2OH , $CH_2N(R')_2$, $C(O)OR'$, SO_2NHR' , $SO_2N(R')_2$ o $CH_2NHC(O)OR'$.

O, R_4 y R_5 tomados conjuntamente forman un anillo de 5-7 miembros que contiene 0-3 tres heteroátomos seleccionados de N, O o S, en el que dicho anillo está opcionalmente sustituido con hasta tres sustituyentes R_3 .

Cada X es independientemente un enlace o es una cadena de alquilideno C_{1-6} opcionalmente sustituida en la que hasta dos unidades de metileno de X están opcionalmente e independientemente sustituidas con $-CO-$, $-CS-$, $-COCO-$, $-CONR'-$, $-CONR'NR'-$, $-CO_2-$, $-OCO-$, $-NR'CO_2-$, $-O-$, $-NR'CONR'-$, $-OCONR'-$, $-NR'NR'$, $NR'NR'CO-$, $-NR'CO-$, $-S-$, $-SO-$, $-SO_2-$, $-NR'^-$, $-SO_2NR'^-$, $NR'SO_2-$ o $-NR'SO_2NR'^-$.

Cada R^X es independientemente R' , halógeno, NO_2 , CN, CF_3 o OCF_3 , y es un número entero de 0-4. Cada R' está seleccionado independientemente de hidrógeno o un grupo opcionalmente sustituido seleccionado de un grupo alifático C_{1-8} , un anillo monocíclico de 3-8 miembros saturado, parcialmente insaturado o completamente insaturado que tiene 0-3 heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno o azufre, o sistema de anillos bicíclico de 8-12 miembros saturado, parcialmente insaturado o completamente insaturado que tiene 0-5 heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno o azufre; o dos apariciones de R' se toman conjuntamente con el (los) átomo(s) a los que están unidos para formar un anillo monocíclico o bicíclico de 3-12 miembros saturado, parcialmente insaturado o completamente insaturado opcionalmente sustituido que tiene 0-4 heteroátomos independientemente seleccionados de N, O o S.

Cada R_3 es independientemente $-alquilo C_{1-3}$, perhaloalquilo C_{1-3} , $-O(alquilo C_{1-3})$, $-CF_3$, $-OF_3$, $-SCF_3$, $-F$, $-Cl$, $-Br$ o $-COOR'$, $-COR'$, $-O(CH_2)_2N(R')(R')$, $-O(CH_2)N(R')(R')$, $-CON(R')(R')$, $-(CH_2)_2OR'$, $-(CH_2)OR'$, anillo aromático monocíclico o bicíclico opcionalmente sustituido, arilsulfona opcionalmente sustituida, anillo de heteroarilo de 5 miembros opcionalmente sustituido, $-N(R')(R')$, $-(CH_2)_2N(R')(R')$ o $-(CH_2)N(R')(R')$.

En una realización, R_5 es independientemente $-OC(O)OR'$, $-OC(O)NHR'$ o $-OC(O)N(R')_2$, y R' no es hidrógeno. En ciertos casos, R_5 es $-OC(O)OR'$ y R' no es hidrógeno. En otros casos, R_5 es $-OC(O)NHR'$ y R' no es hidrógeno. En todavía más casos, R_5 es $-OC(O)N(R')_2$ y R' no es hidrógeno.

En una realización, el proceso comprende además escindir el grupo R_5 $-OC(O)OR'$, $-OC(O)NHR'$ o $-OC(O)N(R')_2$ para formar $-OH$. La escisión se realiza tratando un compuesto de fórmula 1 que contiene el grupo R_5 $-OC(O)OR'$, $-OC(O)NHR'$ o $-OC(O)N(R')_2$ con un disolvente alcohólico en presencia de base tal como NaOH, KOH o metóxido de sodio. El disolvente alcohólico usado en la reacción de escisión es metanol, etanol, alcohol isopropílico o *t*-butanol.

En otra realización, al menos uno de R_4 o R_2 es independientemente un alquilo C_{1-6} o alquilo ramificado que está sustituido con $-COOR'$ o $-CON(R')_2$, y R' no es hidrógeno. En ciertos casos, uno de R_4 o R_2 es $-COOR'$ y R' no es hidrógeno. En otros casos, uno de R_4 o R_2 es $-CON(R')_2$ y R' no es hidrógeno.

En una realización, el proceso comprende además hidrolizar $-COOR'$ o $-CON(R')_2$ sobre al menos uno de R_4 y R_2 . La hidrólisis se realiza tratando un compuesto de fórmula 1 que contiene el grupo $-COOR'$ o $-CON(R')_2$ sobre

al menos uno de R_4 y R_2 con un disolvente alcohólico en presencia de base tal como NaOH, KOH o metóxido de sodio. El disolvente alcohólico usado en la hidrólisis es metanol, etanol, alcohol isopropílico o *t*-butanol.

5 En otra realización, al menos uno de R_4 o R_2 es independientemente un alquilo C_{1-6} lineal o ramificado que está sustituido con $-COOR'$ o $-CON(R')_2$ y R_5 es independientemente $-OC(O)OR'$, $-OC(O)NHR'$ o $-OC(O)N(R')_2$, y cada R' no es hidrógeno.

10 En una realización, el proceso comprende además hidrolizar $-COOR'$ o $-CON(R')_2$ sobre al menos uno de R_4 y R_2 y escindir el grupo $R_5 -OC(O)OR'$, $-OC(O)NHR'$ o $-OC(O)N(R')_2$. La reacción de hidrólisis/escisión se realiza tratando un compuesto de fórmula 1 que contiene el grupo $-COOR'$ o $-CON(R')_2$ sobre al menos uno de R_4 y R_2 y el grupo $R_5 -OC(O)OR'$, $-OC(O)NHR'$ o $-OC(O)N(R')_2$ con un disolvente alcohólico en presencia de base tal como NaOH, KOH o metóxido de sodio. El disolvente alcohólico usado en la reacción de hidrólisis/escisión es metanol, etanol, alcohol isopropílico o *t*-butanol.

15 En otra realización, el acoplamiento del ácido carboxílico de fórmula 2 y la anilina de fórmula 3 se realiza en presencia de una base tal como K_2CO_3 , Et_3N , N-metilmorfolina (NMM), piridina o DIEA.

20 En otra realización, el acoplamiento del ácido carboxílico de fórmula 2 y la anilina de fórmula 3 se realiza en presencia de piridina o DIEA.

En otra realización, el acoplamiento del ácido carboxílico de fórmula 2 y la anilina de fórmula 3 se realiza en presencia de un disolvente tal como EtOAc, IPAc, THF, MEK, NMP, acetonitrilo, DMF o 2-metiltetrahidrofurano.

25 En otra realización, el acoplamiento del ácido carboxílico de fórmula 2 y la anilina de fórmula 3 se realiza a una temperatura de reacción que se mantiene entre 10 °C y 78 °C, tal como entre aproximadamente 20 °C y 30 °C, entre aproximadamente 40 °C y 50 °C, y entre aproximadamente 42 °C y 53 °C.

30 En otras realizaciones, la reacción de acoplamiento se agita durante al menos 2 horas, tal como durante al menos 8 horas, durante al menos 70 horas o durante al menos 3 días.

En otra realización, y es 0.

En otras realizaciones, R_2 es *tert*-butilo.

35 En algunas realizaciones, R_5 es independientemente $-OC(O)OR'$, $-OC(O)NHR'$ o $-OC(O)N(R')_2$, y R' no es hidrógeno; y cada uno de R_2 y R_4 está seleccionado independientemente de hidrógeno, CF_3 , alquilo C_1-C_6 lineal o ramificada, cicloalifático de 3-12 miembros o fenilo.

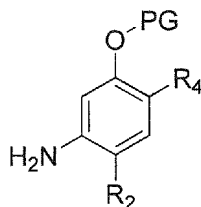
40 En algunas realizaciones, R_5 es independientemente $-OC(O)OR'$, $-OC(O)NHR'$ o $-OC(O)N(R')_2$, y R' no es hidrógeno; y cada uno de R_2 y R_4 está seleccionado independientemente de alquilo C_1-C_6 lineal o ramificado.

45 En algunas realizaciones, R_5 es independientemente $-OC(O)OR'$, $-OC(O)NHR'$ o $-OC(O)N(R')_2$, y R' no es hidrógeno; y cada uno de R_2 y R_4 está seleccionado independientemente de metilo, etilo, *n*-propilo, isopropilo, *n*-butilo, isobutilo, *t*-butilo, *n*-pentilo o *n*-hexilo.

En algunas realizaciones, R_2 y R_4 son *t*-butilo.

En una realización, la invención proporciona un proceso para la preparación de un compuesto de fórmula 5

50



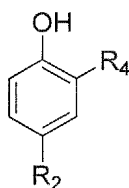
55

Formula 5

60 haciendo reaccionar un compuesto de fórmula 6

65

5

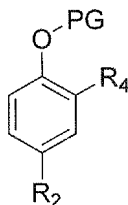


Formula 6

10

con un reactivo capaz de causar que un grupo protector se una al oxígeno fenólico de un compuesto de fórmula **6** en presencia de un disolvente, produciendo así un compuesto de fórmula **7**

15



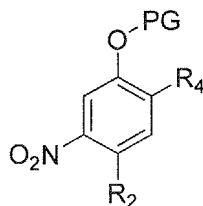
20

Formula 7,

25

que se nitra para formar un compuesto de fórmula **8**

30



35

Formula 8

que entonces se reduce dando un compuesto de fórmula **5**, en el que PG es un grupo protector y R₄ y R₅ se definen como antes.

40

En una realización, el disolvente usado en la conversión del compuesto de fórmula **6** en un compuesto de fórmula **7** es éter dietílico, o cloruro de metileno.

En otra realización, el disolvente usado en la reacción de protección es cloruro de metileno.

45

PG es propoxiformilo, metanosulfonilo, 4-nitro-benzoilo, etoxiformilo, butoxiformilo, *t*-butoxiformilo, *i*-propoxiformilo o metoxiformilo.

En otra realización, PG es metoxiformilo.

50

Un compuesto de fórmula **7** se nitra usando una mezcla de ácido sulfúrico, ácido nítrico y cloruro de metileno.

En una realización, el compuesto de nitro de fórmula **8** se purifica por cristalización.

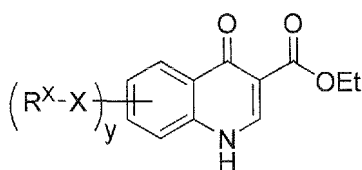
55

En una realización adicional, el compuesto de nitro de fórmula **8** se purifica por cristalización usando hexano.

4

En otra realización, el proceso comprende además la etapa de poner en contacto un compuesto de fórmula

60

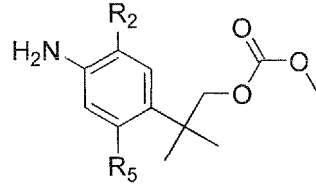


65

Formula 4

con un ácido acuoso para producir un compuesto de fórmula 2.

5 En una realización, el compuesto de fórmula 3 es un compuesto de fórmula 40



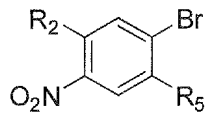
10

15

Formula 40

41 En otra realización, el proceso comprende además la etapa de poner en contacto un compuesto de fórmula

20

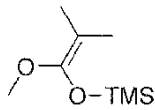


25

Formula 41

con metiltrimetilsilildimetilcetenaoacetal (MTDA)

30

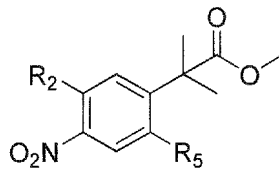


35

MTDA

para producir un compuesto de fórmula 42

40



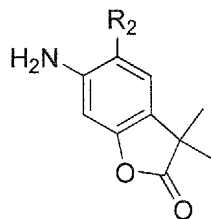
45

Formula 42

50 En una realización adicional, el proceso comprende la etapa de reducir un compuesto de fórmula 42 para producir un compuesto de fórmula 40.

En una realización, el compuesto de fórmula 3 es un compuesto de fórmula 43

55



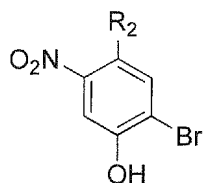
60

Formula 43

65 En una realización adicional, el proceso comprende la etapa de poner en contacto un compuesto de fórmula

44

5

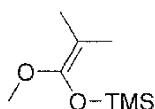


10

Formula 44

con metiltrimetilsilildimetilcetenoacetal (MTDA)

15

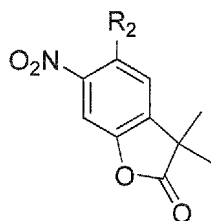


20

MTDA

para producir un compuesto de fórmula 45

25



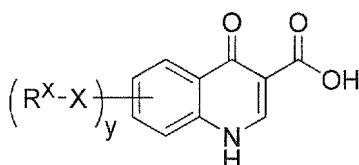
30

Formula 45

35 En una realización adicional, el proceso comprende la etapa de reducir un compuesto de fórmula 45 para producir un compuesto de fórmula 43.

En la presente se describe un proceso para la preparación de un compuesto de fórmula 2

40

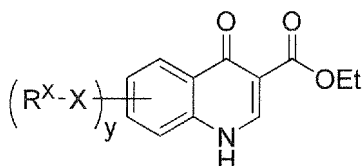


45

Formula 2

que comprende poner en contacto un compuesto de fórmula 4

50



55

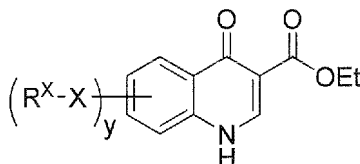
Formula 4

60 con un ácido acuoso, en la que cada X es independientemente un enlace o es una cadena de alquilideno C₁₋₆ opcionalmente sustituida en la que hasta dos unidades de metileno de X están opcionalmente e independientemente sustituidas con -CO-, -CS-, -COCO-, -CONR', -CONR'NR', -CO₂-, -OCO-, -NR'CO₂-, -O-, -NR'CONR', -OCONR', -NR'NR', -NR'NR'CO-, -NR'CO-, -S-, -SO-, -SO₂-, -NR', -SO₂NR', NR'SO₂- o -NR'SO₂NR';
 65 cada R^X es independientemente R', halógeno, NO₂, CN, CF₃ o OCF₃;

y es un número entero de 0-4; y

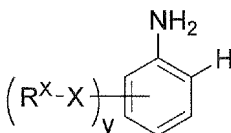
cada R' está seleccionado independientemente de hidrógeno o un grupo opcionalmente sustituido seleccionado de un grupo alifático C₁₋₈, un anillo monocíclico de 3-8 miembros saturado, parcialmente insaturado o completamente insaturado que tiene 0-3 heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno o azufre, o sistema de anillos bicíclico de 8-12 miembros saturado, parcialmente insaturado o completamente insaturado que tiene 0-5 heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno o azufre; o dos apariciones de R' se toman conjuntamente con el (los) átomo(s) a los que están unidos para formar un anillo monocíclico o bicíclico de 3-12 miembros saturado, parcialmente insaturado o completamente insaturado opcionalmente sustituido que tiene 0-4 heteroátomos independientemente seleccionados de N, O o S.

En una realización de este aspecto, el compuesto de fórmula 4



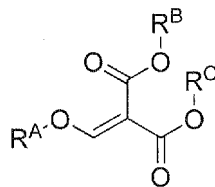
Formula 4

se preparó poniendo en contacto un compuesto de fórmula 50



Formula 50

con un compuesto de fórmula 51



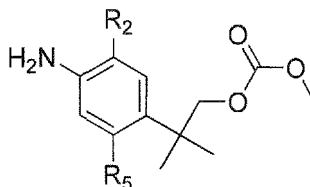
Formula 51

en la que R^A, R^B y R^C pueden ser alquilo C₁₋₆.

En una realización de este aspecto, el compuesto de fórmula 50 y el compuesto de fórmula 50 se hacen reaccionar a una temperatura de aproximadamente 100 °C a aproximadamente 300 °C. En otra realización, el compuesto de fórmula 50 y el compuesto de fórmula 50 se hacen reaccionar a una temperatura de aproximadamente 100 °C. En otra realización, el compuesto de fórmula 50 y el compuesto de fórmula 50 se hacen reaccionar a una temperatura de aproximadamente 250 °C. En una realización adicional, el compuesto de fórmula 50 y el compuesto de fórmula 50 se hacen reaccionar a una temperatura de aproximadamente 100 °C, y entonces a una temperatura de aproximadamente 250 °C.

En una realización adicional de este aspecto, y es 0.

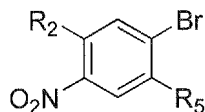
En la presente se describe un proceso para la preparación de un compuesto de fórmula 40



Formula 40

que comprende la etapa de poner en contacto un compuesto de fórmula 41

5

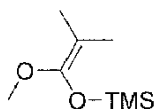


Formula 41

10

con metiltrimetilsilildimetilcetenoacetal (MTDA)

15

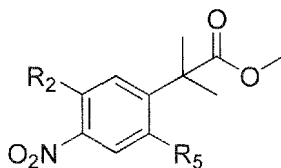


MTDA

20

para producir un compuesto de fórmula 42

30



Formula 42

35

en la que

cada R₂ está seleccionado independientemente de hidrógeno, CN, CF₃, halógeno, alquilo C₁₋₆ lineal o ramificado, cicloalifático de 3-12 miembros, fenilo, heteroarilo C₅₋₁₀ o heterocíclico C₃₋₇, en el que dicho heteroarilo o heterocíclico tiene hasta 3 heteroátomos seleccionados de O, S o N, y cada alquilo C₁₋₆ lineal o ramificado, cicloalifático de 3-12 miembros, fenilo, heteroarilo C₅₋₁₀ o heterocíclico C₃₋₇ está independientemente y opcionalmente sustituido con hasta tres sustituyentes seleccionados de -OR', -CF₃, -OCF₃, SR', S(O)R', SO₂R', -SCF₃, halógeno, CN, -COOR', -COR-, -O(CH₂)₂N(R')(R'), -O(CH₂)N(R')(R'), -CON(R')(R'), -(CH₂)₂OR', -(CH₂)OR', CH₂CN, fenilo o fenoxi opcionalmente sustituido, -N(R')(R'), -NR'C(O)OR', -NR'C(O)R', -(CH₂)₂N(R')(R') o -(CH₂)N(R')(R');

40

cada R₅ está seleccionado independientemente de hidrógeno, -OH, NH₂, CN, CHF₂, NHR', N(R')₂, -NHC(O)R', NHC(O)OR', NHSO₂R', -OR', OC(O)OR', OC(O)NHR', OC(O)NR'₂, CH₂OH, CH₂N(R')₂, C(O)OR', SO₂NHR', SO₂N(R')₂ o CH₂NHC(O)OR'; y

45

cada R' está seleccionado independientemente de hidrógeno o un grupo opcionalmente sustituido seleccionado de un grupo alifático C₁₋₈, un anillo monocíclico de 3-8 miembros saturado, parcialmente insaturado o completamente insaturado que tiene 0-3 heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno o azufre, o sistema de anillos bicíclico de 8-12 miembros saturado, parcialmente insaturado o completamente insaturado que tiene 0-5 heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno o azufre; o dos apariciones de R' se toman conjuntamente con el (los) átomo(s) a los que están unidos para formar un anillo monocíclico o bicíclico de 3-12 miembros saturado, parcialmente insaturado o completamente insaturado opcionalmente sustituido que tiene 0-4 heteroátomos independientemente seleccionados de N, O o S.

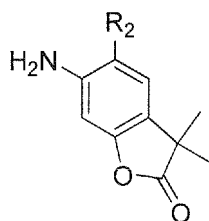
55

En una realización de este aspecto, el proceso comprende la etapa de reducir un compuesto de fórmula 42 para producir un compuesto de fórmula 40.

60

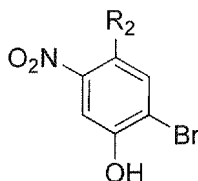
En la presente se describe un proceso para la preparación de un compuesto de fórmula 43

65



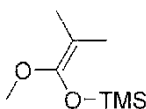
Formula 43

que comprende la etapa de poner en contacto un compuesto que tiene la fórmula 44



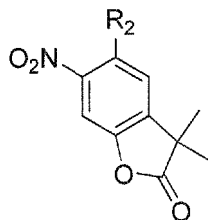
Formula 44

con metiltrimetilsilildimetilcetenoacetal (MTDA)



MTDA

para producir un compuesto de fórmula 45



Formula 45

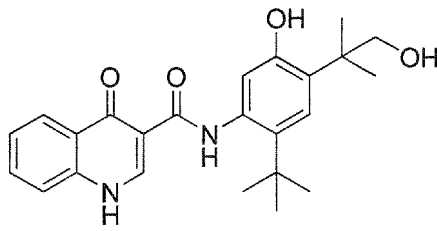
en la que cada R_2 está seleccionado independientemente de hidrógeno, CN, CF_3 , halógeno, alquilo C_{1-6} lineal o ramificado, cicloalifático de 3-12 miembros, fenilo, heteroarilo C_{5-10} o heterocíclico C_{3-7} , en el que dicho heteroarilo o heterocíclico tiene hasta 3 heteroátomos seleccionados de O, S o N, y cada alquilo C_{1-6} lineal o ramificado, cicloalifático de 3-12 miembros, fenilo, heteroarilo C_{5-10} o heterocíclico C_{3-7} está independientemente y opcionalmente sustituido con hasta tres sustituyentes seleccionados de $-OR'$, $-CF_3$, $-OCF_3$, SR' , $S(O)R'$, SO_2R' , $-SCF_3$, halógeno, CN, $-COOR'$, $-COR-$, $-O(CH_2)_2N(R')(R')$, $-O(CH_2)N(R')(R')$, $-CON(R')(R')$, $-(CH_2)_2OR'$, $-(CH_2)OR'$, CH_2CN , fenilo o fenoxi opcionalmente sustituido, $-N(R')(R')$, $-NR'C(O)OR'$, $-NR'C(O)R'$, $-(CH_2)_2N(R')(R')$ o $-(CH_2)N(R')(R')$; y

cada R' está seleccionado independientemente de hidrógeno o un grupo opcionalmente sustituido seleccionado de un grupo alifático C_{1-8} , un anillo monocíclico de 3-8 miembros saturado, parcialmente insaturado o completamente insaturado que tiene 0-3 heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno o azufre, o sistema de anillos bicíclico de 8-12 miembros saturado, parcialmente insaturado o completamente insaturado que tiene 0-5 heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno o azufre; o dos apariciones de R' se toman conjuntamente con el (los) átomo(s) a los que están unidos para formar un anillo monocíclico o bicíclico de 3-12 miembros saturado, parcialmente insaturado o completamente insaturado opcionalmente sustituido que tiene 0-4 heteroátomos independientemente seleccionados de N, O o S.

En una realización de este aspecto, el proceso comprende la etapa de reducir un compuesto de fórmula 45 para producir un compuesto de fórmula 43.

En algunas realizaciones específicas un proceso para la preparación de compuesto 27

5



10

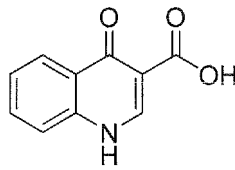
Compuesto 27

comprende:

15

(a) hacer reaccionar el compuesto **26**

20



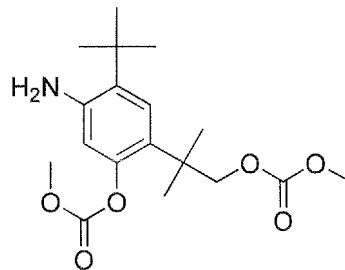
25

Compuesto 26

30

con el compuesto **13**

35



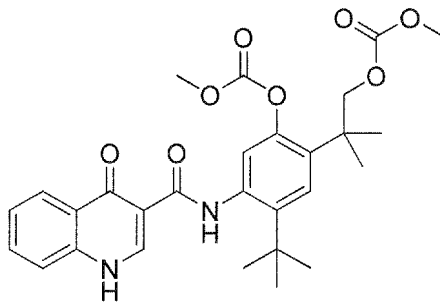
40

Compuesto 13

45

en presencia de EDCI, HOBT y DIEA usando DMF como disolvente, en el que la temperatura de reacción se mantiene entre aproximadamente 20 °C y 30 °C, y la reacción se deja avanzar durante al menos 70 horas, para producir el compuesto **14**

50



55

60

Compuesto 14

;

65

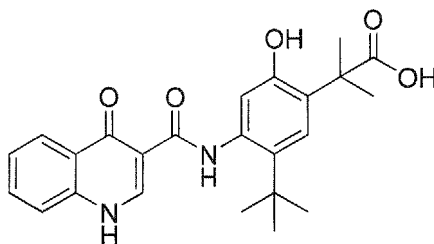
y

(b) tratar el compuesto **14** con KOH en metanol.

En otra realización específica, un proceso para la preparación de compuesto **28**

5

10



15

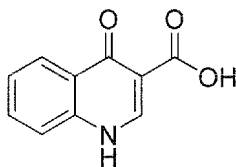
Compuesto 28

comprende:

(a) hacer reaccionar el compuesto **26**

20

25



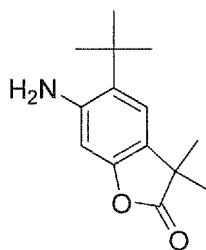
Compuesto 26

30

con el compuesto **20**

35

40



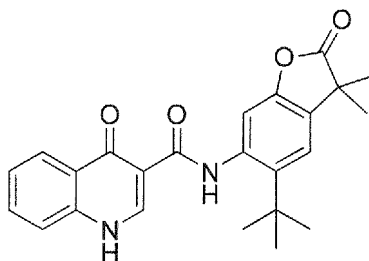
Compuesto 20

45

en presencia de HATU y DIEA usando acetonitrilo como disolvente, en el que la temperatura de reacción se mantiene entre aproximadamente 40 °C y 50 °C, y en el que la reacción se deja avanzar durante al menos 3 días, para producir el compuesto **21**

50

55



Compuesto 21 ;

60

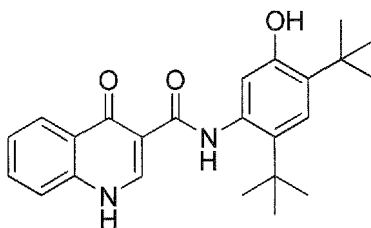
y

(b) tratar el compuesto **21** con NaOH en metanol.

65

En otra realización específica más, un proceso para la preparación de compuesto **34**

5



10

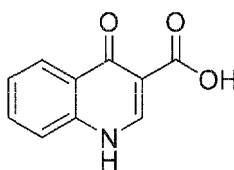
Compuesto 34

comprende:

15

(a) hacer reaccionar el compuesto **26**

20



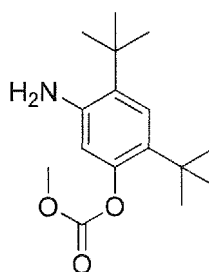
25

Compuesto 26

30

con el compuesto **32**

35



40

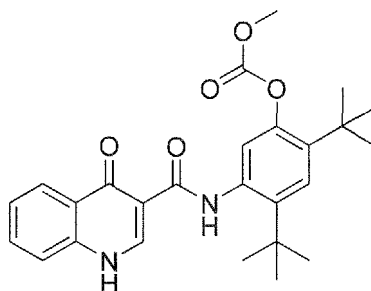
45

Compuesto 32

50

en presencia de T3P® y piridina usando 2-metiltetrahydrofurano como disolvente, en el que la temperatura de reacción se mantiene entre aproximadamente 42 °C y aproximadamente 53 °C, y en el que la reacción se deja avanzar durante al menos 2 horas, para producir el compuesto **33**

55



60

Compuesto 33 ;

65

y

(b) tratar el compuesto **33** con NaOMe/MeOH en 2-metiltetrahidrofurano.

5 En otra realización, el método también incluye la etapa de formar una suspensión del compuesto **34** en una mezcla de acetonitrilo y agua, en el que la forma sólida del compuesto **34** se convierte en el compuesto **34**.

En una realización, la relación de acetonitrilo con respecto a agua es aproximadamente 9:1 en la suspensión.

10

En otra realización, la suspensión se calienta a una temperatura entre aproximadamente 73 °C y 83 °C.

En otra realización, el compuesto **34** está en la suspensión durante al menos aproximadamente 3 horas.

15

En otra realización, el proceso incluye extinguir la mezcla de reacción con HCl 1 N; añadir HCl 0,1 N a la mezcla, creando así una mezcla bifásica; agitar la mezcla bifásica; separar la fase orgánica de dicha mezcla bifásica; filtrar y eliminar materia sólida de dicha fase orgánica; reducir el volumen de la fase orgánica aproximadamente el 50 % usando destilación; realizar tres veces las etapas de: añadir acetonitrilo a la fase orgánica hasta que el volumen de dicha fase orgánica aumente el 100 % y reducir el volumen de la fase orgánica aproximadamente el 50 %; aumentar el volumen de la fase orgánica aproximadamente el 100 % añadiendo acetonitrilo y entonces añadir agua, para formar una suspensión en la que la relación de disolvente final es 9:1 de acetonitrilo/agua; calentar dicha suspensión a una temperatura entre aproximadamente 73 °C y 83 °C; agitar dicha suspensión durante al menos 5 horas; y enfriar dicha suspensión a una temperatura entre aproximadamente -5 °C y 5 °C.

20

25

En una realización alternativa, el proceso incluye extinguir la mezcla de reacción con HCl 1,2 N; creando así una mezcla bifásica; agitar dicha mezcla bifásica; separar la fase orgánica de dicha mezcla bifásica; añadir HCl 0,1 N a la fase orgánica creando así una mezcla bifásica; agitar dicha mezcla bifásica; separar la fase orgánica; filtrar y eliminar materia sólida de dicha fase orgánica; reducir el volumen de la fase orgánica aproximadamente el 50 % usando destilación; realizar tres veces las etapas de: añadir acetonitrilo a la fase orgánica hasta que el volumen de dicha fase orgánica aumente el 100 % y reducir el volumen de la fase orgánica aproximadamente el 50 %; aumentar el volumen de la fase orgánica aproximadamente el 100 % añadiendo acetonitrilo y entonces añadir agua, para formar una suspensión en la que la relación de disolvente final es 9:1 de acetonitrilo/agua; calentar dicha suspensión a una temperatura entre aproximadamente 73 °C y 83 °C; agitar dicha suspensión durante al menos 5 horas; y enfriar dicha suspensión a una temperatura entre aproximadamente 20 °C y 25 °C; filtrar y eliminar materia sólida de dicha suspensión; lavar la materia sólida con acetonitrilo que tiene una temperatura de entre aproximadamente 20 °C y 25 °C cuatro veces; y secar el material sólido a vacío a una temperatura de 45 °C a aproximadamente 55 °C.

30

35

En una realización, el volumen de HCl 1 N usado para extinguir la reacción es igual al 25 % del volumen total de la mezcla de reacción original; el volumen de HCl 0,1 N añadido a la mezcla de reacción es igual al 25 % del volumen total de la mezcla de reacción original; y las etapas de destilación se realizan a presión reducida en las que la temperatura fuera del recipiente de reacción es inferior a aproximadamente 45 °C y la temperatura de la mezcla de reacción es superior a aproximadamente 0 °C.

40

En otra realización, el proceso incluye formar una suspensión del compuesto **34** en acetato de isopropilo.

45

En una realización, la suspensión se calienta a temperatura de reflujo.

En otra realización, el compuesto **34** está en la suspensión durante al menos aproximadamente 3 horas.

50

En ciertas realizaciones, el proceso para la preparación del compuesto **34** comprende además disolver el compuesto **34** en 2-metiltetrahidrofurano; añadir HCl 0,1 N a la disolución, para crear una disolución bifásica, que se agita. En otra realización, el proceso comprende además separar la fase orgánica de la disolución bifásica. En otra realización, el proceso comprende además filtrar y eliminar materia sólida de la fase orgánica. En otra realización, el proceso comprende además reducir el volumen de la fase orgánica a aproximadamente el 50 % usando destilación.

55

En otra realización, el proceso comprende además realizar tres veces el procedimiento de: añadir MeOAc, EtOAc, IPAc, *t*-BuOAc, tetrahidrofurano (THF), Et₂O o metil-*t*-butil éter (MTBE) a la fase orgánica hasta que el volumen de la fase orgánica aumente el 100 % y reducir el volumen de la fase orgánica el 50 % usando destilación. En otra realización, el proceso comprende además añadir MeOAc, EtOAc, IPAc, *t*-BuOAc, tetrahidrofurano (THF), Et₂O o metil-*t*-butil éter (MTBE) a la fase orgánica hasta que el volumen de la fase orgánica aumente el 100 %. En otra realización, el proceso comprende además calentar la fase orgánica a temperatura de reflujo, y mantener dicha temperatura de reflujo durante un tiempo de al menos aproximadamente 5 horas. En otra realización, el proceso comprende además enfriar la fase orgánica a una temperatura entre aproximadamente -5 °C y aproximadamente 5 °C durante un periodo de tiempo de 4,5 horas a 5,5 horas.

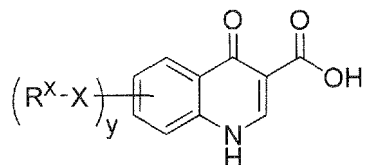
60

65

En otra realización, el proceso para la preparación del compuesto **34** comprende además cristalizar el

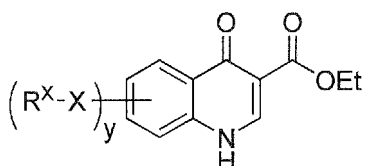
compuesto **34**, que comprende sembrar una mezcla de reacción saturada que comprende el compuesto **34** en disolución con al menos un cristal del compuesto **34** sustancialmente puro.

En la presente se describe un proceso para la preparación de un compuesto de fórmula **2**



Formula 2

que comprende hidrolizar un compuesto de fórmula **4**



Formula 4

En una realización adicional, el compuesto de fórmula **4** se hidroliza usando un agente de hidrólisis en presencia de un disolvente.

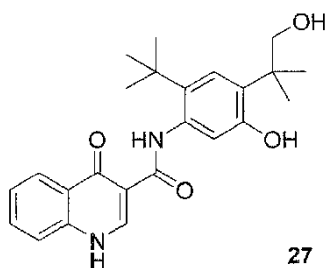
En algunas realizaciones adicionales, el agente de hidrólisis es HCl, H₂SO₄, H₃PO₄, Na₂CO₃, LiOH, KOH o NaOH.

En algunas realizaciones, el disolvente usado en la hidrólisis es H₂O, metanol, etanol, isopropanol o *t*-butanol.

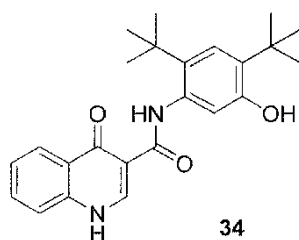
En la presente se describe un compuesto producido por cualquier proceso descrito en el presente documento.

En la presente se describe una composición farmacéutica que comprende un compuesto producido por cualquier proceso descrito en el presente documento.

En la presente se describe un proceso para la preparación del compuesto **27**



que comprende poner en contacto el compuesto **34**



con una composición biológica.

En una realización de este aspecto, la composición biológica incluye un organismo biológico seleccionado del grupo que consiste en hongos, bacterias y arqueas.

5 En una realización la composición biológica es hongos. En otra realización, el hongo es un hongo unicelular. En otra realización, el hongo es un hongo pluricelular.

10 En otra realización el hongo es un hongo pluricelular seleccionado del grupo que consiste en *Absidia*, *Aspergillus*, *Beauveria*, *Botrytis*, *Cunninghamella*, *Cyathus*, *Gliocladium*, *Mortierella*, *Mucor*, *Phanerochaete*, *Stemphylium*, *Syncephalastrum* y *Verticillium*.

15 En otra realización, el hongo es un hongo pluricelular seleccionado del grupo que consiste en *Absidia pseudocylindrospora*, *Aspergillus alliaceus*, *Aspergillus ochraceus*, *Beauveria bassiana*, *Cunninghamella blakesleeana*, *Cunninghamella echirtulala*, *Mortierella isabellina*, *Mucor plumbeus*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Syncephalastrum racemosum* y *Verticillium theobromae*.

20 En otra realización, el hongo es un hongo unicelular seleccionado del grupo que consiste en *Candida*, *Debaryomyces*, *Geotrichum*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Sporobolomyces*, *Williopsis* y *Yarrowia*.

25 En otra realización, el hongo es un hongo unicelular seleccionado del grupo que consiste en *Candida paripsilosis*, *Debaryomyces hansenii*, *Geotrichum candidum*, *Pichia methanolica*, *Pichia subpellicosa*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula mucaliginosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Sporobolomyces salmonicolor*, *Williopsis saturnis* y *Yarrowia lipolytica*.

30 En otra realización, el organismo biológico es una arquea. En otro aspecto descrito en el presente documento, la arquea es *Pyrococcus*. En todavía otro aspecto descrito en el presente documento, la arquea es *Pyrococcus furiosus*.

En otra realización, el organismo biológico es una bacteria.

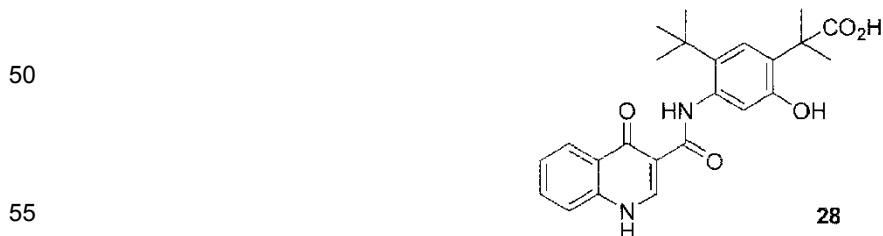
En otra realización, la bacteria está seleccionada del grupo que consiste en *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus* y *Streptomyces*.

35 En otra realización, la bacteria está seleccionada del grupo que consiste en *Lactobacillus reuteri*, *Pseudomonas methanolica*, *Rhodococcus erythropolis*, *Streptomyces griseus*, *Streptomyces griseolus*, *Streptomyces platensis* y *Streptomyces rimosus*.

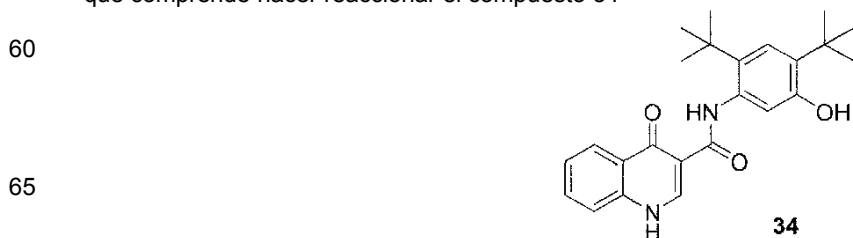
40 En todavía otra realización, la composición biológica incluye *Streptomyces rimosus*, o un fragmento de la misma.

45 En una realización de este aspecto, la composición biológica incluye un disolvente. En otra realización, el disolvente incluye agua. En todavía otra realización, el disolvente es un tampón. En todavía otra realización, el disolvente es un tampón fosfato de potasio que tiene un pH de aproximadamente 7.

En la presente se describe un proceso para la preparación del compuesto **28**



que comprende hacer reaccionar el compuesto **34**



con una composición biológica.

5 En una realización de este aspecto, la composición biológica incluye un organismo biológico seleccionado del grupo que consiste en hongos, bacterias y arqueas.

10 En una realización, la composición biológica es hongos. En otra realización, el hongo es un hongo unicelular. En otra realización, el hongo es un hongo pluricelular.

15 En otra realización, el hongo es un hongo pluricelular seleccionado del grupo que consiste en *Absidia*, *Aspergillus*, *Beauveria*, *Botrytis*, *Cunninghamella*, *Cyathus*, *Gliocladium*, *Mortierella*, *Mucor*, *Phanerochaete*, *Stemphylium*, *Syncephalastrum* y *Verticillium*.

20 En otra realización, el hongo es un hongo pluricelular seleccionado del grupo que consiste en *Absidia pseudocylindrospora*, *Aspergillus alliaceus*, *Aspergillus ochraceus*, *Beauveria bassiana*, *Cunninghamella blakesleeana*, *Cunninghamella echirtulala*, *Mortierella isabellina*, *Mucor plumbeus*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Syncephalastrum racemosum* y *Verticillium theobromae*.

25 En otra realización, el hongo es un hongo unicelular seleccionado del grupo que consiste en *Candida*, *Debaryomyces*, *Geotrichum*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Sporobolomyces*, *Williopsis* y *Yarrowia*.

30 En una realización adicional, el hongo es un hongo unicelular seleccionado del grupo que consiste en *Candida parapsilosis*, *Debaryomyces hansenii*, *Geotrichum candidum*, *Pichia methanolica*, *Pichia subpellicosa*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula mucaliginosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Sporobolomyces salmonicolor*, *Williopsis saturnis* y *Yarrowia lipolytica*.

35 En otra realización, el organismo biológico es una arquea. En otra realización, la arquea es *Pyrococcus*. En otra realización, la arquea es *Pyrococcus furiosus*.

En otra realización, el organismo biológico es una bacteria.

40 En otra realización, la bacteria está seleccionada del grupo que consiste en *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus* y *Streptomyces*.

45 En otro aspecto descrito en el presente documento, la bacteria está seleccionada del grupo que consiste en *Lactobacillus reuterii*, *Pseudomonas methanolica*, *Rhodococcus erythropolis*, *Streptomyces griseus*, *Streptomyces griseolus*, *Streptomyces platensis* y *Streptomyces rimosus*.

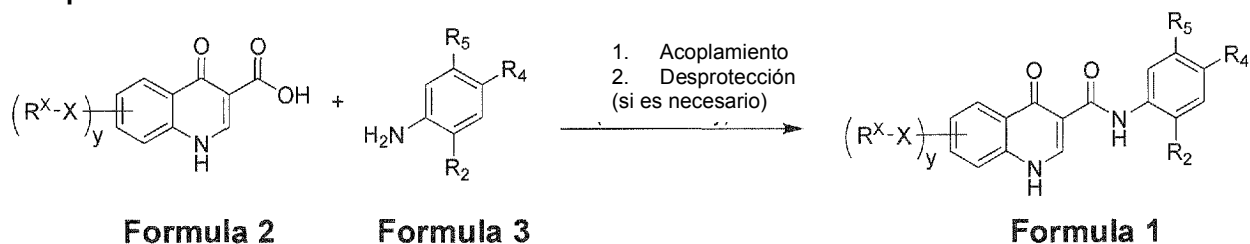
En una realización de este aspecto, la composición biológica incluye *Streptomyces rimosus*, o un fragmento de la misma.

50 En una realización de este aspecto, la composición biológica incluye un disolvente. En otra realización, el disolvente incluye agua. En todavía otra realización, el disolvente es un tampón. En todavía otra realización, el disolvente es un tampón fosfato de potasio que tiene un pH de aproximadamente 7.

III. SÍNTESIS GENERAL

55 Los compuestos de fórmula 1 pueden sintetizarse según el Esquema 1.

Esquema 1



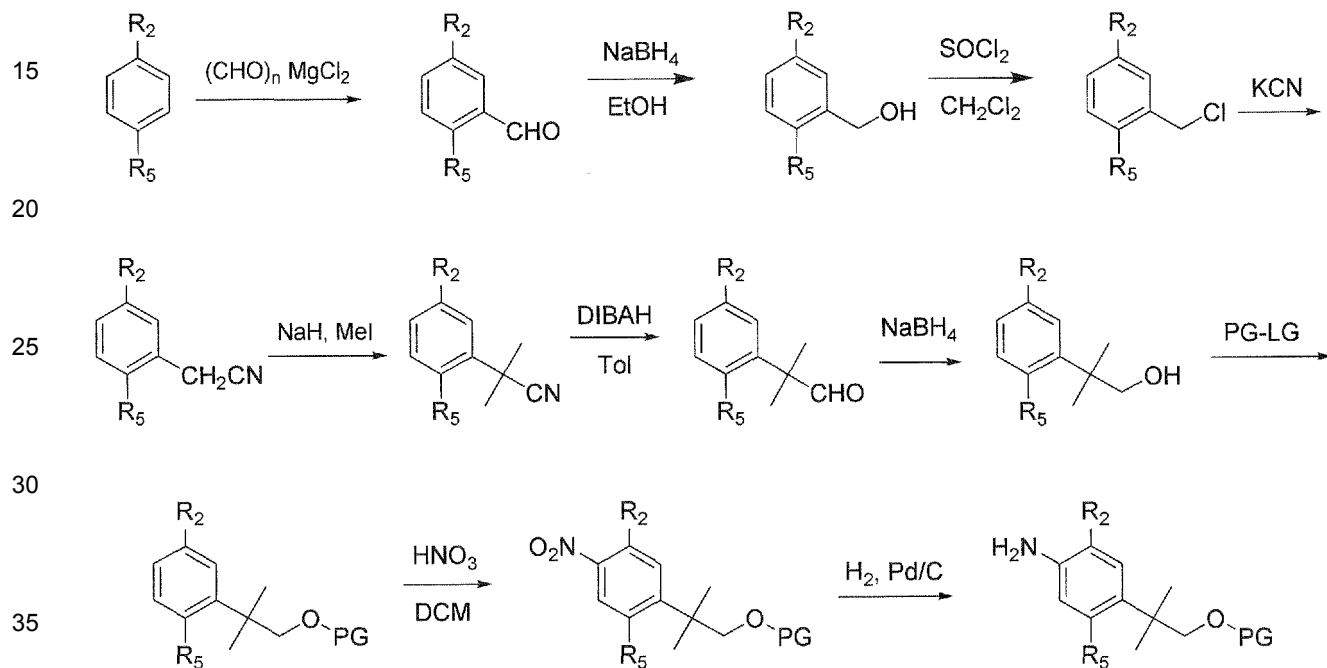
65 En el Esquema 1, las anilinas de fórmula 3, en la que R₂, R₄ y R₅ están opcionalmente e independientemente sustituidos con grupos funcionales definidos anteriormente, y en la que aquellos grupos funcionales poseen opcionalmente e independientemente grupos protectores sobre ellos, se hacen reaccionar con

productos intermedios de ácido carboxílico de fórmula 2 bajo condiciones de acoplamiento. Los derivados de fórmula 1 que poseen uno o más grupos protectores pueden entonces desprotegerse proporcionando derivados desprotegidos de fórmula 1.

5 La reacción de acoplamiento descrita en el Esquema 1 puede lograrse disolviendo los reactantes en un disolvente adecuado, tratando la disolución resultante con un reactivo de acoplamiento adecuado opcionalmente en presencia de una base adecuada.

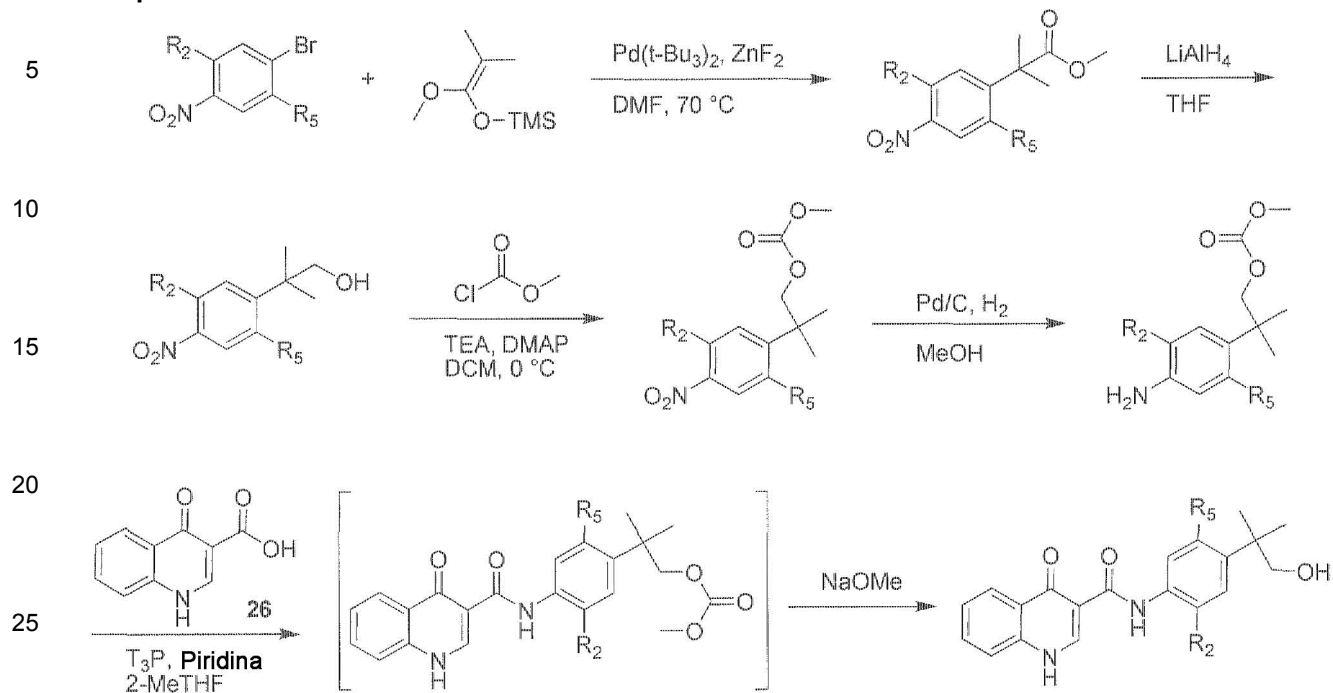
10 Las anilinas de fórmula 3, en la que R₄ es un 1-hidroxi-2-metilpropan-2-ilo protegido, pueden sintetizarse según el Esquema 2.

Esquema 2



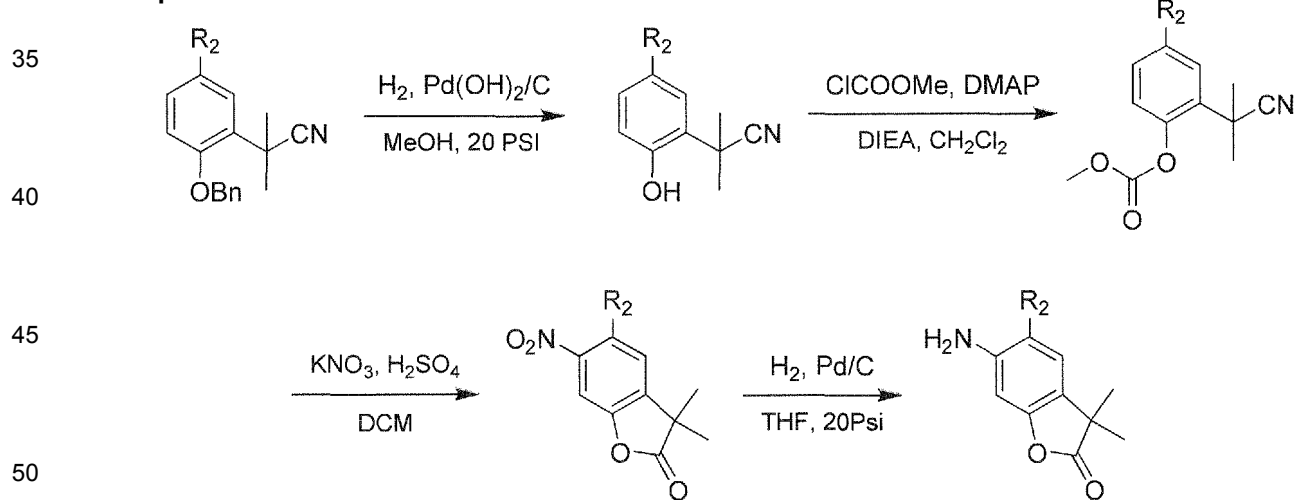
Alternativamente, las anilinas de la Fórmula 2, donde R₄ es un 1-hidroxi-2-metilpropan-2-ilo protegido puede ser sintetizado de acuerdo con el esquema 3.

Esquema 3



30 Anilinas de la Fórmula 3, donde R_4 y R_5 conjuntamente con el anillo de fenil al que están adjuntados por la fórmula 3,3-dimetilbenzofuran-2(3H)-ona, pueden ser sintetizados de acuerdo con el Esquema 4.

Esquema 4

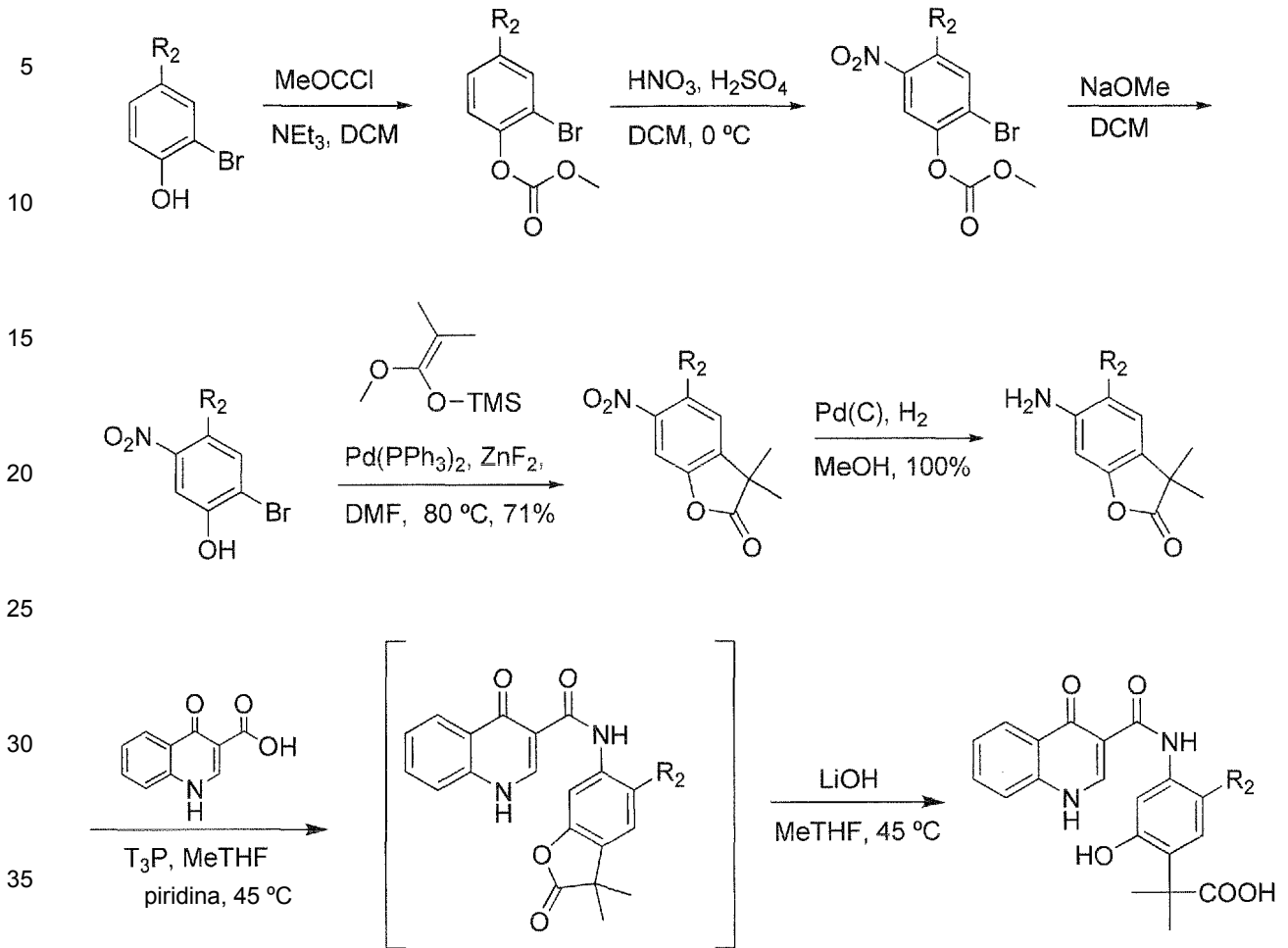


55 Alternativamente, anilinas de la Fórmula 3, donde R_4 y R_5 conjuntamente con el anillo de fenil al que están adjuntados por la fórmula 3,3-dimetilbenzofuran-2(3H)-ona, pueden ser sintetizados de acuerdo con el Esquema 5.

60

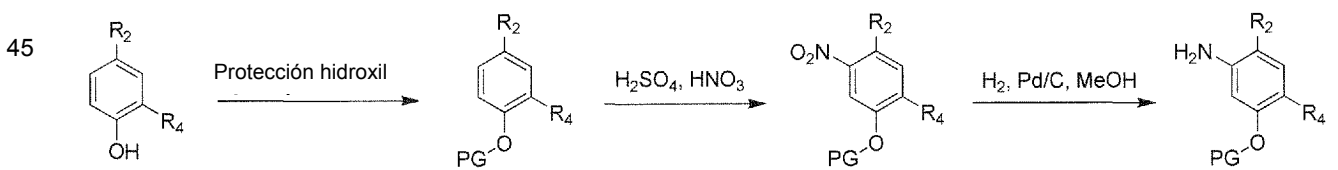
65

Esquema 5



Anilinas de la Fórmula 3, donde R₅ es un hidroxil protegido, puede ser sintetizada de acuerdo con el esquema 6.

Esquema 6



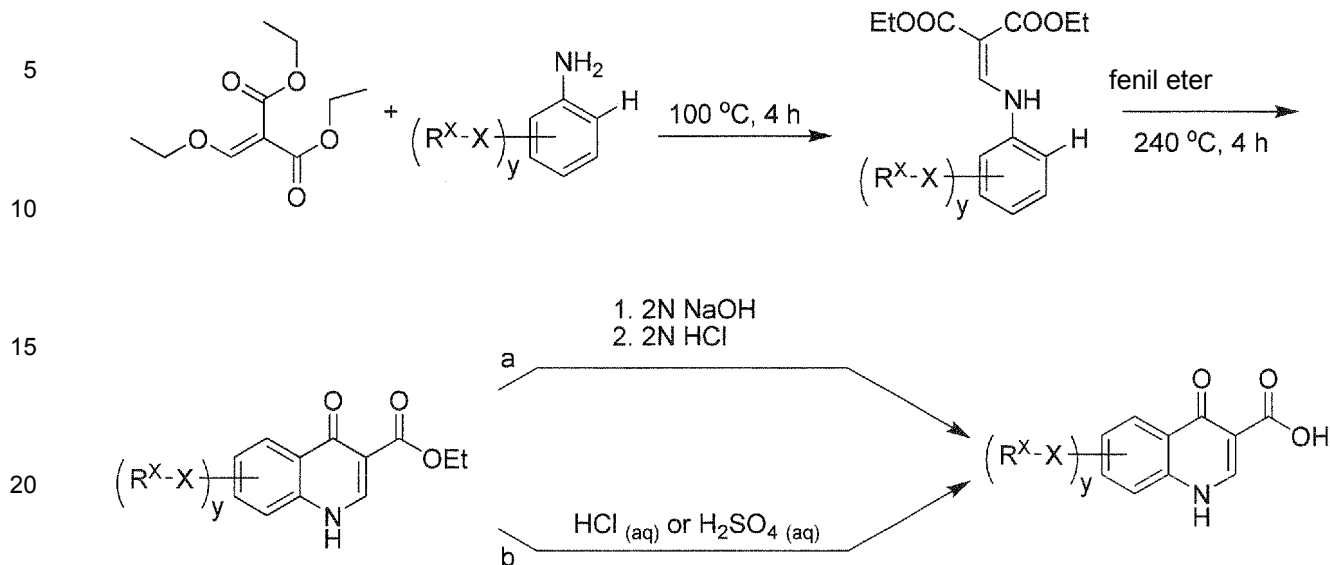
Pueden sintetizarse ácidos dihidroquinolincarboxílicos de fórmula 2 según el Esquema 7, en el que el derivado de anilina se somete a adición de conjugado a EtOCH=C(COOEt)₂, seguido de reordenamiento térmico e hidrólisis.

55

60

65

Esquema 7



IV. USOS Y MÉTODOS DE USO

Composiciones farmacéuticamente aceptables

30 Se describen en la presente composiciones farmacéuticamente aceptables, en el 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 ciertos aspectos descritos en el presente documento, estas composiciones comprenden opcionalmente además uno o más agentes terapéuticos adicionales.

35 También se apreciará que ciertos de los compuestos descritos en el presente documento 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 del mismo 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.

45 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 esta 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.

50 Las sales farmacéuticamente aceptables son muy conocidas en la técnica. Por ejemplo, S. M. Berge et al. describen sales farmacéuticamente aceptables en detalle en J. Pharmaceutical Sciences, 1977, 66, 1-19, incorporado en el presente documento por referencia. 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, bencenosulfonato, 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 $N^+(\text{alquilo } C_{1-4})_4$. 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 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 sodio, hidrogenofosfato de potasio, cloruro sódico, sales de cinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, poliacrilatos, ceras, polímeros de bloques de polietileno-polioxiopropileno, 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 alginico; 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.

Usos de compuestos y composiciones farmacéuticamente aceptables

En la presente se describe un método para tratar o reducir la gravedad de una afección, enfermedad o trastorno en el que está implicada la mutación de CFTR. En la presente se describe un método para tratar una afección, enfermedad o trastorno en el que está implicada una deficiencia de la actividad de CFTR, comprendiendo el método administrar una composición que comprende un compuesto de fórmula 1 a un sujeto, preferentemente un mamífero, en necesidad del mismo.

En la presente se describe un método para tratar o reducir la gravedad de una enfermedad en un paciente que comprende administrar a dicho paciente una de las composiciones que se definen en el presente documento, y dicha enfermedad está seleccionada de fibrosis quística, asma, EPOC inducida por humo, bronquitis crónica, rinosinusitis, estreñimiento, pancreatitis, insuficiencia pancreática, esterilidad masculina producida por ausencia bilateral congénita de conductos deferentes (CBAVD), enfermedad pulmonar leve, pancreatitis idiopática, aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA), enfermedad hepática, enfisema hereditario, hemocromatosis hereditaria, deficiencias en la coagulación-fibrinólisis, tales como deficiencia de proteína C, angioedema hereditario tipo 1, deficiencias en el 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, 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 (debido a defecto en el procesamiento de las proteínas priónicas), enfermedad de Fabry, síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, EPOC, enfermedad del ojo seco, o enfermedad de Sjögren, osteoporosis, osteopenia, consolidación ósea y crecimiento óseo (incluyendo reparación

5 ósea, regeneración ósea, reducción de la resorción ósea y aumento de la deposición ósea), síndrome de Gorham, canalopatías de cloruro tales como miotonía congénita (formas de Thomson y de Becker), síndrome de Bartter tipo III, enfermedad de Dent, hiperekplexia, epilepsia, hiperekplexia, enfermedad de almacenamiento de lisosomas, síndrome de Angelman y discinesia ciliar primaria (DCP), un término para trastornos heredados de la estructura y/o función de los cilios, que incluye DCP con situs inverso a (también conocida como síndrome de Kartagener), DCP sin situs inverso y aplasia ciliar.

10 En algunas realizaciones, el método incluye tratar o reducir la gravedad de fibrosis quística en un paciente que comprende administrar a dicho paciente una de las composiciones que se definen en el presente documento. En ciertas realizaciones, el paciente posee formas mutantes de CFTR humano. En otras realizaciones, el paciente posee una o más de las siguientes mutaciones $\Delta F508$, R117H y G551D de CFTR humano. En una realización, el método incluye tratar o reducir la gravedad de fibrosis quística en un paciente que posee la mutación $\Delta F508$ de CFTR humano que comprende administrar a dicho paciente una de las composiciones que se definen en el presente documento. En una realización, el método incluye tratar o reducir la gravedad de fibrosis quística en un paciente que poseen la mutación G551D de CFTR humano que comprende administrar a dicho paciente una de las composiciones que se definen en el presente documento. En una realización, el método incluye tratar o reducir la gravedad de fibrosis quística en un paciente que posee la mutación $\Delta F508$ de CFTR humano en al menos un alelo que comprende administrar a dicho paciente una de las composiciones que se definen en el presente documento. En una realización, el método incluye tratar o reducir la gravedad de fibrosis quística en un paciente que posee la mutación $\Delta F508$ de CFTR humano en ambos alelos que comprende administrar a dicho paciente una de las composiciones que se definen en el presente documento. En una realización, el método incluye tratar o reducir la gravedad de fibrosis quística en un paciente que posee la mutación G551D de CFTR humano en al menos un alelo que comprende administrar a dicho paciente una de las composiciones que se definen en el presente documento. En una realización, el método incluye tratar o reducir la gravedad de fibrosis quística en un paciente que posee la mutación G551D de CFTR humano en ambos alelos que comprende administrar a dicho paciente una de las composiciones que se definen en el presente documento.

30 En algunas realizaciones, el método incluye reducir la gravedad de fibrosis quística en un paciente que comprende administrar a dicho paciente una de las composiciones que se definen en el presente documento. En ciertas realizaciones, el paciente posee formas mutantes de CFTR humano. En otras realizaciones, el paciente posee una o más de las siguientes mutaciones $\Delta F508$, R117H y G551D de CFTR humano. En una realización, el método incluye reducir la gravedad de fibrosis quística en un paciente que posee la mutación $\Delta F508$ de CFTR humano que comprende administrar a dicho paciente una de las composiciones que se definen en el presente documento. En una realización, el método incluye reducir la gravedad de fibrosis quística en un paciente que posee la mutación G551D de CFTR humano que comprende administrar a dicho paciente una de las composiciones que se definen en el presente documento. En una realización, el método incluye reducir la gravedad de fibrosis quística en un paciente que posee la mutación $\Delta F508$ de CFTR humano en al menos un alelo que comprende administrar a dicho paciente una de las composiciones que se definen en el presente documento. En una realización, el método incluye reducir la gravedad de fibrosis quística en un paciente que posee la mutación $\Delta F508$ de CFTR humano en ambos alelos que comprende administrar a dicho paciente una de las composiciones que se definen en el presente documento. En una realización, el método incluye reducir la gravedad de fibrosis quística en un paciente que posee la mutación G551D de CFTR humano en al menos un alelo que comprende administrar a dicho paciente una de las composiciones que se definen en el presente documento. En una realización, el método incluye reducir la gravedad de fibrosis quística en un paciente que posee la mutación G551D de CFTR humano en ambos alelos que comprende administrar a dicho paciente una de las composiciones que se definen en el presente documento.

50 En algunos aspectos, la invención proporciona un método para tratar o reducir la gravedad de osteoporosis en un paciente que comprende administrar a dicho paciente el compuesto de fórmula 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En algunas realizaciones, el método para tratar o reducir la gravedad de osteoporosis en un paciente comprende administrar a dicho paciente el compuesto sustancialmente amorfo de fórmula 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

55 En todavía otras realizaciones, el método para tratar o reducir la gravedad de osteoporosis en un paciente comprende administrar a dicho paciente el compuesto amorfo de fórmula 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

60 En ciertas realizaciones, el método para tratar o reducir la gravedad de osteoporosis en un paciente comprende administrar a dicho paciente una composición farmacéutica como se describe en el presente documento.

En algunos aspectos, la invención proporciona un método para tratar o reducir la gravedad de osteopenia en un paciente que comprende administrar a dicho paciente el compuesto de fórmula 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

65

En algunas realizaciones, el método para tratar o reducir la gravedad de osteopenia en un paciente comprende administrar a dicho paciente el compuesto sustancialmente amorfo de fórmula 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5 En otras realizaciones, el método para tratar o reducir la gravedad de osteopenia en un paciente comprende administrar a dicho paciente el compuesto amorfo de fórmula 1.

10 En ciertas realizaciones, el método para tratar o reducir la gravedad de osteopenia en un paciente comprende administrar a dicho paciente una composición farmacéutica como se describe en el presente documento.

En algunos aspectos, la invención proporciona un método de consolidación ósea y/o reparación ósea en un paciente que comprende administrar a dicho paciente el compuesto de fórmula 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

15 En algunas realizaciones, el método de consolidación ósea y/o reparación ósea en un paciente comprende administrar a dicho paciente el compuesto sustancialmente amorfo de fórmula 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

20 En todavía otras realizaciones, el método de consolidación ósea y/o reparación ósea en un paciente comprende administrar a dicho paciente el compuesto amorfo de fórmula 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

25 En ciertas realizaciones, el método de consolidación ósea y/o reparación ósea en un paciente comprende administrar a dicho paciente una composición farmacéutica como se describe en el presente documento.

En algunos aspectos la invención proporciona un método de reducción de la resorción ósea en un paciente que comprende administrar a dicho paciente el compuesto de fórmula 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

30 En algunas realizaciones, el método de reducción de la resorción ósea en un paciente comprende administrar a dicho paciente el compuesto sustancialmente amorfo de fórmula 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

35 En otras realizaciones, el método de reducción de la resorción ósea en un paciente comprende administrar a dicho paciente el compuesto amorfo de fórmula 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

40 En algunos aspectos, la invención proporciona un método de aumento de la deposición ósea en un paciente que comprende administrar a dicho paciente el compuesto de fórmula 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En algunas realizaciones, el método de aumento de la deposición ósea en un paciente comprende administrar a dicho paciente el compuesto sustancialmente amorfo de fórmula 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

45 En todavía otras a realizaciones, el método de aumento de la deposición ósea en un paciente comprende administrar a dicho paciente el compuesto amorfo de fórmula 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

50 En ciertas realizaciones, el método de aumento de la deposición ósea en un paciente comprende administrar a dicho paciente una composición farmacéutica como se describe en el presente documento.

En algunos aspectos la invención proporciona un método para tratar o reducir la gravedad de EPOC en un paciente que comprende administrar a dicho paciente el compuesto de fórmula 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

55 En algunas realizaciones, el método para tratar o reducir la gravedad de EPOC en un paciente comprende administrar a dicho paciente el compuesto sustancialmente amorfo de fórmula 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

60 En todavía otras realizaciones, el método para tratar o reducir la gravedad de EPOC en un paciente comprende administrar a dicho paciente el compuesto amorfo de fórmula 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

65 En ciertas realizaciones, el método para tratar o reducir la gravedad de EPOC en un paciente comprende administrar a dicho paciente una composición farmacéutica como se describe en el presente documento.

En la presente se describe un método para tratar o reducir la gravedad de EPOC inducida por humo en un paciente que comprende administrar a dicho paciente el compuesto de fórmula 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5 En algunas realizaciones, el método para tratar o reducir la gravedad de EPOC inducida por humo en un paciente comprende administrar a dicho paciente el compuesto sustancialmente amorfo de fórmula 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10 En todavía otras realizaciones, el método para tratar o reducir la gravedad de EPOC inducida por humo en un paciente comprende administrar a dicho paciente el compuesto amorfo de fórmula 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

15 En ciertas realizaciones, el método para tratar o reducir la gravedad de EPOC inducida por humo en un paciente comprende administrar a dicho paciente una composición farmacéutica como se describe en el presente documento.

20 En la presente se describe un método para tratar o reducir la gravedad de bronquitis crónica en un paciente que comprende administrar a dicho paciente el compuesto de fórmula 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En algunas realizaciones, el método para tratar o reducir la gravedad de bronquitis crónica en un paciente comprende administrar a dicho paciente el compuesto sustancialmente amorfo de fórmula 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

25 En todavía otras realizaciones, el método para tratar o reducir la gravedad de bronquitis crónica en un paciente comprende administrar a dicho paciente el compuesto amorfo de fórmula 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

30 En ciertas realizaciones, el método para tratar o reducir la gravedad de bronquitis crónica en un paciente comprende administrar a dicho paciente una composición farmacéutica como se describe en el presente documento.

En la presente se describe un método para tratar fibrosis quística que comprende la etapa de administrar a dicho mamífero una cantidad eficaz de una composición que comprende un compuesto de la presente invención.

35 Según la invención, una "cantidad eficaz" del compuesto o composición farmacéuticamente aceptable es aquella cantidad eficaz para tratar o reducir la gravedad de una o más de las enfermedades, trastornos o afecciones que se han citado anteriormente.

40 En la presente se describe un método de administración de una composición farmacéutica administrando por vía oral a un paciente al menos una vez al día la composición que comprende un compuesto de fórmula 1. En una realización, el método comprende administrar una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula 1 cada 24 horas. En otra realización, el método comprende administrar una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula 1 cada 12 horas. En otra realización, el método comprende administrar una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula 1 tres veces al día. En todavía otra realización, el método comprende administrar una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula 1 cada 4 horas.

50 Los compuestos y composiciones, de acuerdo con el método descrito en el presente documento, pueden administrarse usando cualquier cantidad y cualquier vía de administración eficaz para tratar o reducir la gravedad de una o más de las enfermedades, trastornos o afecciones que se han citado anteriormente.

55 En ciertas realizaciones, los compuestos y composiciones de la presente invención son útiles para tratar o reducir la gravedad de la fibrosis quística en pacientes que presentan actividad de CFTR residual en la membrana apical de epitelios respiratorios y no respiratorios. La presencia de actividad de CFTR residual en la superficie epitelial puede detectarse fácilmente usando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, técnicas electrofisiológicas, bioquímicas o histoquímicas estándar. Tales métodos identifican actividad de CFTR usando técnicas electrofisiológicas *in vivo* o *ex vivo*, medición de sudor o concentraciones de Cl⁻ salivares, o técnicas bioquímicas o histoquímicas *ex vivo* para monitorizar la densidad de la superficie celular. Usando tales métodos, la actividad de CFTR residual puede detectarse fácilmente en pacientes heterocigóticos u homocigóticos para una variedad de mutaciones diferentes, que incluyen pacientes homocigóticos o heterocigóticos para la mutación más común, $\Delta F508$.

60 En otra realización, los compuestos y composiciones de la presente invención son útiles para tratar o reducir la gravedad de fibrosis quística en pacientes que tienen actividad de CFTR residual inducida o aumentada usando métodos farmacológicos o terapia génica. Tales métodos aumentan la cantidad de CFTR presente en la

65

superficie celular, induciendo así una actividad de CFTR hasta ahora ausente en un paciente o aumentando el nivel existente de actividad de CFTR residual en un paciente.

5 En una realización, los compuestos y composiciones de la presente invención son útiles para tratar o reducir la gravedad de fibrosis quística en pacientes dentro de ciertos genotipos que presentan actividad de CFTR residual, por ejemplo, mutaciones de clase III (regulación o apertura alterada), mutaciones de clase IV (conductancia alterada), o mutaciones de clase V (síntesis reducida) (Lee R. Choo-Kang, Pamela L., Zeitlin, Type I, II, III, IV, and V cystic fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Defects and Opportunities of Therapy; Current Opinion in Pulmonary Medicine 6:521 - 529, 2000). Otros genotipos de pacientes que presentan actividad de CFTR residual
10 incluyen pacientes homocigóticos para una de estas clases o heterocigóticos con cualquier otra clase de mutaciones, que incluyen mutaciones de clase I, mutaciones de clase II, o una mutación que carece de clasificación.

15 En una realización, los compuestos y composiciones de la presente invención son útiles para tratar o reducir la gravedad de fibrosis quística en pacientes dentro de ciertos fenotipos clínicos, por ejemplo, un fenotipo clínico de moderado a leve que normalmente se correlaciona con la cantidad de actividad de CFTR residual en la membrana apical de epitelios. Tales fenotipos incluyen pacientes que presentan insuficiencia pancreática o pacientes diagnosticados con pancreatitis idiopática y ausencia bilateral congénita de los conductos deferentes, o enfermedad pulmonar leve.

20 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
25 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.

35 Las composiciones farmacéuticamente aceptables descritas en el presente documento pueden administrarse a seres humanos y otros animales por vía oral, rectalmente, parenteralmente, intracisternalmente, intravaginalmente, intraperitonealmente, tópicamente (como por polvos, pomadas, gotas o parche), bucalmente, como un espray 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
40 0,5 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.

45 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,
50 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.

55 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,
60 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.

65 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.

5 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
10 prolongada inyectables formando matrices microencapsuladas del compuesto en polímeros biodegradables tales
como polilactida-poli(glicolida). 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
15 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
20 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
25 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
30 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.

35 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
40 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
45 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
50 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.
55 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.
60

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
65 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.

La actividad de un compuesto utilizado en la presente invención como modulador de CFTR 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".

En una realización, el agente adicional está seleccionado de un agente mucolítico, broncodilatador, un antibiótico, un agente antiinfeccioso, un agente antiinflamatorio, un modulador de CFTR distinto de un compuesto de la presente invención, o un agente nutritivo.

En una realización, el agente adicional es un antibiótico. Antibióticos a modo de ejemplo útiles en el presente documento incluyen tobramicina, que incluye polvo inhalado de tobramicina (TIP), azitromicina, aztreonam, que incluye la forma aerosolizada de aztreonam, amikacina, que incluye formulaciones liposómicas de la misma, ciprofloxacina, que incluye formulaciones de la misma adecuadas para administración por inhalación, levofloxacina, que incluye formulaciones aerosolizadas de la misma, y combinaciones de dos antibióticos, por ejemplo, fosfomicina y tobramicina.

En otra realización, el agente adicional es un mucolítico. Mucolíticos a modo de ejemplo útiles en el presente documento incluyen Pulmozyme®.

En otra realización, el agente adicional es un broncodilatador. Broncodilatadores a modo de ejemplo incluyen albuterol, sulfato de metaproterenol, acetato de pirbuterol, salmeterol o sulfato de tetrabulina.

En otra realización, el agente adicional es eficaz en restaurar el líquido superficial de las vías respiratorias pulmonares. Tales agentes mejoran el movimiento de sal dentro y fuera de las células, permitiendo que el moco en las vías respiratorias pulmonares esté más hidratado y, por tanto, se limpie más fácilmente. Agentes a modo de ejemplo tales incluyen solución salina hipertónica, denufosol tetrasódico [((2R,3S,4R,5R)-5-(2,4-dioxopirimidin-1-il)-3,4-dihidroxioxolan-2-il)metoxi-hidroxifosforil]oxi-hidroxifosforil]hidrogenofosfato de (((3S,5R)-5-(4-amino-2-oxopirimidin-1-il)-3-hidroxioxolan-2-il)metoxi-hidroxifosforil)], o bronquitol (formulación inhalada de manitol).

En otra realización, el agente adicional es un agente antiinflamatorio, es decir, un agente que puede reducir la inflamación en los pulmones. Agentes a modo de ejemplo tales útiles en el presente documento incluyen ibuprofeno, ácido docosahexanoico (DHA), sildenafil, glutatión inhalado, pioglitazona, hidroxiclороquina o simvastatina.

En otra realización, el agente adicional es un modulador de CFTR distinto del compuesto 1, es decir, un agente que tiene el efecto de modular la actividad de CFTR. Agentes a modo de ejemplo tales incluyen ataluren ("PTC124®"; ácido 3-[5-(2-fluorofenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]benzoico), sinapultida, lancovutida, depelestat (un inhibidor de elastasa neutrófila recombinante humana), cobiprostona (ácido 7-((2R, 4aR, 5R, 7aR)-2-((3S)-1,1-difluoro-3-metilpentil]-2-hidroxi-6-oxooctahidrociclopenta[b]piran-5-il)heptanoico), o ácido (3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il) ciclopropanocarboxamido)-3-metilpiridin-2-il)benzoico. En otra realización, el agente adicional es ácido (3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)ciclopropanocarboxamido)-3-metilpiridin-2-il)benzoico.

En otra realización, el agente adicional es un agente nutritivo. Agentes a modo de ejemplo tales incluyen pancrelipasa (sustitución de enzima pancreática), que incluye Pancrease®, Pancreacarb®, Ultrase® o Creon®, Liprotomase® (anteriormente Trizyte®), Aquadeks®, o inhalación de glutatión. En la realización, el agente nutritivo adicional es pancrelipasa.

La cantidad de agente terapéutico adicional presente en las composiciones de esta 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.

5 Los compuestos de esta 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 de manera general con anterioridad, 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 de manera general con anterioridad, 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.

La divulgación también se refiere a modular la actividad de CFTR 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 1 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 CFTR 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 CFTR en fenómenos biológicos y patológicos; y la evaluación comparativa de nuevos moduladores de CFTR.

En otra realización más se proporciona un método de modulación de 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 de fórmula 1. En realizaciones, el canal de aniones es un canal de cloruro o un canal de bicarbonato. En otras realizaciones, el canal de aniones es un canal de cloruro.

En la presente se describe un método de aumento del número de CFTR funcionales en una membrana de una célula, que comprende la etapa de poner en contacto dicha célula con un compuesto de fórmula 1.

Según otra realización, la actividad de CFTR 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, et al. (1999) "Cell-based assays and instrumentation for screening ion-channel targets" *Drug Discov Today* 4(9): 431-439).

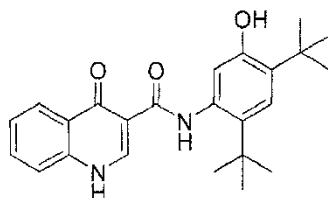
Estos ensayos sensibles al voltaje se basan en el cambio en la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) entre el colorante sensible al voltaje soluble en la membrana DiSBAC₂(3) y un fosfolípido fluorescente, CC2-DMPE, que está unido a la capa externa de la membrana plasmática y actúa de donante de FRET. Los cambios en el potencial de membrana (V_m) hacen que DiSBAC₂(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 o 384 pocillos.

En la presente se describe un método de modulación de la actividad de CFTR en una muestra biológica que comprende la etapa de poner en contacto dicha muestra biológica con un compuesto de fórmula 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que R₁, R₂, R₃, R₄ y Y se definen como antes.

En la presente se describe un método de modulación de la actividad de CFTR en una muestra biológica que comprende la etapa de poner en contacto dicha muestra biológica con un compuesto, producido por los procesos descritos en el presente documento, de la estructura:

5

10



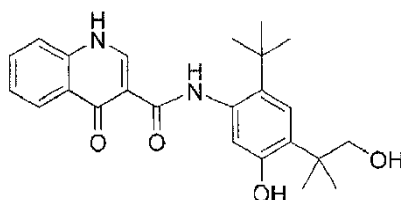
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

15

En la presente se describe un método de modulación de la actividad de CFTR en una muestra biológica que comprende la etapa de poner en contacto dicha muestra biológica con un compuesto, producido por los procesos descritos en el presente documento, de la estructura:

20

25



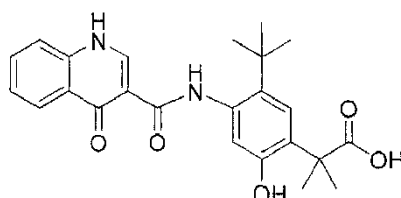
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

30

En la presente se describe un método de modulación de la actividad de CFTR en una muestra biológica que comprende la etapa de poner en contacto dicha muestra biológica con un compuesto, producido por los procesos descritos en el presente documento, de la estructura:

35

40



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

45

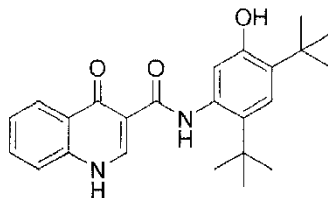
En la presente se describe un método para tratar o reducir la gravedad de una enfermedad en un paciente que comprende administrar a dicho paciente una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que R_1 , R_2 , R_3 , R_4 y Y se definen como antes, y dicha enfermedad está seleccionada de fibrosis quística, asma, EPOC inducida por humo, bronquitis crónica, rinosinusitis, estreñimiento, pancreatitis, insuficiencia pancreática, esterilidad masculina producida por ausencia bilateral congénita de conductos deferentes (CBAVD), enfermedad pulmonar leve, pancreatitis idiopática, aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA), enfermedad hepática, enfisema hereditario, hemocromatosis hereditaria, deficiencias en la coagulación-fibrinólisis, tales como deficiencia de proteína C, angioedema hereditario tipo 1, deficiencias en el 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, 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 (debido a defecto en el procesamiento de las proteínas priónicas), enfermedad de Fabry, síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, EPOC, enfermedad del ojo seco, o enfermedad de Sjögren.

65

En una realización, el método incluye tratar o reducir la gravedad de una enfermedad en un paciente administrando a dicho paciente una cantidad eficaz de un compuesto, producido por los procesos descritos en el presente documento, que tiene la estructura:

5

10



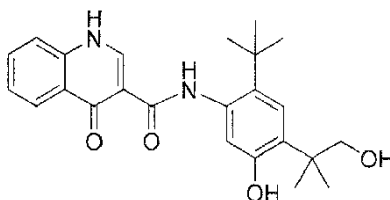
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

15

En una realización, el método incluye tratar o reducir la gravedad de una enfermedad en un paciente administrando a dicho paciente una cantidad eficaz de un compuesto, producido por los procesos descritos en el presente documento, que tiene la estructura:

20

25



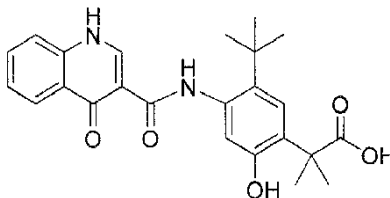
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

30

En otro aspecto descrito en el presente documento, el método incluye tratar o reducir la gravedad de una enfermedad en un paciente administrando a dicho paciente una cantidad eficaz de un compuesto, producido por los procesos descritos en el presente documento, que tiene la estructura:

35

40



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

45

En otra realización se describe un kit para su uso en medir la actividad de CFTR o un fragmento del mismo en una muestra biológica *in vitro* o *in vivo* que comprende (i) una composición que comprende un compuesto de fórmula 1 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 CFTR o un fragmento del mismo.

50

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 CFTR o un fragmento del mismo en presencia de dicho compuesto adicional, y c) comparar la actividad de CFTR en presencia del compuesto adicional con la densidad de CFTR en presencia de una composición de fórmula 1.

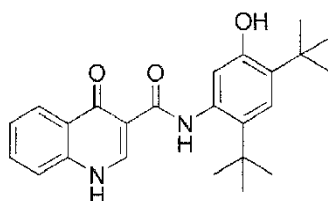
55

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

En una realización, el kit incluye una composición que comprende un compuesto, producido por los procesos descritos en el presente documento, que tiene la estructura:

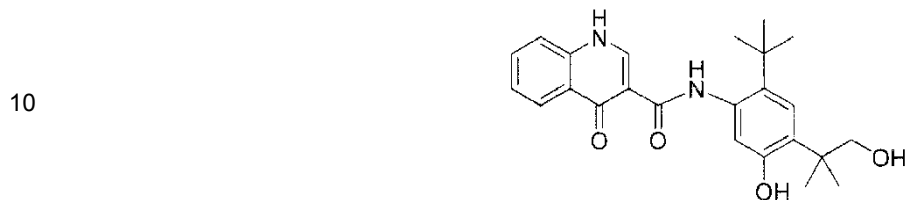
60

65



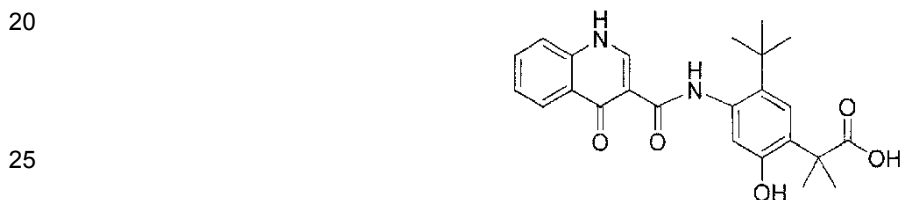
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5 En una realización, el kit incluye una composición que comprende un compuesto, producido por los procesos descritos en el presente documento, que tiene la estructura:



15 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En algunas realizaciones, el kit incluye una composición que comprende un compuesto, producido por los procesos descritos en el presente documento, que tiene la estructura:

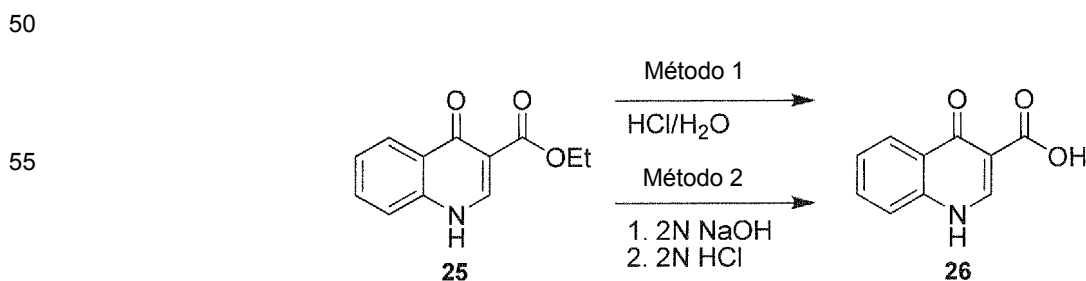
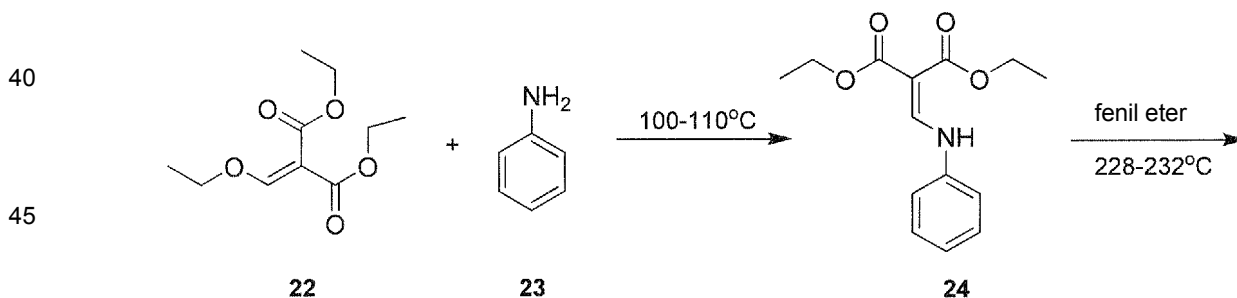


o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

30 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.

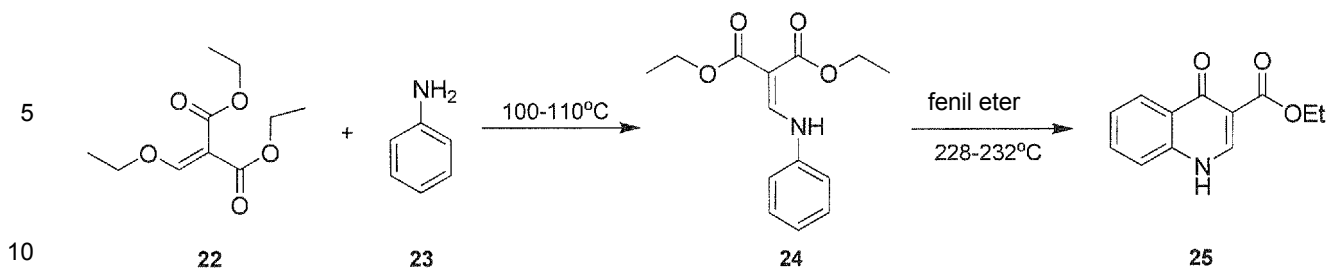
35 V. EJEMPLOS

Preparación 1: Síntesis total de ácido 4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico (26)



Procedimiento para la preparación de 4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxilato de etilo (25)

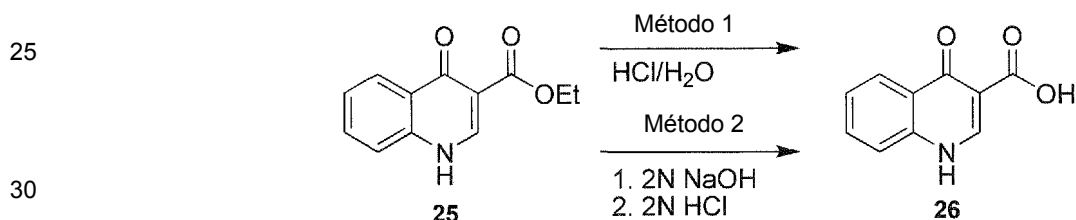
65



15 Se añadió el compuesto 23 (4,77 g, 47,7 mmoles) gota a gota al compuesto 22 (10 g, 46,3 mmoles) con flujo de N₂ subsuperficial para expulsar el etanol por debajo de 30 °C durante 0,5 horas. A continuación, la disolución se calentó a 100-110 °C y se agitó durante 2,5 horas. Después de enfriarse la mezcla a por debajo de 60 °C, se añadió difenil éter. La disolución resultante se añadió gota a gota al difenil éter que se había calentado a 228-232 °C durante 1,5 horas con flujo de N₂ subsuperficial para expulsar el etanol. La mezcla se agitó a 228-232 °C durante otras 2 horas, se enfrió a por debajo de 100 °C y a continuación se añadió heptano para precipitar el producto. La suspensión resultante se agitó a 30 °C durante 0,5 horas. A continuación, los sólidos se filtraron, y la torta se lavó con heptano y se secó a vacío dando el compuesto **25** como un sólido marrón. RMN ¹H (DMSO-d₆; 400 MHz) δ 12,25 (s), δ 8,49 (d), δ 8,10 (m), δ 7,64 (m), δ 7,55 (m), δ 7,34 (m), δ 4,16 (q), δ 1,23 (t).

20

Procedimiento para la preparación de ácido 4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico (26)



Método 1

35 Se suspendió el compuesto **25** (1,0 eq) en una disolución de HCl (10,0 eq) y H₂O (11,6 vol). La suspensión se calentó a 85 - 90 °C, aunque también son adecuadas temperaturas alternativas para esta etapa de hidrólisis. Por ejemplo, la hidrólisis puede realizarse alternativamente a una temperatura de aproximadamente 75 a aproximadamente 100 °C. En algunos casos, la hidrólisis se realiza a una temperatura de aproximadamente 80 a aproximadamente 95 °C. En otros, la etapa de hidrólisis se realiza a una temperatura de aproximadamente 82 a aproximadamente 93 °C (por ejemplo, de aproximadamente 82,5 a aproximadamente 92,5 °C o de aproximadamente 86 a aproximadamente 89 °C). Después de agitar a 85 - 90 °C durante aproximadamente 6,5 horas, la reacción se muestreó para la completitud de reacción. La agitación puede realizarse bajo cualquiera de las temperaturas aptas para la hidrólisis. A continuación, la disolución se enfrió a 20 - 25 °C y se filtró. El reactor/torta se aclaró con H₂O (2 vol x 2). A continuación, la torta se lavó con 2 vol de H₂O hasta que el pH ≥ 3,0. A continuación, la torta se secó a vacío a 60 °C dando el compuesto **26**.

40

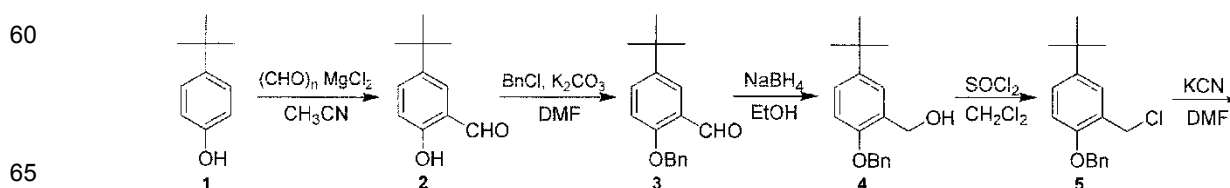
45

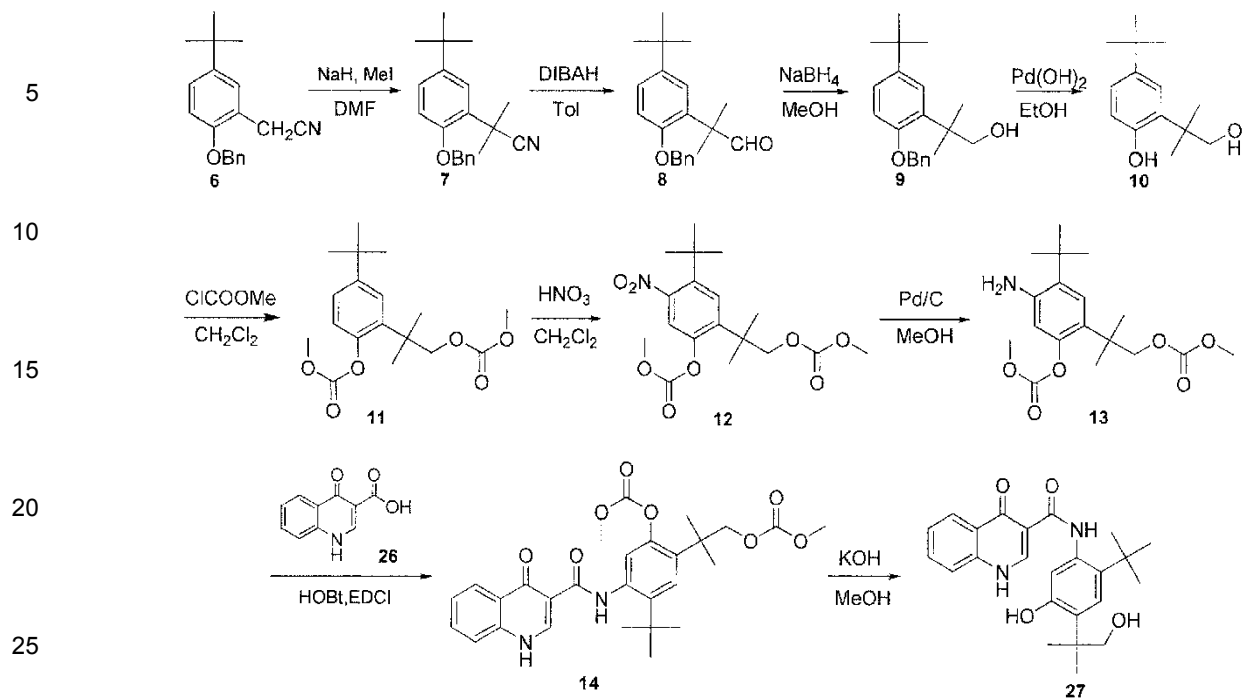
Método 2

50 Se añadió el compuesto **25** (11,3 g, 52 mmoles) a una mezcla de 10 % de NaOH (ac) (10 ml) y etanol (100 ml). La disolución se calentó a reflujo durante 16 horas, se enfrió a 20-25 °C y a continuación el pH se ajustó a 2-3 con 8 % de HCl. A continuación, la mezcla se agitó durante 0,5 horas y se filtró. La torta se lavó con agua (50 ml) y a continuación se secó a vacío dando el compuesto 26 como un sólido marrón. RMN ¹H (DMSO-d₆; 400 MHz) δ 15,33 (s), δ 13,39 (s), δ 8,87 (s), δ 8,26 (m), δ 7,87 (m), δ 7,80 (m), δ 7,56 (m).

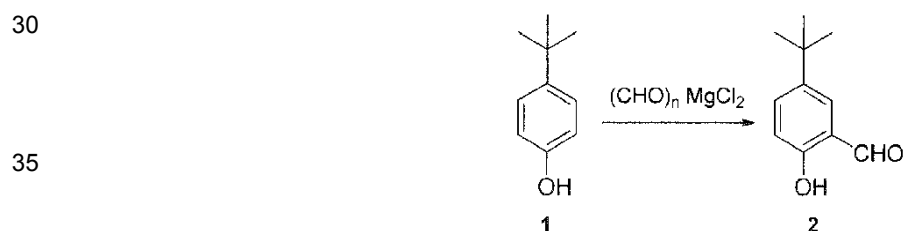
55 **Ejemplo 1: Síntesis total de N-(2-terc-butil-5-hidroxi-4-(1-hidroxi-2-metilpropan-2-il)fenil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxamida (27)**

El esquema global de la síntesis del compuesto **27** se muestra a continuación, seguido del procedimiento para la síntesis de cada producto intermedio sintético.



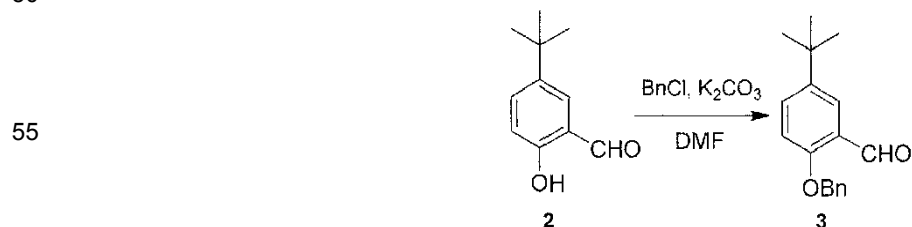


Procedimiento para la preparación de 2-hidroxi-5-terc-butilbenzaldehído (2)



40 A una disolución con agitación del compuesto **1** (700 g, 4,66 moles) en CH₃CN (7,0 l) se añadió MgCl₂ (887 g, 9,32 moles), para-formaldehído (1190 g) y TEA (2,5 l, 17,9 moles) bajo N₂. La mezcla se calentó a reflujo durante 5 horas. Después de enfriarse a temperatura ambiente se añadieron 2 l de agua con hielo a la mezcla, seguido de 6 l de HCl 3 M (ac). La suspensión se dejó con agitación hasta que la disolución se volvió clara. Se separó la fase orgánica y la fase acuosa se extrajo con MTBE (3 l × 3). Las fases orgánicas se combinaron y se concentraron a sequedad. El residuo se disolvió en MTBE (4000 ml), se lavó con agua (1000 ml × 2) y salmuera (1000 ml), se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró, a continuación se concentró dando el compuesto **2** como un sólido amarillo claro, que se usó en la siguiente reacción sin secado o purificación adicional. RMN ¹H (CDCl₃; 400 MHz) δ 10,86 (s), δ 9,89 (s), δ 7,59 (m), δ 7,51 (d), δ 6,94 (d), δ 10,61 (s).

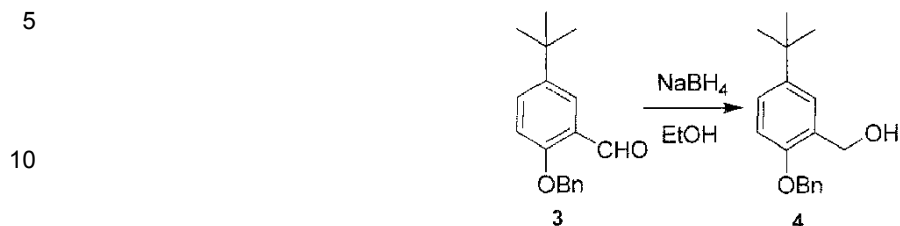
Procedimiento para la preparación de 2-(benciloxi)-5-terc-butilbenzaldehído (3)



60 A una disolución con agitación del compuesto **2** (614,5 g, 3,33 moles) en DMF (3,5 l) se añadió K₂CO₃ (953 g, 6,90 moles) y cloruro de bencilo (480 g, 3,80 moles). La mezcla se calentó a 90 °C y se dejó con agitación durante 3 horas. La suspensión se enfrió a temperatura ambiente, entonces se añadió MTBE (2 l), seguido de agua (12 l). A continuación, la mezcla se agitó durante 10 minutos y la fase acuosa se separó y se extrajo con MTBE (2 l × 3). Las fases orgánicas se combinaron y se lavaron con agua (2 l × 2) y salmuera (1,5 l × 1) y se concentraron dando el compuesto **3** como un sólido amarillo claro. RMN ¹H (DMSO-d₆; 400 MHz) δ 10,42 (s), δ 7,71 (m), δ 7,51 (m), δ 7,43

(m), δ 7,35 (m), δ 7,24 (m), δ 5,27 (s), δ 1,26 (s).

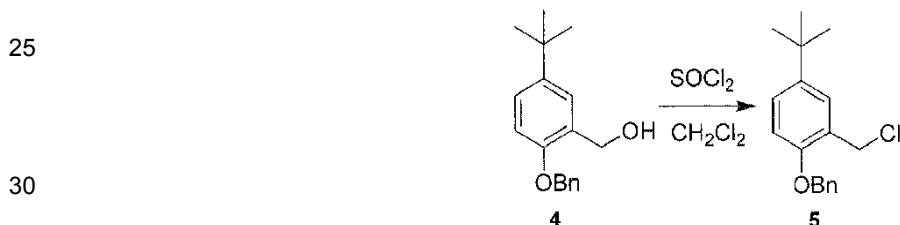
Procedimiento para la preparación de alcohol 2-(benciloxi)-5-terc-butil-bencílico (4)



15 A una suspensión con agitación del compuesto 3 (974 g, 3,63 moles) en MeOH (4000 ml) se añadió lentamente NaBH_4 (121 g, 3,20 moles) a 0-20 °C. La disolución se dejó con agitación a 15 °C durante 3 horas, y a continuación se enfrió a 0 °C. Se añadió HCl 2 N (ac) (1300 ml) gota a gota a por debajo de 20 °C. A continuación, la disolución se filtró y se evaporó a sequedad, y el residuo se disolvió en MTBE (5 l). A continuación, la disolución se lavó con agua (2 l \times 2) y salmuera (1,5 l \times 1). La evaporación del disolvente dio el compuesto 4 como un sólido amarillo claro que se usó en la siguiente reacción sin más purificación. RMN ^1H (DMSO- d_6 ; 400 MHz) δ 7,40 (m), δ 7,32 (m), δ 7,17 (m), δ 6,91 (m), δ 5,09 (s), δ 5,00 (t), δ 4,56 (d), δ 1,26 (s).

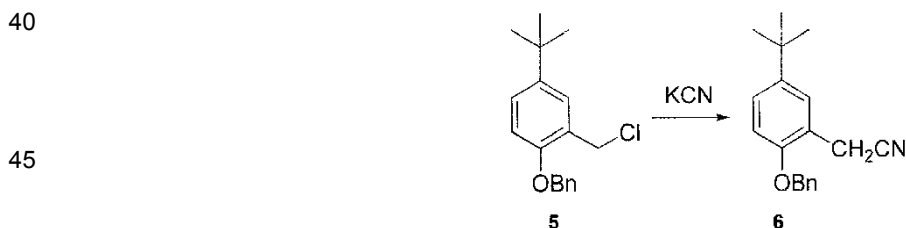
20

Procedimiento para la preparación de cloruro de 2-(benciloxi)-5-terc-butilbencilo (5)



35 A una disolución con agitación del compuesto 4 (963 g, 3,56 moles) en DCM anhidro (2000 ml) se añadió lentamente SOCl_2 (535 g, 4,5 moles) a 0 °C. La mezcla se agitó a 20 °C durante 2 horas, a continuación se concentró a vacío dando el compuesto 5 como un aceite, que se usó en la siguiente reacción sin secado o purificación adicional.

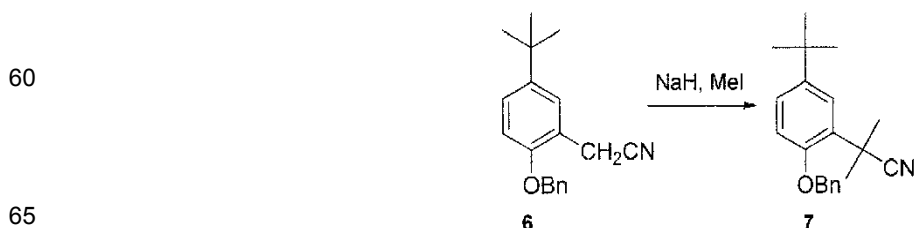
Procedimiento para la preparación de 2-(benciloxi)-5-terc-butilbencilnitrilo (6)



50 A una disolución con agitación del compuesto 5 (1045 g, 3,54 moles) en DMF anhidra (1000 ml) se añadió KCN (733 g, 11,3 moles). La mezcla se agitó a 35 °C durante 24 horas, luego se vertió en agua (10 l). Se añadió acetato de etilo (4 l) y la mezcla se agitó durante 30 minutos. A continuación, la fase orgánica se separó y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (3000 ml \times 2). Las fases orgánicas se combinaron y se lavaron con agua (4 l \times 2) y salmuera (3 l \times 1), a continuación se concentraron a vacío dando el compuesto 6 como un sólido amarillo. RMN ^1H (DMSO- d_6 ; 400 MHz) δ 7,51 (m), δ 7,37 (m), 7,02 (d), δ 5,17 (s), δ 3,88 (s), 1,26 (s).

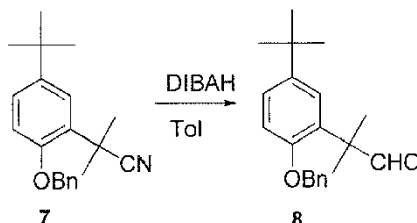
55

Procedimiento para la preparación de 2-(2-(benciloxi)-5-terc-butilfenil)-2-metilpropanonitrilo (7)



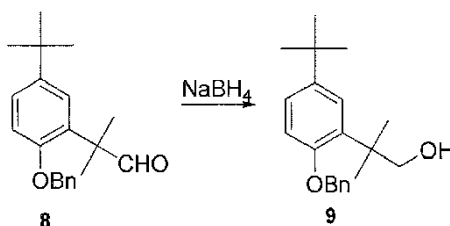
A una suspensión con agitación de NaH (86 g, 2,15 moles, 60 % en aceite mineral) en DMF (1000 ml) se añadió gota a gota una disolución del compuesto 6 (100,0 g, 0,358 moles) en DMF (500 ml) a 20 °C. Después de agitar durante 30 minutos, se añadió Mel (205 g, 1,44 moles) en DMF (500 ml) gota a gota a por debajo de 30 °C durante un periodo de 2 horas. La suspensión se agitó durante 1,5 horas a 25-30 °C, entonces se añadió lentamente hielo (100 g) hasta que no se generó gas. El pH se ajustó a aproximadamente 7 por la lenta adición de HCl 2 N. La mezcla se diluyó con agua (4 l) y MTBE (2 l). Se separó la fase orgánica y la fase acuosa se extrajo con MTBE (500 ml × 2). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con agua y salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron, y a continuación se concentraron a vacío dando el compuesto 7 como un sólido blanco. RMN ¹H (DMSO-d₆; 400 MHz) δ 7,56 (m), δ 7,40 (m), δ 7,34 (m), δ 7,10 (d), δ 5,21 (s), δ 1,73 (s), δ 1,27 (s).

Procedimiento para la preparación de 2-(2-(benciloxi)-5-terc-butilfenil)-2-metilpropanal (8)



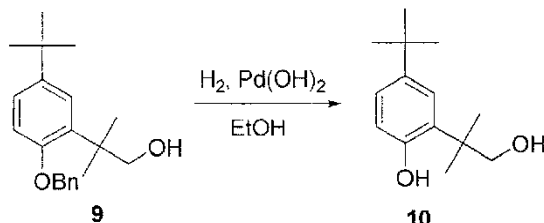
A una disolución con agitación del compuesto 7 (20 g, 0,065 moles) en tolueno (300 ml) se añadió gota a gota DIBALH (80 ml, 1 M en tolueno) a aproximadamente -60 a -50 °C. Después de agitar durante 2 horas se añadió HCl 6 N (300 ml) a la mezcla de reacción y la agitación continuó durante 30 minutos. A continuación se separó la fase orgánica, se lavó con HCl 2 N, seguido de una disolución de NaHCO₃, a continuación una disolución de salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró a vacío proporcionando el compuesto 8 como un aceite. El producto se usó en la siguiente reacción sin más purificación. RMN ¹H (CDCl₃; 400 MHz) δ 9,61 (s), δ 7,36 (m), δ 7,25 (m), δ 6,87 (m), δ 5,06 (m), δ 1,43 (s), δ 1,33(s).

Procedimiento para la preparación de 2-(2-(benciloxi)-5-terc-butilfenil)-2-metilpropan-1-ol (9)



A una disolución con agitación del compuesto 8 (9,21 g, 0,030 moles) en MeOH (150 ml) se añadió lentamente NaBH₄ (2,3 g, 0,061 moles) a 0 °C. Después de agitar la mezcla a 20 °C durante 3 horas, se añadieron 12 ml de HCl 6 N, y la mezcla se agitó durante 30 minutos adicionales. A continuación, la disolución se concentró a aproximadamente un cuarto del volumen original y se extrajo con EtOAc. La fase orgánica se separó y se lavó con agua y salmuera, se secó con Na₂SO₄, se filtró, y a continuación se concentró a vacío proporcionando el compuesto 9 como un sólido blanco. RMN ¹H (DMSO-d₆; 400 MHz) δ 7,47 (m), δ 7,42 (m), δ 7,34 (m), δ 7,28 (m), δ 7,16 (m), δ 6,94 (m), δ 5,08 (s), δ 4,45 (t), δ 3,64 (d), δ 1,28 (s), δ 1,25 (s).

Procedimiento para la preparación de 2-(2-(hidroxi)-5-terc-butilfenil)-2-metilpropan-1-ol (10)



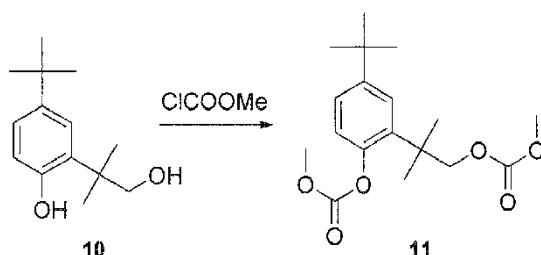
Se agitaron Pd(OH)₂ (1 g) y el compuesto 9 (9,26 g, 0,030 moles) en MeOH (200 ml) bajo hidrógeno a 20-30 psi de presión durante 16-18 horas. A continuación, la mezcla se filtró a través de Celite® y el filtrado se concentró dando el compuesto 10 como un sólido blanco. RMN ¹H (DMSO-d₆; 400 MHz) δ 9,16 (s), δ 7,16 (d), δ 7,00 (m), δ 6,65 (m), δ 4,71 (t), δ 3,62 (d), δ 1,27 (s), δ 1,22 (s).

Procedimiento para la preparación de 1-((metilcarboxi)oxi)-2-(1-((metilcarboxi)oxi)-2-metilpropan-2-il)-4-terc-

butil-benceno (11)

5

10



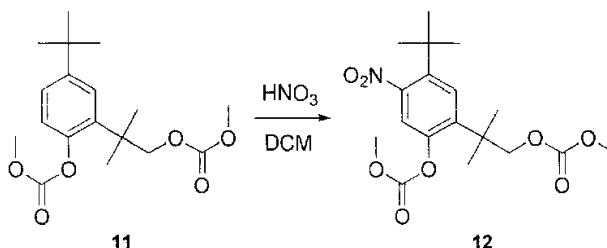
15

A una disolución con agitación del compuesto **10** (23,2 g, 0,10 moles), DMAP (1,44 g) y DIEA (72,8 g, 0,56 moles) en DCM anhidro (720 ml) se añadió gota a gota cloroformiato de metilo (43,5 g, 0,46 moles) en DCM (160 ml) a 0 °C. Después de agitar la mezcla a 20 °C durante 16 horas, se lavó con agua, HCl 1 N y salmuera, se secó con MgSO₄ y se concentró a vacío. El residuo se purificó usando cromatografía en columna sobre gel de sílice (1:20 de EtOAc:éter de petróleo) dando el compuesto **11** como un sólido blanco. RMN ¹H (DMSO-d₆; 400 MHz) δ 7,32 (m), δ 7,10 (d), δ 4,26 (s), δ 3,84 (s), δ 3,64 (s), δ 1,31 (s), δ 1,28 (s).

20

Procedimiento for preparación de 1-((metilcarboxi)oxi)-2-(1-((metilcarboxi)oxi)-2-meihilpropan-2-il)-4-terc-butil-5-nitrobenceno (12)

25



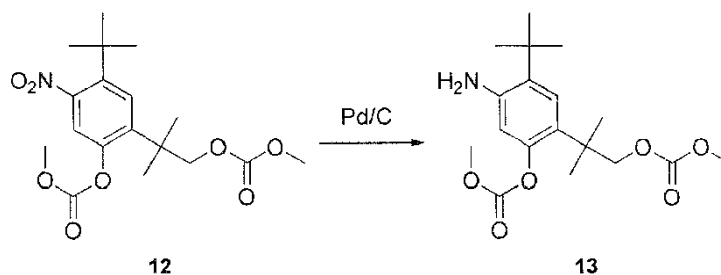
30

A una disolución con agitación del compuesto **11** (32 g, 0,095 moles) en DCM (550 ml) se añadió gota a gota 98 % de H₂SO₄ (43 g, 0,43 moles) a 0 °C. Después de agitar durante 20 minutos a 0 °C, se añadió 65 % de HNO₃ (16,2 g, 0,17 moles) a la mezcla gota a gota a 0 °C. A continuación, la mezcla se agitó a 1-10 °C durante 4 horas y a continuación se añadió agua con hielo (200 ml). La fase acuosa se separó y se extrajo con DCM (200 ml × 3) y las fases orgánicas combinadas se lavaron con agua (ac), NaHCO₃ y salmuera, a continuación se secaron con MgSO₄ y se concentraron a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (1:20 de EtOAc:éter de petróleo) proporcionando el compuesto en bruto **12** como un aceite.

35

Procedimiento para la preparación de 2-terc-butil-5-((metilcarboxi)oxi)-4-(1-((metilcarboxi)oxi)-2-metilpropan-2-il)anilina (13)

40



50

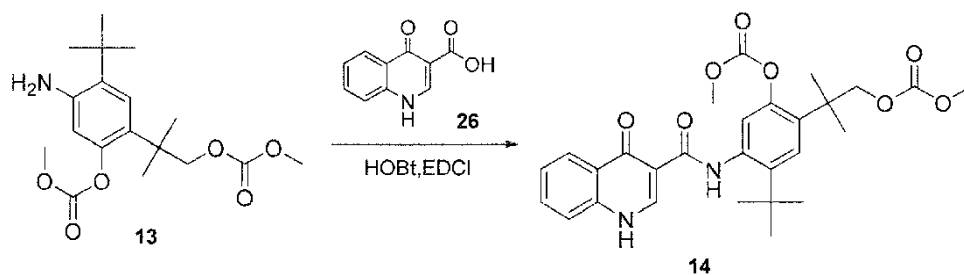
Se agitaron Pd/C (2,6 g) y el compuesto **12** (14 g, en bruto) en MeOH (420 ml) a temperatura ambiente bajo hidrógeno a 20-30 psi de presión durante 16-18 horas. A continuación, la mezcla se filtró con kieselguhr®, y el filtrado se concentró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (1:10 de EtOAc:éter de petróleo) dando el compuesto **13** como un sólido gris. RMN ¹H (CDCl₃; 400 MHz) δ 7,26 (s), δ 7,19 (s), δ 4,26 (s), δ 3,89 (s), δ 3,74 (s), δ 1,40 (s), δ 1,35 (s).

55

Procedimiento para la preparación de N-(2-terc-butil-5-((metilcarboxi)oxi)-4-(1-((metilcarboxi)oxi)-2-metilpropan-2-il)fenil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxamida (14)

60

65

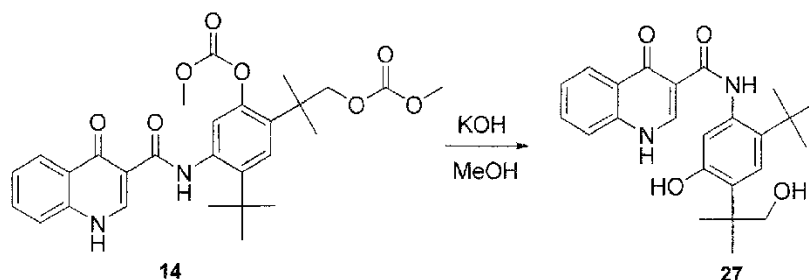


15 A una disolución con agitación del compuesto **26** (5,0 g, 0,026 moles) en DMF anhidra (120 ml) se añadió EDCI (5,6 g, 0,029 moles), HOBT (3,8 g, 0,028 moles) y DIEA (6,6 g, 0,051 moles) a 0 °C. Después de agitar durante 1 hora, la mezcla se añadió gota a gota una disolución del compuesto **13** (3,0 g, 0,008 moles) en DCM (30 ml) a 0 °C. La mezcla se agitó a 25 °C durante 72 horas, y a continuación se concentró a vacío. El residuo se disolvió en EtOAc (225 ml) y se lavó con agua (120 ml × 1), HCl 1 N (120 ml) y salmuera, se secó con Na₂SO₄ y se concentró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (1:1 de EtOAc:éter de petróleo) dando el compuesto **14** como un sólido blanco. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 12,34 (s, 1H), 11,58 (s, 1H), 9,07 (s, 1H), 8,42 (d, 1H), 7,66 (s, 1H), 7,51 (s, 1H), 7,47 (s, 1H), 7,39 (s, 1H), 6,72 (s, 1H), 4,34 (s, 2H), 3,82 (s, 3H), 3,74 (s, 3H), 1,41 (s, 9H), 1,40 (s, 6H).

20

Procedimiento para la preparación de N-(2-terc-butil-5-hidroxi-4-(1-hidroxi-2-metilpropan-2-il)fenil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxamida (27)

25



40 A una disolución con agitación de KOH (1,2 g, 0,02 moles) en MeOH (80 ml) se añadió el compuesto **14** (1,9 g, 0,0036 moles) a 0 °C. Después de agitar durante 2-3 horas a 5-15 °C, la mezcla se concentró a sequedad. A continuación, el residuo se trituró en agua (10 ml), se filtró, se lavó con DCM y se secó a vacío durante 24 horas dando el compuesto **27** como un sólido blanco. RMN ¹H (DMSO-d₆; 400 MHz) δ 12,77 (s), δ 8,86 (s), δ 8,20 (d), δ 7,55 (d), δ 7,42 (t), δ 7,16 (q), δ 7,02 (s), δ 6,85 (m), δ 3,55 (s), δ 1,55 (s), δ 1,35 (s), δ 1,27 (s). EM hallada (M + H) 409,2.

45

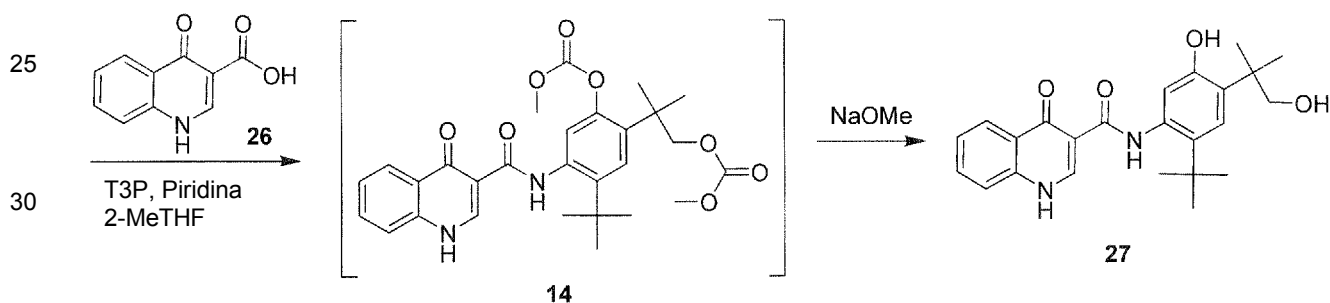
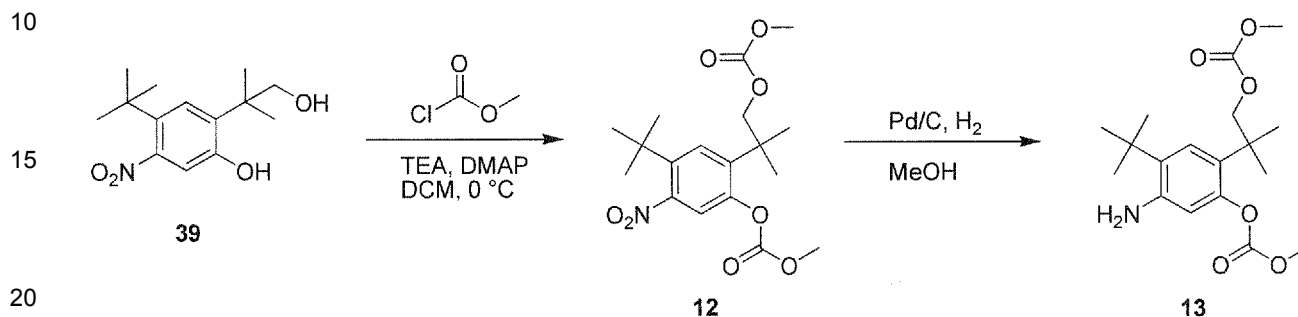
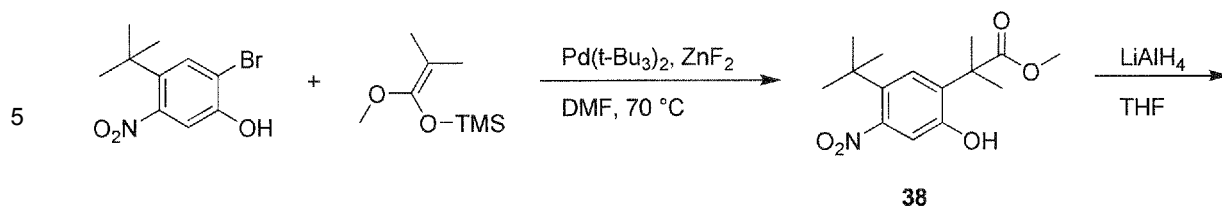
Ejemplo 2: Síntesis total alternativa de N-(2-terc-butil-5-hidroxi-4-(1-hidroxi-2-metilpropan-2-il)fenil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxamida (27)

50

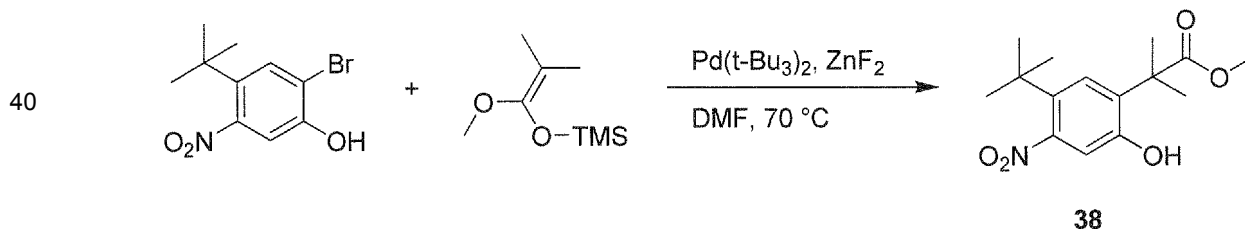
55

60

65

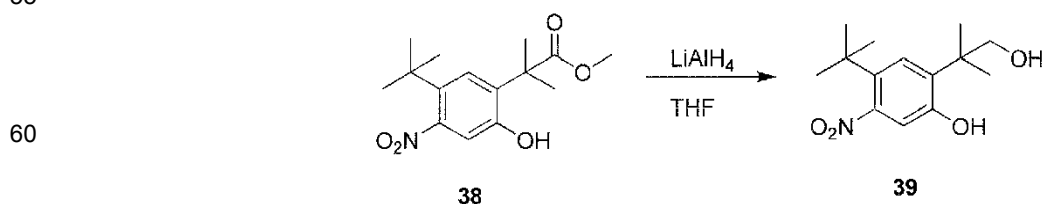


35 **Procedimiento para la preparación de 2-(5-*tert*-butil-2-hidroxi-4-nitrofenil)-2-metilpropanoato de metilo (38):**



45 Una mezcla de 2-bromo-4-*tert*-butil-5-nitrofenol (15,00 g, 54,72 mmoles), bis(tri-*tert*-butilfosfina)paladio (0) (1,422 g, 2,783 mmoles), fluoruro de cinc (2,82 g, 27,27 mmoles), metiltrimetilsilildimetilcetenaoacetal (MTDA) (19,35 g, 111,0 mmoles) y dimetilformamida (150 ml) se calentó a 70 °C durante 18 h. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se diluyó con agua. Después de agitar durante una hora, la fase acuosa se extrajo con MTBE. La fase orgánica se secó a vacío proporcionando el producto en bruto como un sólido marrón. La purificación del producto se llevó a cabo por trituración en *n*-heptano. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 10,38 (s, 1H); 7,37 (s, 1H); 6,79 (s, 1H); 3,54 (s, 3H); 1,45 (s, 6H); 1,32 (s, 9H).

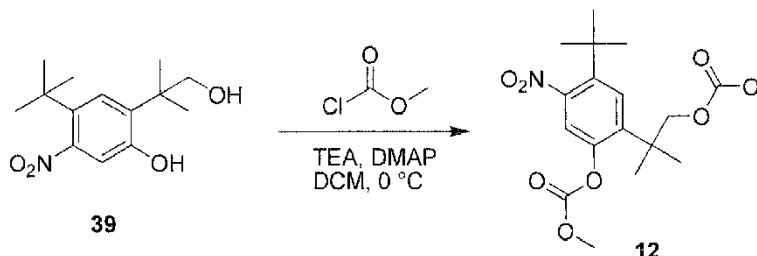
55 **Procedimiento para la preparación de 4-*tert*-butil-2-(1-hidroxi-2-metilpropan-2-il)-5-nitrofenol (39):**



65 Se añadió una disolución 1 M de hidruro de litio y aluminio en THF (11,80 ml, 11,80 mmoles) a una disolución de 2-(5-*tert*-butil-2-hidroxi-4-nitrofenil)-2-metilpropanoato de metilo (5,36 g, 18,15 mmoles) en THF (50

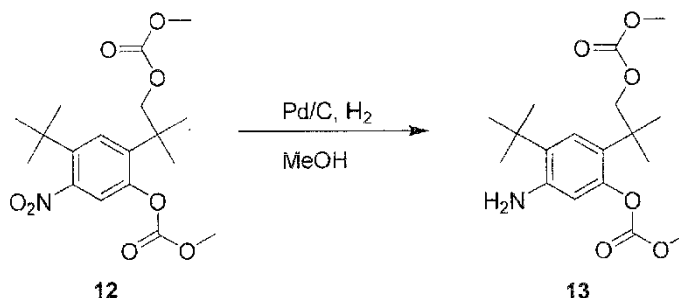
ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 h, y a continuación se diluyó con metanol. La mezcla se acidificó con HCl 1 N (pH 1-2) y la fase acuosa se extrajo con MTBE. La fase orgánica se secó a vacío proporcionando 4-*tert*-butil-2-(1-hidroxi-2-metilpropan-2-il)-5-nitrofenol, que se usó sin más purificación en la siguiente etapa. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,12 (s, 1H); 7,37 (s, 1H); 6,80 (s, 1H); 4,77 (s, 1H); 3,69-3,65 (m, 2H); 1,30 (s, 9H); 1,29 (s, 6H).

Procedimiento para la preparación de carbonato de 4-*tert*-butil-2-(2-metoxicarboniloxi-1,1-dimetil-etil)-5-nitro-fenil]metilo (12)



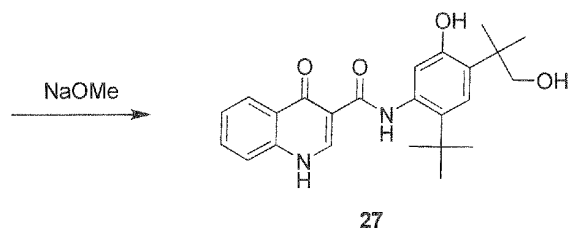
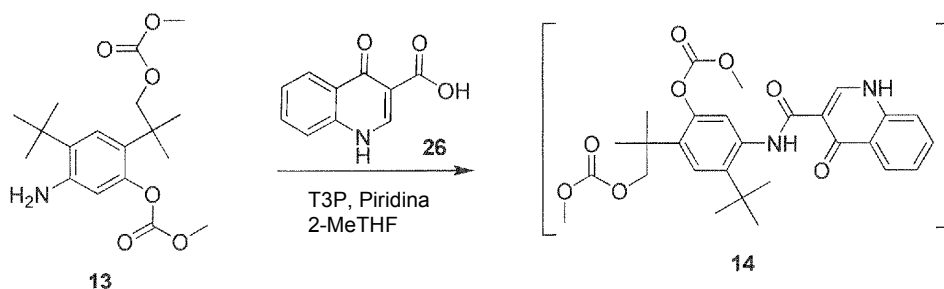
A una disolución de 4-*tert*-butil-2-(1-hidroxi-2-metilpropan-2-il)-5-nitrofenol (1,92 g, 7,18 mmoles), trietilamina (1,745 g, 17,24 mmoles) y dimetilaminopiridina (87,74 mg, 0,718 mmoles) en diclorometano (30 ml) a 0 °C se cargó lentamente cloroformiato de metilo (2,376 g, 25,14 mmoles), manteniéndose la temperatura por debajo de 5 °C. Después de la adición, la mezcla se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó hasta que la HPLC mostró la conversión completa del material de partida (2-8 h). La mezcla de reacción se diluyó con agua y se acidificó con HCl 1 N (pH 1-2). La fase acuosa se extrajo con DCM y los extractos orgánicos combinados se secaron a vacío. El semisólido ámbar en bruto se recrystalizó en metanol y diclorometano dando el compuesto del título como un sólido cristalino amarillo. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,67 (s, 1H); 7,52 (s, 1H); 4,30 (s, 2H); 3,86 (s, 3H); 3,64 (s, 3H); 1,35 (s, 9H); 1,35 (s, 6H).

Procedimiento para la preparación de carbonato de 5-amino-4-*tert*-butil-2-(2-metoxicarboniloxi-1,1-dimetil-etil)fenil]metilo (13):



Se purgó una mezcla de carbonato de [4-*tert*-butil-2-(2-metoxicarboniloxi-1,1-dimetil-etil)-5-nitro-fenil]metilo (1,27 g, 3,313 mmoles) y Pd/C (75 mg, 0,035 mmoles) en metanol (50 ml) con nitrógeno. Después de purgar el matraz con hidrógeno, la mezcla se hidrogenó durante 18 horas a temperatura y presión ambiente. La disolución se filtró a través de Celite® y se secó a vacío para obtener el producto como un sólido. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 6,99 (s, 1H); 6,39 (s, 1H); 4,92(s, 2H); 4,13 (s, 2H); 3,82 (s, 3H); 3,65 (s, 3H); 1,32 (s, 9H); 1,23 (s, 6H).

Procedimiento para la preparación de N-(2-*tert*-butil-5-hidroxi-4-(1-hidroxi-2-metilpropan-2-il)fenil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxamida (27):



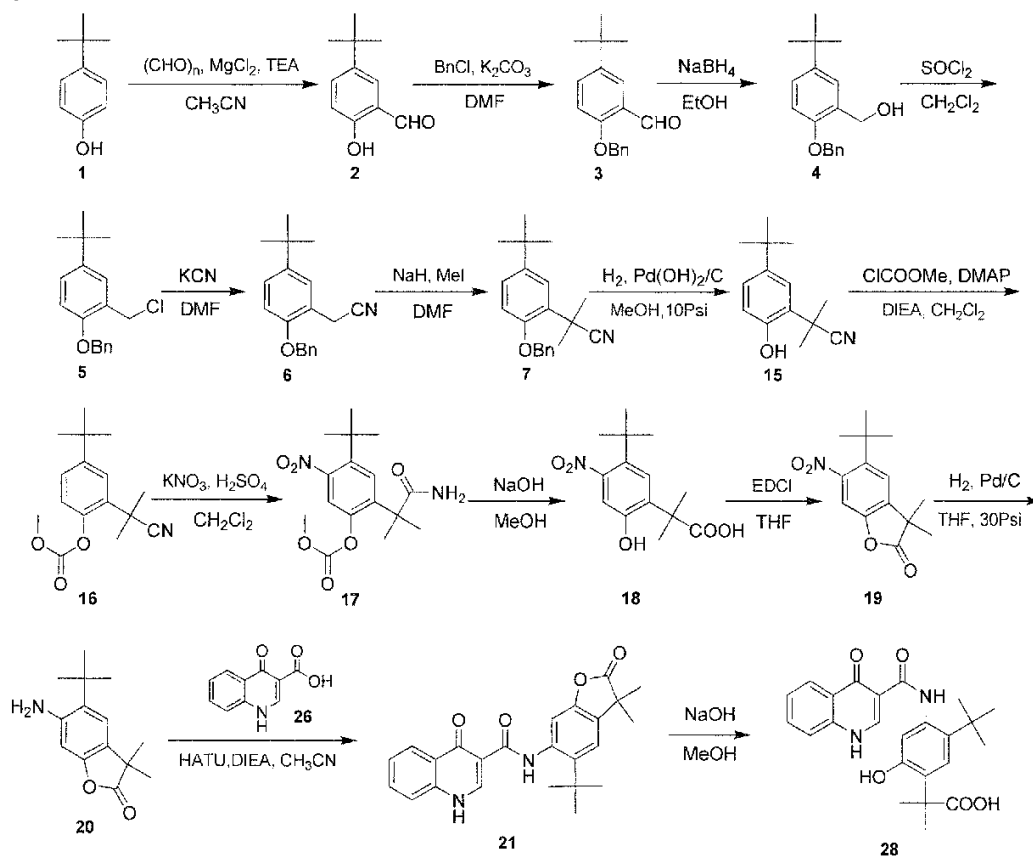
25

30

A una mezcla de carbonato de [5-amino-4-*terc*-butil-2-(2-metoxicarboniloxi-1,1-dimetiletil)fenil]metilo (103 mg, 0,29 mmoles), ácido 4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico (50 mg, 0,26 mmoles) y piridina (42 mg, 0,53 mmoles) en 2-MeTHF (3,0 ml) se cargó T3P como una disolución al 50 % en peso en 2-MeTHF (286 mg, 0,45 mmoles). La mezcla se calentó a 50 °C durante 18 h. Después de enfriarse a temperatura ambiente, la mezcla se diluyó con agua. La fase orgánica se separó y se lavó de nuevo con agua. Se cargó metóxido de sodio (39 mg, 0,72 mmoles) a la fase orgánica y la disolución se agitó durante 2 horas. La reacción se inactivó con HCl 1 N, y después de separar las fases, la fase orgánica se lavó con HCl 0,1 N. La fase orgánica se secó entonces a vacío, dando el compuesto **27** como un sólido. El espectro de RMN ¹H estuvo de acuerdo con el informado anteriormente.

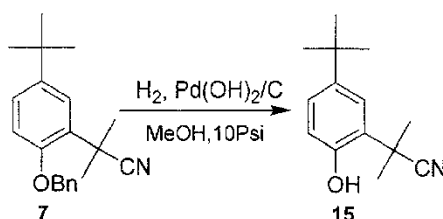
35

Ejemplo 3: Síntesis total de ácido 2-(5-*terc*-butil-2-hidroxi-4-(4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxamido)fenil)-2-metilpropanonitrilo (28):



Procedimiento para la preparación de 2-(5-*terc*-butil-2-hidroxi-4-(4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxamido)fenil)-2-metilpropanonitrilo (15)

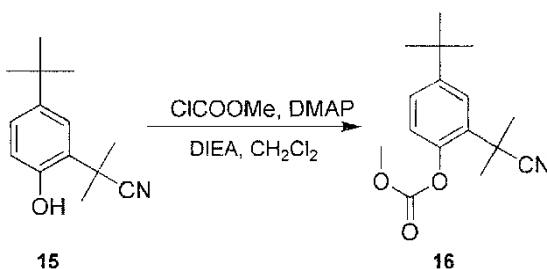
5



10 Se agitaron Pd (OH)₂/C (2,0 g) y el compuesto **7** (20,0 g, 0,104 moles) en MeOH (150 ml) a temperatura ambiente bajo hidrógeno a 10 psi de presión durante 16-18 horas. A continuación, la mezcla se filtró a través de una almohadilla de Celite®, y el filtrado se concentró dando el compuesto **15**, que se usó en la siguiente reacción sin más purificación. RMN ¹H (DMSO-d₆; 400 MHz) δ 9,83 (s), δ 7,24 (s), δ 7,18 (m), δ 6,80 (m), δ 1,71 1 (s), δ 1,24 (s).

15 **Procedimiento para la preparación de carbonato de 4-terc-butil-2-(2-cianopropan-2-il)fenilmetilo (16)**

20

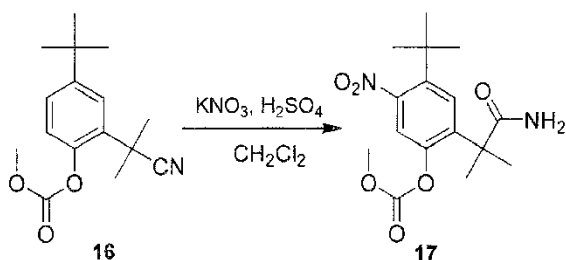


25

30 A una mezcla con agitación del compuesto **15** (126,6 g, 0,564 moles), DMAP (6,0 g) y DIEA (188 g, 1,46 moles) en DCM anhidro (1500 ml) se añadió gota a gota cloroformiato de metilo (110 g, 1,17 moles) en DCM anhidro (300 ml) a 0 °C dentro de 2 horas. Después de agitar durante 12 horas a 0 °C, se añadió agua con hielo (1,5 l) y la mezcla se agitó a 0 °C durante 30 minutos. La fase orgánica se separó y se lavó con HCl 1 N, agua y salmuera. La disolución de DCM se secó sobre MgSO₄ y se concentró a vacío dando el compuesto **16** como un sólido amarillo. RMN ¹H (DMSO-d₆; 400 MHz) δ 7,47 (m), δ 7,39 (d), δ 7,24 (d), δ 3,84 (s), δ 1,71 (s), δ 1,30 (s).

35 **Procedimiento para la preparación de carbonato de 2-(1-amino-2-metil-1-oxopropan-2-il)-4-terc-butil-5-nitrofenilmetilo (17)**

40



45

50 A una mezcla con agitación del compuesto **16** (10,0 g, 36,3 mmoles) y KNO₃ (5,51 g, 54,5 mmoles) en DCM (1000 ml) se añadió gota a gota 98 % de H₂SO₄ (145,4 g, 1,45 moles) a 0 °C. La mezcla se agitó a 30 °C durante 4 días. A continuación se separó la capa de H₂SO₄ y se vertió en agua con hielo (50 g) y a continuación se extrajo con DCM (100 ml × 3). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con agua, disolución acuosa de NaHCO₃ y salmuera, a continuación se secaron sobre MgSO₄ y se concentraron a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (éter de petróleo/EtOAc 20:1→10:1→5:1→3:1) dando el compuesto **17** como un sólido amarillo. RMN ¹H (CDCl₃; 400 MHz) δ 8,05 (s), δ 7,74 (s), δ 7,61 (s), δ 7,32 (s), δ 5,32 (s), δ 3,91 (s), δ 3,92 (s), δ 1,62 (s), δ 1,59 (s), δ 1,42 (s), δ 1,38 (s).

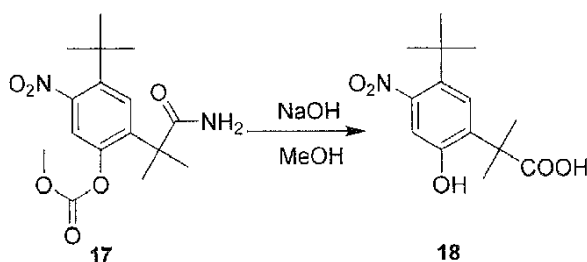
55

Procedimiento para la preparación de ácido 2-(5-terc-butil-2-hidroxi-4-nitrofenil)-1-metilpropanoico (18)

60

65

5



10

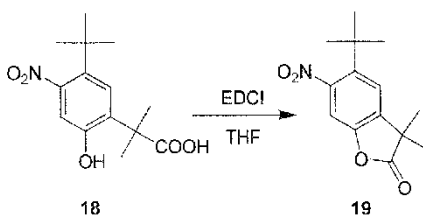
15

A una mezcla del compuesto **17** (7,3 g, 21,6 mmoles) en metanol (180 ml) se añadió agua (18 ml) y NaOH (8,64 g, 216 mmoles). La disolución se calentó y se mantuvo a reflujo durante 3 días. El disolvente se evaporó a vacío y el residuo se disolvió en 140 ml de agua. A continuación, la disolución se acidificó a pH 2 mediante la adición de HCl 2 N. La fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (100 ml \times 3), y las fases orgánicas combinadas se lavaron con agua y salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y a continuación se concentraron dando el compuesto **18** como un sólido amarillo, que se usó en la siguiente reacción sin más purificación.

Procedimiento para la preparación de 5-tert-butil-3,3-dimetil-6-nitrobenzofuran-2(3H)-ona (19)

20

25



30

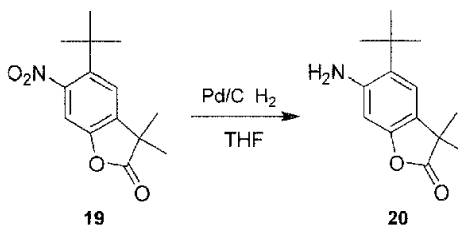
35

A una disolución del compuesto **18** (7,10 g, 25,2 mmoles) en 710 ml de THF anhidro se añadió EDCI (14,5 g, 75,6 mmoles). La suspensión resultante se dejó con agitación a 30 °C durante la noche. El precipitado se filtró y se lavó minuciosamente con DCM. El filtrado se concentró a sequedad y el residuo se disolvió en DCM (100 ml). La disolución se lavó con agua (50 ml \times 2) y salmuera (50 ml \times 1). A continuación, la fase de DCM se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentró dando el producto en bruto, que se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (éter de petróleo/EtOAc 200:1 \rightarrow 100:1 \rightarrow 50:1) dando el compuesto **19** como un sólido blanco. RMN ¹H (CDCl₃; 400 MHz) δ 7,36 (s), δ 7,10 (s), δ 1,53 (s), δ 1,41 (s).

Procedimiento para la preparación de 6-amino-5-tert-butil-3,3-dimetilbenzofuran-2(3H)-ona (20)

40

45



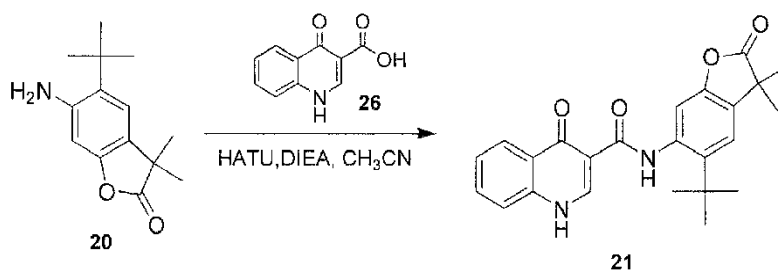
50

Se suspendieron Pd/C (1,50 g) y el compuesto **19** (3,00 g, 1,14 mmoles) en THF (1500 ml) a 25 °C bajo hidrógeno a 30 psi durante 4 horas. A continuación, la mezcla se filtró a través de una almohadilla de Celite®, y el filtrado se concentró a vacío dando el compuesto **20** como un sólido blanco. RMN ¹H (DMSO-d₆; 400 MHz) δ 7,05 (s), δ 6,49 (s), δ 5,01 (s), δ 1,35 (s), δ 1,33 (s).

Procedimiento para la preparación de N-(5-tert-butil-3,3-dimetil-2-oxo-2,3-dihydrobenzofuran-6-il)-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxamida (21)

55

60

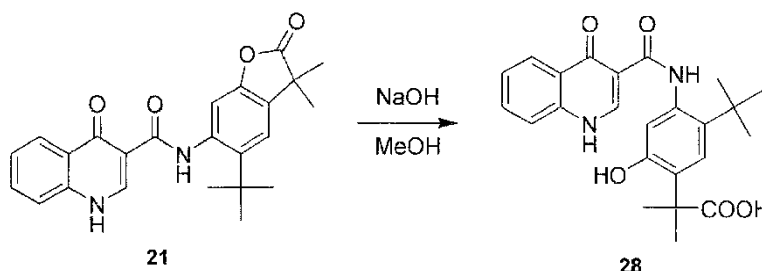


65

Se agitó una suspensión de HATU (17,6 g, 46,3 moles) y el compuesto **26** (8,36 g, 44,2 mmoles) en acetonitrilo anhidro (1 l) a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadió el compuesto **20** (3,40 g, 14,6 mmoles) a

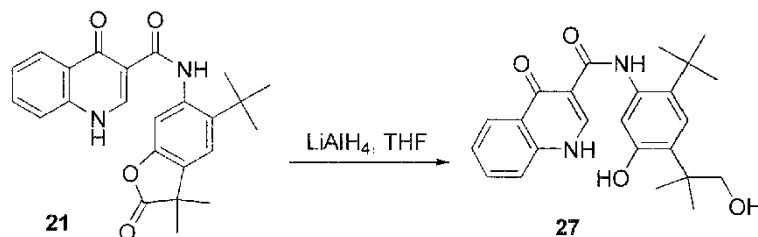
la suspensión, y a continuación se añadió DIEA (11,5 g, 89,0 mmoles) gota a gota. La mezcla se agitó a 45 °C durante 4 días. El precipitado resultante se filtró y se lavó minuciosamente con DCM. El filtrado se concentró a sequedad y el residuo se disolvió en DCM (200 ml) y se lavó con HCl 1 N (200 ml × 2), seguido de 5 % de NaHCO₃ acuoso (200 ml × 3) y a continuación salmuera (200 ml × 1). A continuación, la mezcla se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (CH₂Cl₂/MeOH 100:1→50:1) dando el compuesto **21** como un sólido amarillo claro. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12,96 (d, J 6,4 Hz, 1H); 12,1 (s, 1H); 8,9 (d, J 6,4 Hz, 1H); 8,33 (d, J 8Hz, 1H); 7,84-7,75 (m, 2H); 7,55-7,48 (m, 3H); 1,47 (s, 6H); 1,45 (s, 9H).

Procedimiento para la preparación de ácido 2-(5-*terc*-butil-2-hidroxi-4-(4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxamido)fenil)-2-metilpropanoico (28)



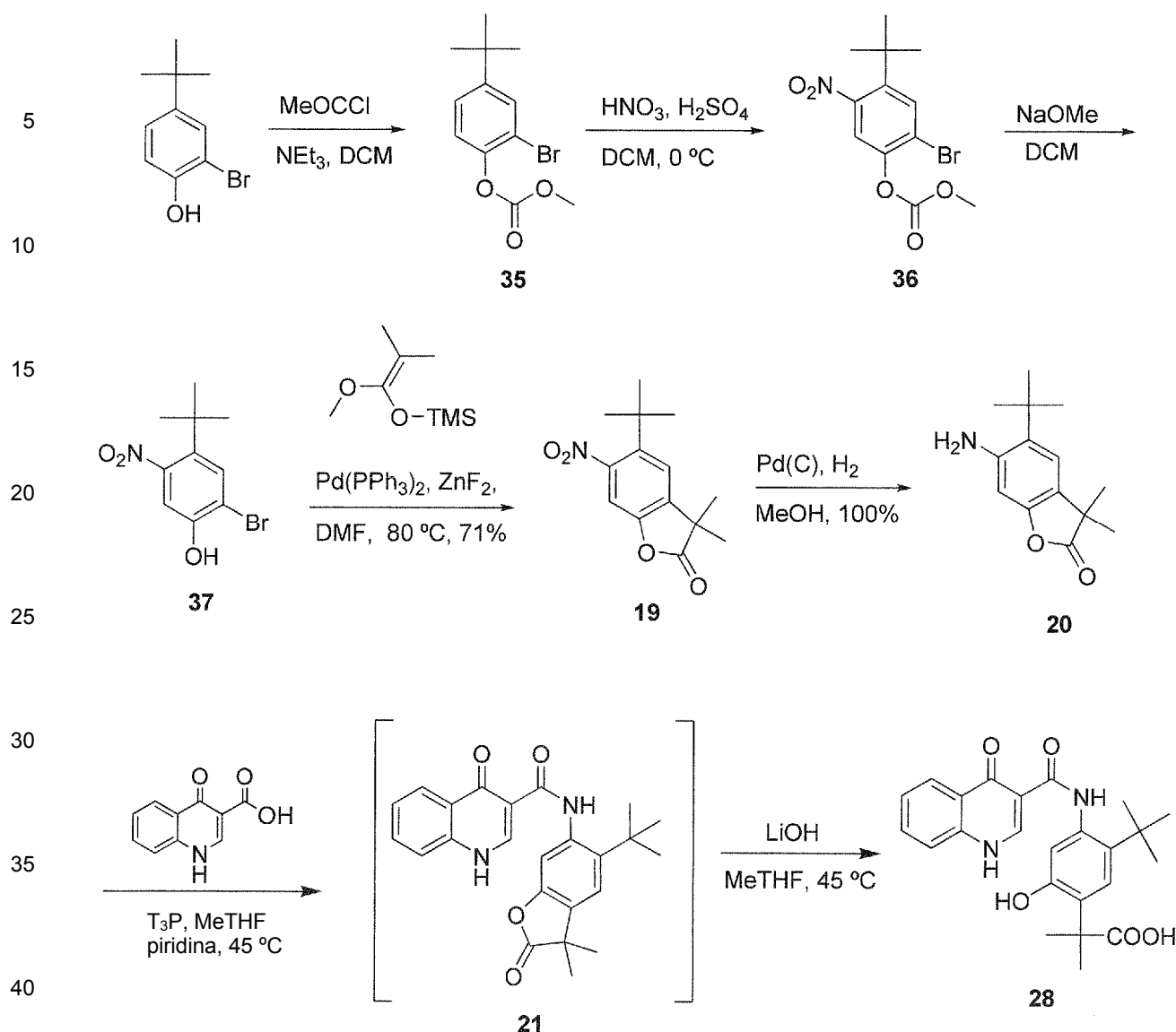
A una disolución con agitación del compuesto **21** (0,9 g, 2,45 mmoles) en MeOH (50 ml) se añadió NaOH (1,5 g, 37,5 mmoles) a 0 °C. Después de agitar durante 16 horas a 40 °C, el disolvente se evaporó a vacío, a continuación el residuo se disolvió en H₂O (50 ml). El precipitado se filtró y el filtrado se lavó con DCM (100 ml × 1) y acetato de etilo (100 ml × 1). La fase acuosa se acidificó con HCl 2 N a pH 1-2. El precipitado se filtró y se lavó con H₂O (80 ml) y heptano (50 ml). Se secó a vacío dando el compuesto **28** como un sólido blanco. RMN ¹H (DMSO-*d*₆; 400 MHz) δ 12,85 (s), δ 11,84 (s), δ 11,77 (s), δ 9,39 (s), δ 8,86 (s), δ 8,33 (s), δ 7,79 (m), δ 7,52 (m), δ 7,18 (s), δ 7,09 (s), δ 1,44 (s), δ 1,40 (s). EM hallada (M + H) 423,08.

Ejemplo 4: Segunda síntesis alternativa de N-(2-*terc*-butil-5-hidroxi-4-(1-hidroxi-2-metilpropan-2-il)fenil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxamida (27)

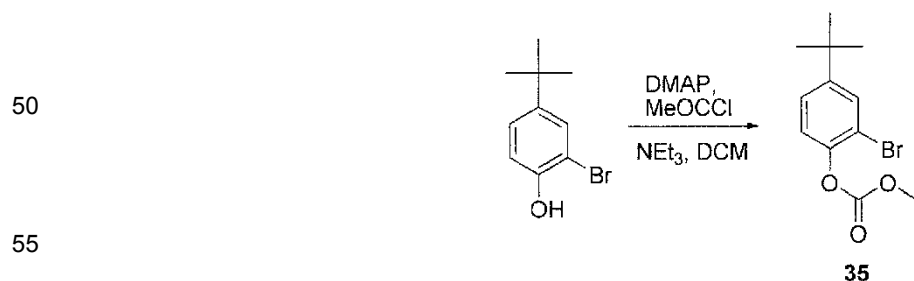


Un matraz redondo de 50 ml de 3 bocas se equipó con agitador magnético, burbujeador de nitrógeno y termopar. Se cargan el compuesto **21** (514 mg, 1,27 mmoles) y 2-MeTHF (4 ml) al matraz. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente. Se añadió hidruro de litio y aluminio (204 mg, 6,6 mmoles) como un sólido hasta que se logra el 100 % de conversión, que se monitorizó usando HPLC. Se añadieron sal tetrahidratada de 2,3-dihidroxibutanodioato de potasio y sodio (50 ml de una disolución de 400 g/l) y MTBE (50 ml) a la mezcla de reacción. La disolución resultante se agitó durante 15 minutos y a continuación se dejó posarse durante 15 min. La fase orgánica se separó y el pH de la fase acuosa se ajustó a un pH de aproximadamente 6-7 añadiendo ácido tartárico. La fase acuosa se extrajo con MTBE. La fase orgánica se concentró y se secó bajo alto vacío proporcionando el compuesto del título como un polvo blanquecino. El espectro de RMN ¹H estuvo de acuerdo con el informado anteriormente.

Ejemplo 5: Síntesis total alternativa de ácido 2-(5-*terc*-butil-2-hidroxi-4-(4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxamido)fenil)-2-metilpropanoico (28):



45 **Procedimiento para la preparación de 2-bromuro del ácido carbónico, éster metílico del éster 4-terc-butil-fenílico (35)**



60 Un matraz redondo de 2 l de 3 bocas se equipó con agitador mecánico, burbujeador de nitrógeno y termopar. Se añadió 2-bromo-4-terc-butil-fenol (50 g, 211,7 mmoles) seguido de DCM (1,75L), DMAP (1,29 g, 10,58 mmoles) y Et₃N (44,3 ml, 317,6 mmoles). La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C. Se añadió gota a gota cloroformiato de metilo (19,62 ml, 254 mmoles) a la mezcla de reacción. La mezcla se dejó calentar a temperatura ambiente mientras se agitaba durante la noche. Cuando la reacción se completó, la mezcla se filtró mediante embudo sinterizado. El filtrado se transfirió a un embudo de decantación de 1 l. Para la extinción, se añadió HCl 1 N (300 ml) al filtrado y la fase orgánica se separó. A continuación, la fase orgánica se lavó con una mezcla de 291 ml de NaHCO₃ saturado y 100 ml de agua. Las capas se separaron, y se determinó que la fase acuosa tenía un pH de

65

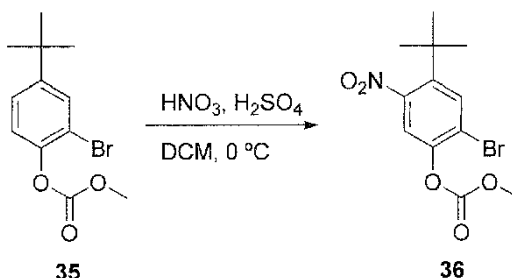
aproximadamente 8. La fase orgánica se concentró y se secó bajo alto vacío durante aproximadamente 16 horas, dando el compuesto del título como un aceite amarillo claro, que se usó en la siguiente etapa sin más purificación. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*6) 7,66 (d, *J* 2,0 Hz, 1H), 7,46 (dd, *J* 8,4, 2,0 Hz, 1H), 7,32 (d, *J* 8,4 Hz, 1H), 3,86 (s, 3H), 1,28 (s, 9H).

5

Procedimiento para la preparación de carbonato de (2-bromo-4-*terc*-butil-5-nitro-fenil)metilo (36)

10

15



20

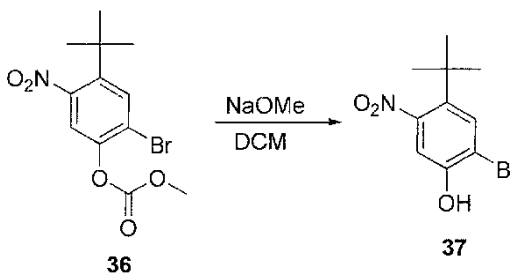
25

Un matraz redondo de 2 l de 3 bocas se equipó con agitador mecánico, burbujeador de nitrógeno y termopar. Se cargaron el compuesto 35 (176 g, 612,9 mmoles) y ácido sulfúrico concentrado (264 ml) al matraz. La mezcla de reacción se enfrió a -5 °C - 0 °C. Se añadió ácido nítrico (28,6 ml, 612,9 mmoles) gota a gota y la mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 2 horas. Cuando se completó se añadió agua (264 ml), seguido de MTBE (264 ml). La disolución se agitó durante 15 minutos, a continuación se dejó reposar durante 15 minutos. La fase orgánica se separó, se concentró y se secó bajo alto vacío dando el compuesto del título como un aceite marrón oscuro, que se usó en la siguiente etapa sin más purificación. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*6) 7,96 (s, 1H), 7,92 (s, 1H), 3,89 (s, 3H), 1,34 (s, 9H).

Procedimiento para la preparación de 2-bromo-4-*terc*-butil-5-nitro-fenol (37)

30

35



40

45

50

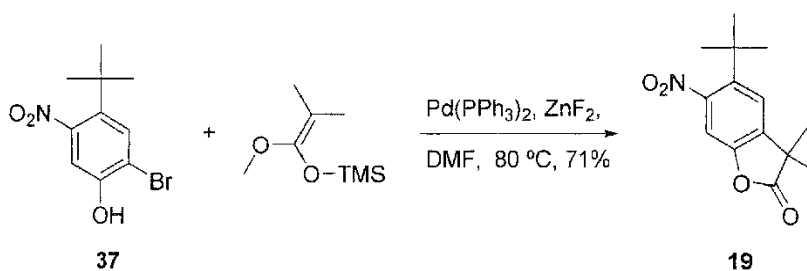
55

Se cargó carbonato de (2-bromo-4-*terc*-butil-5-nitro-fenil)metilo (72,9 g, 219,5 mmoles) a un reactor y se añadió DCM (291,6 ml). La disolución de reacción amarilla se enfrió usando un baño de hielo. Se añadió metóxido de sodio (67,04 g, 69,11 ml de 5,4 M, 373,2 mmoles) en porciones a 2,2 - 6,9 °C. Después de la adición completa, la reacción se calentó lentamente a temperatura ambiente. Cuando se completó, la reacción se enfrió a 0 °C y se extinguió con HCl 1 M (373,2 ml, 373,2 mmoles). La mezcla bifásica se agitó durante 20 min y se transfirió a un embudo de decantación. La fase orgánica se separó y se lavó con agua (300 ml), seguido de salmuera (300 ml). La fase orgánica se concentró y el producto en bruto se secó bajo alto vacío. El producto se purificó adicionalmente usando separación por cromatografía de fluidos supercríticos (SFC) en un Berger MultiGram III (Mettler Toledo AutoChem, Newark DE). Las condiciones del método fueron 20 % de metanol a 250 ml/min en una columna PPU (30*150) de Princeton Chromatography, 100 bar, 35 °C, 220 nm. Se inyectó una inyección de 3,5 ml de una disolución de 55-70 mg/ml. Los datos se recogieron usando el software SFC ProNT. El producto purificado recibido de la purificación por SFC fue un solvato de metanol. Para eliminar el metanol se realizó una destilación azeotrópica. El sólido amarillo oscuro, el solvato de metanol de 2-bromo-4-*terc*-butil-5-nitro-fenol, (111,3 g, 59,9 mmoles) se cargó a un matraz redondo de 1 l, seguido de heptano (500 ml). La suspensión se calentó a 64 °C para obtener una disolución transparente. El disolvente se destiló a presión reducida (649 mbar) durante 30 minutos y a continuación se arrastró a sequedad. Este procedimiento se repitió tres veces hasta que no se detectó MeOH por RMN ¹H. El producto se secó bajo alto vacío durante 16 horas dando el producto como un semisólido amarillo oscuro. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*6) δ 11,2 (s a, OH), 7,69 (s, 1H); 7,03 (s, 1H); 1,30 (s, 9H).

60

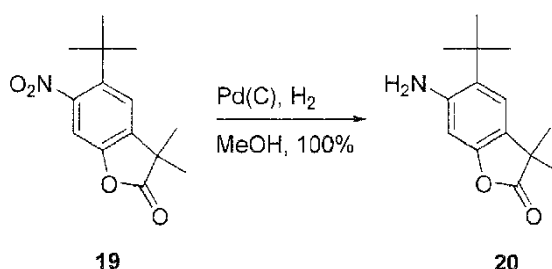
Procedimiento para la preparación de 5-*terc*-butil-3,3-dimetil-6-nitrobenzofuran-2(3H)-ona (19)

65



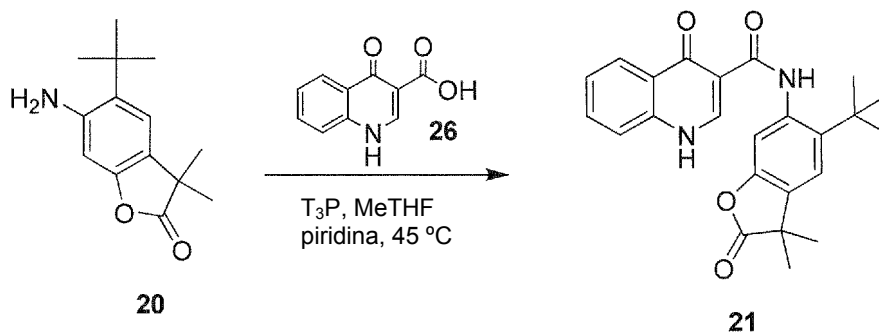
15 Se añadió difluorocinc (6,093 g, 58,92 mmoles) a un matraz redondo, que se lavó con nitrógeno. A continuación se añadió Pd(*t*Bu₃P)₂ (2 g, 3,835 mmoles) bajo corriente de nitrógeno. A continuación se añadió 2-bromo-4-*tert*-butil-5-nitro-fenol (16,15 g, 58,92 mmoles) disuelto en DMF (80,75 ml) al matraz. La mezcla de reacción fue una suspensión naranja. Se añadió (1-metoxi-2-metil-prop-1-enoxi)trimetilsilano (21,61 g, 25,13 ml, 117,8 mmoles) a la mezcla y la mezcla resultante se calentó a 80 °C y se agitó durante 16 h. Cuando se completó, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se filtró a través de Celite®. La torta de filtración se lavó con MTBE (536,0 ml) y se añadió agua (893,3 ml) al filtrado. La mezcla se agitó durante 15 min y sedimentó durante otros 15 min. Las capas se separaron y se añadió HCl 0,5 M (500 ml, 250,0 mmoles) a la fase orgánica. Las capas se separaron y la fase orgánica se lavó con agua (500 ml). Las capas se separaron y la fase orgánica se lavó con NaCl (500 ml; 8 % en peso). La fase orgánica se separó y el disolvente se eliminó a vacío. El producto en bruto se obtuvo como un sólido cristalino marrón y a continuación se purificó a través de un tapón de sílice, usando hexano:MTBE 20:1 -10:1 como eluyente. Las fracciones que contenían producto se combinaron y el disolvente se eliminó a vacío dando el producto puro como un sólido cristalino blanco. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,80 (s, 1H); 7,62 (s, 1H); 1,49 (s, 6H); 1,34 (s, 9H).

25 **Procedimiento para la preparación de 6-amino-5-*tert*-butil-3,3-dimetilbenzofuran-2(3H)-ona (20)**



40 Se dispuso paladio sobre carbono (húmedo; 5 % en peso) en un matraz redondo bajo flujo de nitrógeno. A continuación se añadió 5-*tert*-butil-3,3-dimetil-6-nitro-benzofuran-2-ona (4,7 g, 17,85 mmoles) al recipiente. A continuación se cargó cuidadosamente metanol (120 ml) al recipiente bajo atmósfera de nitrógeno. A continuación, el recipiente se purgó con N₂, se evacuó, a continuación se cargó con gas hidrógeno. El recipiente se evacuó y se volvió a cargar con gas hidrógeno, y a continuación se introdujo una corriente continua de gas hidrógeno. Después de completarse, la reacción se filtró a través de Celite® y la torta se lavó con MeOH (300 ml). El disolvente se eliminó a vacío y el producto se secó bajo alto vacío dando un sólido cristalino blanco. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,05 (s, 1H); 6,48 (s, 1H); 5,02 (s, 2H, NH₂); 1,34 (s, 6H); 1,30 (s, 9H).

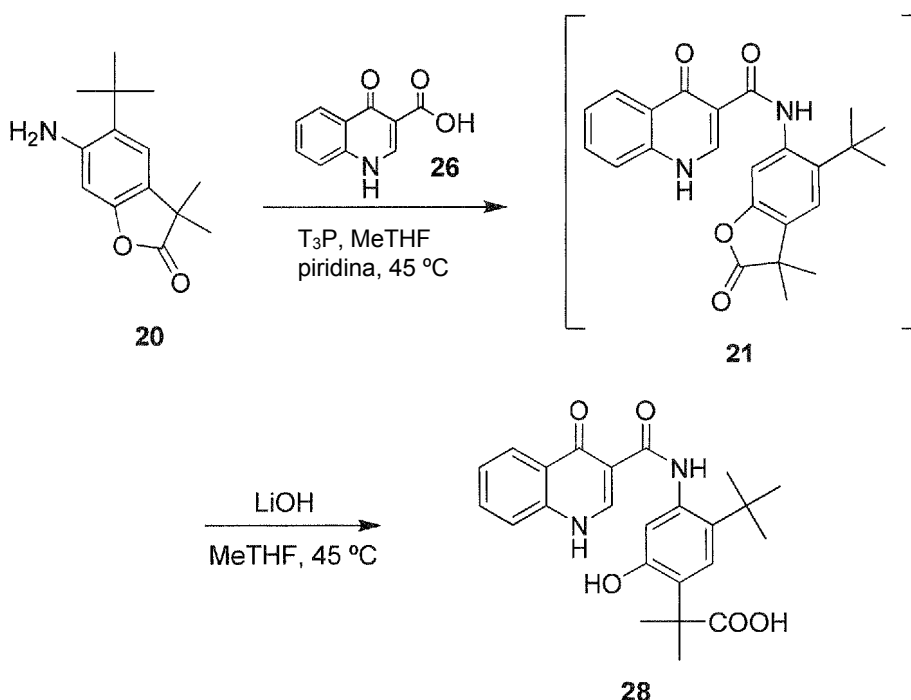
45 **Procedimiento para la preparación de N-(5-*tert*-butil-3,3-dimetil-2-oxo-2,3-dihydrobenzofuran-6-il)-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxamida (21)**



65 Se cargó un recipiente de reacción con el compuesto **26** (2,926 g, 15,43 mmoles), el compuesto **20** (4,32 g,

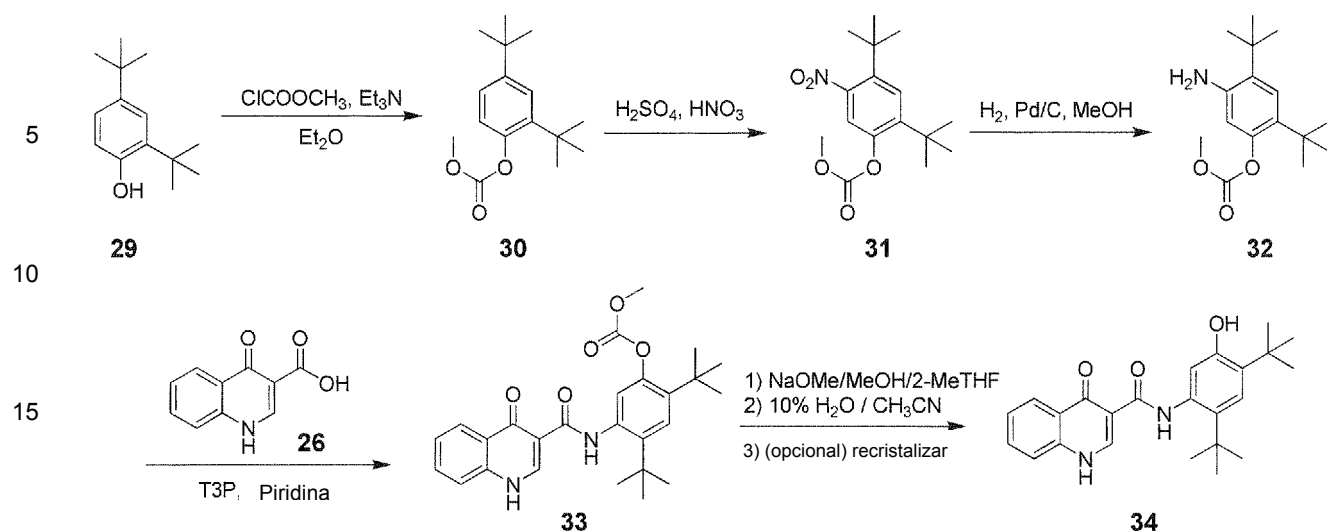
18,52 mmoles), 2-MeTHF (35,99 ml), y posteriormente 50 % de T₃P en 2-MeTHF (13,36 g, 21,00 mmoles). Se añadió piridina (2,441 g, 2,496 ml, 30,86 mmoles) y la suspensión se calentó a 47,5 °C ± 5 °C durante 18 h. Después de completarse, la reacción se enfrió a temperatura ambiente y se añadieron 2-MeTHF (36) y agua (30 ml). Las capas se separaron y la fase orgánica se lavó con disolución al 10 % en peso de ácido cítrico (30 ml), agua (30 ml) y dos veces con NaHCO₃ (20 ml). La fase orgánica se lavó con salmuera (50 ml), se separó y el disolvente se eliminó a vacío. El producto en bruto se disolvió en MTBE (100 ml) y se añadió hexano (200 ml) como antidisolvente. Precipitó un sólido y la suspensión resultante se agitó durante dos horas. El sólido se recogió por filtración con succión y la torta se lavó con hexano. El producto resultante se secó en una estufa de vacío a 55 °C con purga de nitrógeno dando el compuesto del título como un sólido beis. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12,96 (d, J 6,4 Hz, 1H); 12,1 (s, 1H); 8,9 (d, J 6,4 Hz, 1H); 8,33 (d, J 8Hz, 1H); 7,84-7,75 (m, 2H); 7,55-7,48 (m, 3H); 1,47 (s, 6H); 1,45 (s, 9H).

Procedimiento para la preparación de ácido 2-(5-terc-butil-2-hidroxi-4-(4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxamido)fenil)-2-metilpropanoico (28)

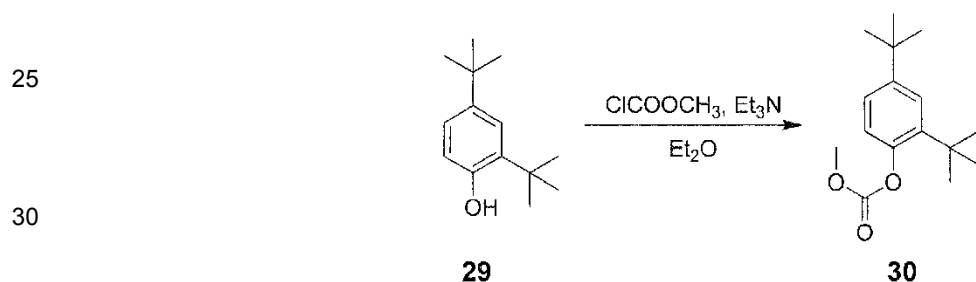


Se cargaron el compuesto **26** (81,30 mg, 0,4288 mmoles) y el compuesto **20** (110 mg, 0,4715 mmoles) a un matraz redondo. A continuación se añadieron 2-MeTHF (1 ml) seguido de 50 % de T₃P en 2-MeTHF (371,4 mg, 0,5836 mmoles) y piridina (67,84 mg, 69,37 µl, 0,8576 mmoles) en 2-MeTHF. La suspensión se calentó a 47,5 °C ± 5 °C durante la noche. Después de completarse, la reacción se enfrió a temperatura ambiente. Se añadieron 2-MeTHF (1,014 ml) y agua (811,2 µl). Las capas se separaron y la fase orgánica se lavó con agua (811,2 µl) y dos veces con NaHCO₃ (2 ml). La fase orgánica se transfirió a un matraz redondo. Se añadió LiOH (38,6 mg, 0,9 mmoles) disuelto en agua (2 ml) y la reacción se calentó a 45 °C. Después de completarse, las capas se separaron y la fase orgánica se desechó. La fase acuosa se enfrió con un baño de hielo y se añadió ácido clorhídrico (10,72 ml de 1,0 M, 10,72 mmoles) a la disolución hasta que el pH alcanzó un pH de aproximadamente 3-4. La fase acuosa se extrajo dos veces con 2-MeTHF (5 ml), y las fases orgánicas se combinaron y se lavaron con salmuera (5 ml). La fase orgánica se separó y el disolvente se eliminó a vacío. El sólido resultante se secó en una estufa de vacío con purga de nitrógeno a 50 °C dando el compuesto del título. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12,89 (d, J 6,8 Hz, 1H); 11,84 (s, 1H); 11,74 (s, 1H); 9,36 (s, 1H); 8,87-8,61 (d, J 6,4 Hz, 1H); 8,34-8,32 (d, J 9,1 Hz, 1H); 7,83-7,745 (m, 2H); 7,17-7,09 (m, 1H); 7,17 (s, 1H); 7,09 (s, 1H); 1,43 (s, 6H); 1,40 (s, 9H).

Ejemplo 6: Síntesis total de N-(2,4-di-terc-butil-5-hidroxi-fenil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxamida (34)



Procedimiento para la preparación de carbonato de 2,4-di-*terc*-butilfenilmetilo (30)



Método 1

35

40

45

A una disolución de 2,4-di-*terc*-butil-fenol, **29**, (10 g, 48,5 mmoles) en éter dietílico (100 ml) y trietilamina (10,1 ml, 72,8 mmoles), se añadió cloroformiato de metilo (7,46 ml, 97 mmoles) gota a gota a 0 °C. A continuación, la mezcla se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 2 horas adicionales. A continuación se añadieron 5 ml adicionales de trietilamina y 3,7 ml de cloroformiato de metilo y la reacción se agitó durante la noche. A continuación, la reacción se filtró, el filtrado se enfrió a 0 °C y entonces se añadieron 5 ml adicionales de trietilamina y 3,7 ml de cloroformiato de metilo y la reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y a continuación se agitó durante 1 hora adicional. En esta etapa, la reacción estaba casi completa y se procesó filtrando, luego lavando con agua (2x), seguido de salmuera. A continuación, la disolución se concentró para producir un aceite amarillo y se purificó usando cromatografía en columna dando el compuesto **30**. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,35 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H), 7,29 (dd, *J* = 8,4, 2,4 Hz, 1H), 7,06 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 3,85 (s, 3H), 1,30 (s, 9H), 1,29 (s, 9H).

Método 2

50

55

60

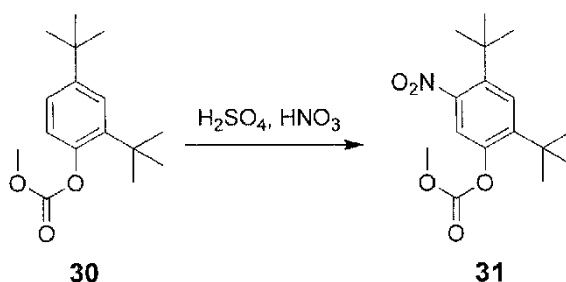
A un recipiente de reactor cargado con 4-dimetilaminopiridina (DMAP, 3,16 g, 25,7 mmoles) y 2,4-di-*terc*-butil-fenol (compuesto **29**, 103,5 g, 501,6 mmoles) se añadió cloruro de metileno (415 g, 313 ml) y la disolución se agitó hasta que se disolvieron todos los sólidos. A continuación se añadió trietilamina (76 g, 751 mmoles) y la disolución se enfrió a 0 - 5 °C. A continuación se añadió cloroformiato de metilo (52 g, 550,3 mmoles) gota a gota durante 2,5 - 4 horas, mientras que se mantenía la temperatura de disolución entre 0 - 5 °C. A continuación, la mezcla de reacción se calentó lentamente a 23 - 28 °C y se agitó durante 20 horas. A continuación, la reacción se enfrió a 10 - 15 °C y se cargó con 150 ml de agua. La mezcla se agitó a 15 - 20 °C durante 35 - 45 minutos y a continuación la fase acuosa se separó y se extrajo con 150 ml de cloruro de metileno. Las fases orgánicas se combinaron y se neutralizaron con 2,5 % de HCl (ac) a una temperatura de 5 - 20 °C dando un pH final de 5 - 6. A continuación, la fase orgánica se lavó con agua y se concentró a vacío a una temperatura por debajo de 20 °C a 150 ml dando el compuesto 30 en cloruro de metileno.

Procedimiento para la preparación de carbonato de 5-nitro-2,4-di-*terc*-butilfenilmetilo (31)

65

5

10

**Método 1**

15

20

A una disolución con agitación del compuesto **30** (6,77 g, 25,6 mmoles) se añadió 6 ml de una mezcla 1:1 de ácido sulfúrico y ácido nítrico a 0 °C gota a gota. La mezcla se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 1 hora. El producto se purificó usando cromatografía de líquidos (ISCO, 120 g, 0-7 % de EtOAc/hexanos, 38 min) produciendo aproximadamente una mezcla 8:1-10:1 de regioisómeros del compuesto **31** como un sólido blanco. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,63 (s, 1H), 7,56 (s, 1H), 3,87 (s, 3H), 1,36 (s, 9H), 1,32 (s, 9H). Tiempo de ret. de HPLC 3,92 min 10-99 % de CH₃CN, serie de 5 min; EM-ESI 310 m/z (MH)⁺.

Método 2

25

30

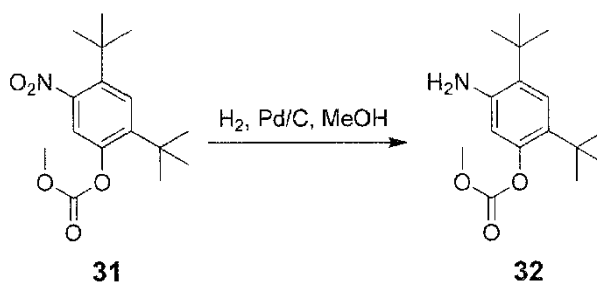
35

Al compuesto **30** (100 g, 378 mmoles) se añadió DCM (540 g, 408 ml). La mezcla se agitó hasta que todos los sólidos se disolvieron, y a continuación se enfrió a -5 - 0 °C. A continuación se añadió ácido sulfúrico concentrado (163 g) gota a gota, mientras que se mantenían la temperatura inicial de la reacción, y la mezcla se agitó durante 4,5 horas. A continuación se añadió ácido nítrico (62 g) gota a gota durante 2-4 horas, mientras que se mantenía la A continuación se añadió ácido de la reacción, y a continuación se agitó a esta temperatura durante 4,5 horas adicionales. A continuación, la mezcla de reacción se añadió lentamente a agua fría, manteniéndose una temperatura por debajo de 5 °C. A continuación, la reacción extinguida se calentó a 25 °C y la fase acuosa se eliminó y se extrajo con cloruro de metileno. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con agua, se secaron usando Na₂SO₄, y se concentraron a 124 - 155 ml. Se añadió hexano (48 g) y la mezcla resultante se concentró de nuevo a 124 - 155 ml. Posteriormente se añadió más hexano (160 g) a la mezcla. A continuación, la mezcla se agitó a 23 - 27 °C durante 15,5 horas, y a continuación se filtró. A la torta de filtración se añadió hexano (115 g), la mezcla resultante se calentó a reflujo y se agitó durante 2 - 2,5 horas. A continuación, la mezcla se enfrió a 3 - 7 °C, se agitó durante 1 - 1,5 horas adicionales y se filtró, dando el compuesto **31** como un sólido amarillo pálido.

Procedimiento para la preparación de carbonato de 5-amino-2,4-di-*tert*-butilfenilmetilo (32)

40

45



50

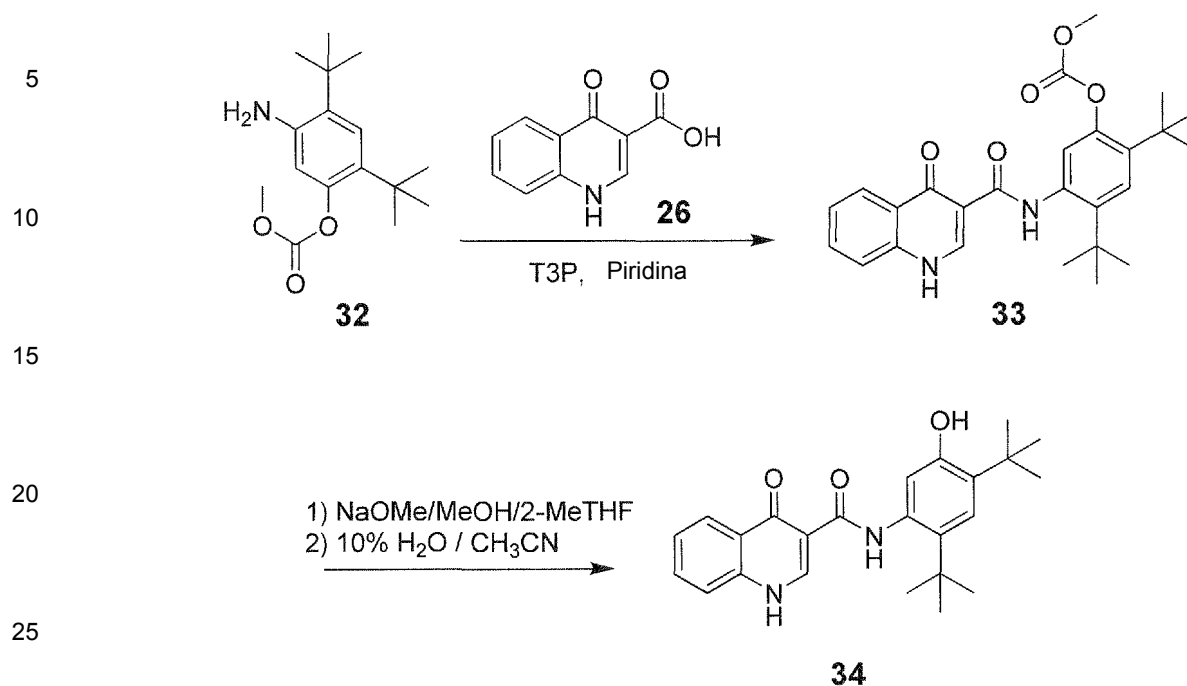
55

60

65

Se cargó carbonato de 2,4-di-*tert*-butil-5-nitrofenilmetilo (1,00 eq) a un reactor de hidrogenación adecuado, seguido de 5 % de Pd/C (2,50 % en peso en base seca, Johnson-Matthey Tipo 37). Se cargó MeOH (15,0 vol) al reactor, y el sistema se cerró. El sistema se purgó con N₂ (g), y a continuación se presurizó a 2,0 bar con H₂ (g). La reacción se realizó a una temperatura de reacción de 25 °C +/- 5 °C. Cuando se completó, la reacción se filtró, y el reactor/torta se lavó con MeOH (4,00 vol). El filtrado resultante se destiló a vacío a no más de 50 °C a 8,00 vol. Se añadió agua (2,00 vol) a 45 °C +/- 5 °C. La suspensión resultante se enfrió a 0 °C +/- 5. La suspensión se mantuvo a 0 °C +/- 5 °C durante no menos de 1 hora, y se filtró. La torta se lavó una vez con 0 °C +/- 5 °C MeOH/H₂O (8:2) (2,00 vol). La torta se secó a vacío (-0,90 bar y -0,86 bar) a 35 °C - 40 °C dando el compuesto **32**. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,05 (s, 1H), 6,39 (s, 1H), 4,80 (s, 2H), 3,82 (s, 3H), 1,33 (s, 9H), 1,23 (s, 9H).

Una vez se completó la reacción, la mezcla resultante se diluyó con de aproximadamente 5 a 10 volúmenes de MeOH (por ejemplo, de aproximadamente 6 a aproximadamente 9 volúmenes de MeOH, de aproximadamente 7 a aproximadamente 8,5 volúmenes de MeOH, de aproximadamente 7,5 a aproximadamente 8 volúmenes de MeOH, o aproximadamente 7,7 volúmenes de MeOH), se calentó a una temperatura de aproximadamente 35 ± 5 °C, se filtró, se lavó y se secó, como se ha descrito anteriormente.

Preparación de N-(2,4-di-*tert*-butil-5-hidroxifenil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxamida (34).

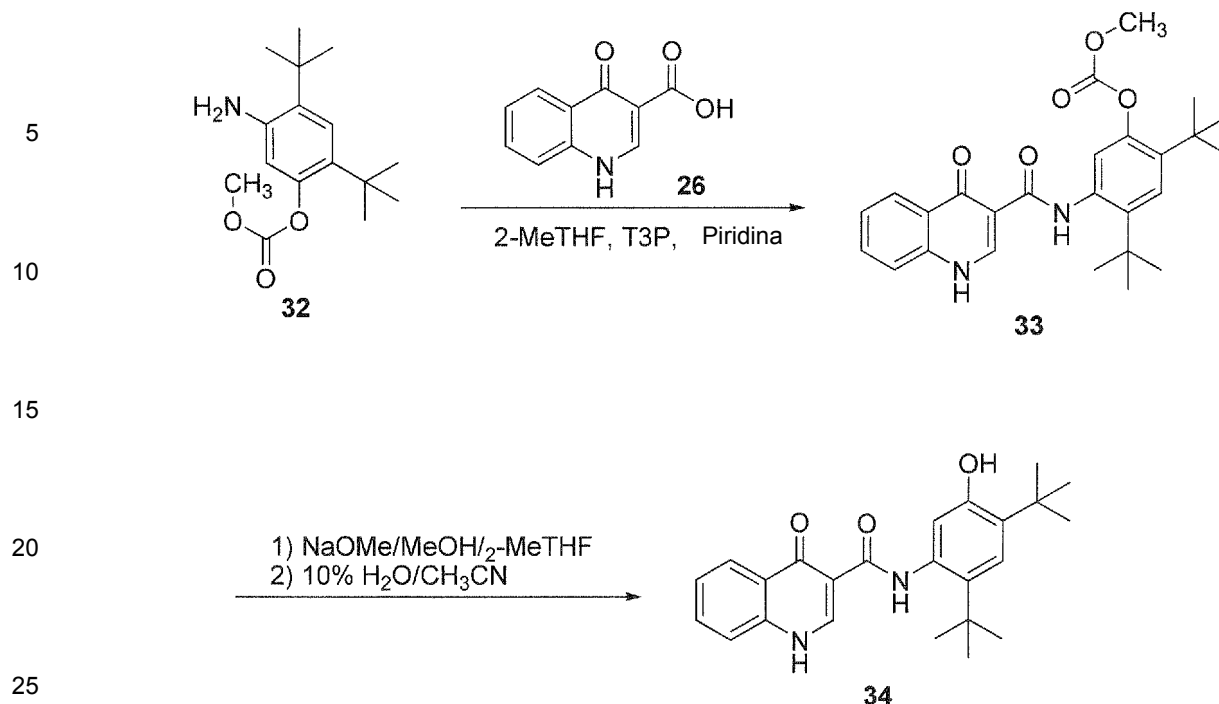
30 Se cargaron ácido 4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico, **26**, (1,0 eq) y carbonato de 5-amino-2,4-di-*tert*-
 31 butilfenilmetilo, **32**, (1,1 eq) a un reactor. Se añadió 2-MeTHF (4,0 vol, con respecto al ácido), seguido de disolución
 32 al 50 % de T3P® en 2-MeTHF (1,7 eq). El recipiente cargado con T3P se lavó con 2-MeTHF (0,6 vol). A continuación
 33 se añadió piridina (2,0 eq) y la suspensión resultante se calentó a 47,5 +/- 5,0 °C y se mantuvo a esta temperatura
 34 durante 8 horas. Se tomó una muestra y se comprobó que se había completado por HPLC. Una vez completa, la
 35 mezcla resultante se enfrió a 25,0 °C +/- 2,5 °C. Se añadió 2-MeTHF (12,5 vol) para diluir la mezcla. La mezcla de
 36 reacción se lavó con agua (10,0 vol) 2 veces. Se añadió 2-MeTHF para llevar el volumen total de reacción a 40,0 vol
 37 (~16,5 vol cargados). A esta disolución se añadió NaOMe/MeOH (1,7 equiv) para realizar la metanólisis. La reacción
 38 se agitó durante no menos de 1,0 hora, y se comprobó que se había completado por HPLC. Una vez completa, la
 39 reacción se inactivó con HCl 1 N (10,0 vol), y se lavó con HCl 0,1 N (10,0 vol). La disolución orgánica se filtró con
 40 pulido para eliminar cualquier partícula y se dispuso en un segundo reactor. La disolución filtrada se concentró a no
 41 más de 35 °C (temperatura de la camisa) y no menos de 8,0 °C (temperatura de reacción interna) a presión reducida
 42 a 20 vol. Se añadió CH₃CN a 40 vol y la disolución se concentró a no más de 35 °C (temperatura de la camisa) y no
 43 menos de 8,0 °C (temperatura de reacción interna) a 20 vol. La adición de CH₃CN y el ciclo de concentración se
 44 repitieron 2 veces más durante un total de 3 adiciones de CH₃CN y 4 concentraciones a 20 vol. Después de la
 45 concentración final a 20 vol, se añadieron 16,0 vol de CH₃CN, seguido de 4,0 vol de H₂O para hacer una
 46 concentración final de 40 vol de 10 % de H₂O/CH₃CN con respecto al ácido de partida. Esta suspensión se calentó a
 47 78,0 °C +/- 5,0 °C (reflujo). A continuación, la suspensión se agitó durante no menos de 5 horas. La suspensión se
 48 enfrió a 0,0 °C +/- 5 °C durante 5 horas, y se filtró. La torta se lavó con 0,0 °C +/- 5,0 °C CH₃CN (5 vol) 4 veces. El
 49 sólido resultante (compuesto 34) se secó en una estufa de vacío a 50,0 °C +/-5,0 °C. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆)
 50 δ 12,8 (s, 1H), 11,8 (s, 1H), 9,2 (s, 1H), 8,9 (s, 1H), 8,3 (s, 1H), 7,2 (s, 1H), 7,9 (t, 1H), 7,8 (d, 1H), 7,5 (t, 1H), 7,1 (s,
 1H), 1,4 (s, 9H), 1,4 (s, 9H).

Preparación alternativa de N-(2,4-di-*tert*-butil-5-hidroxifenil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxamida (34).

55

60

65



30 Se cargaron ácido 4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico, **26**, (1,0 eq) y carbonato de 5-amino-2,4-di-*tert*-butilfenilmetilo, **32**, (1,1 eq) a un reactor. Se añadió 2-MeTHF (4,0 vol, con respecto al ácido) seguido de disolución al 50 % de T3P® en 2-MeTHF (1,7 eq). El recipiente cargado con T3P se lavó con 2-MeTHF (0,6 vol). A continuación se añadió piridina (2,0 eq) y la suspensión resultante se calentó a 47,5 +/- 5,0 °C y se mantuvo a esta temperatura durante 8 horas. Se tomó una muestra y se comprobó que se había completado por HPLC. Una vez completa, la mezcla resultante se enfrió a 20 °C +/- 5 °C. Se añadió 2-MeTHF (12,5 vol) para diluir la mezcla. La mezcla de reacción se lavó con agua (10,0 vol) 2 veces y se cargó 2-MeTHF (16,5 vol) al reactor. Esta disolución se cargó con 30 % en peso/peso de NaOMe/MeOH (1,7 equiv) para realizar la metanólisis. La reacción se agitó a 25,0 °C +/- 5,0 °C durante no menos de 1,0 hora, y se comprobó que se había completado por HPLC. Una vez completa, la reacción se inactivó con HCl 1,2 N/H₂O (10,0 vol) y se lavó con HCl 0,1 N/H₂O (10,0 vol). La disolución orgánica se filtró con pulido para eliminar cualquier partícula y se dispuso en un segundo reactor.

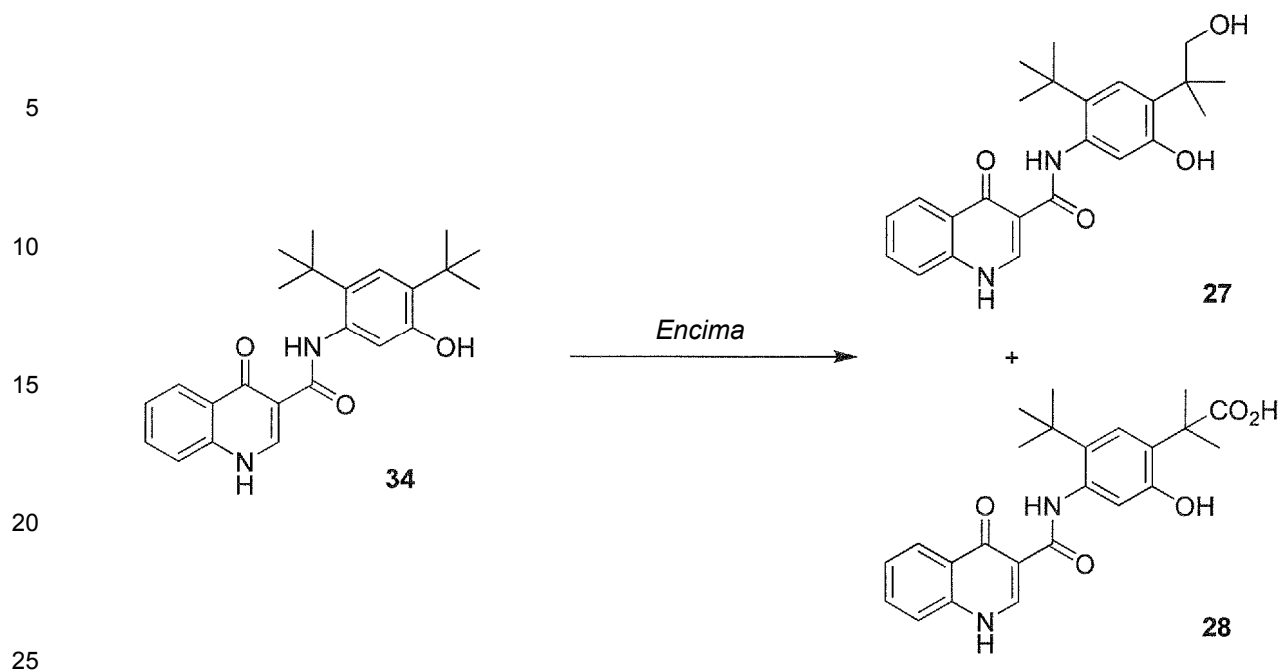
40 La disolución filtrada se concentró a no más de 35 °C (temperatura de la camisa) y no menos de 8,0 °C (temperatura de reacción interna) a presión reducida a 20 vol. Se añadió CH₃CN a 40 vol y la disolución se concentró a no más de 35 °C (temperatura de la camisa) y no menos de 8,0 °C (temperatura de reacción interna) a 20 vol. La adición de CH₃CN y el ciclo de concentración se repitieron 2 veces más durante un total de 3 adiciones de CH₃CN y 4 concentraciones a 20 vol. Después de la concentración final a 20 vol, se cargaron 16,0 vol de CH₃CN, seguido de 4,0 vol de H₂O para hacer una concentración final de 40 vol de 10 % de H₂O/CH₃CN con respecto al ácido de partida. Esta suspensión se calentó a 78,0 °C +/- 5,0 °C (reflujo). A continuación, la suspensión se agitó durante no menos de 5 horas. La suspensión se enfrió a 20 a 25 °C durante 5 horas, y se filtró. La torta se lavó con CH₃CN (5 vol), se calentó a 20 a 25 °C 4 veces. El sólido resultante (compuesto **34**) se secó en una estufa de vacío a 50,0 °C +/- 5,0 °C. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12,8 (s, 1H), 11,8 (s, 1H), 9,2 (s, 1H), 8,9 (s, 1H), 8,3 (s, 1H), 7,2 (s, 1H), 7,9 (t, 1H), 7,8 (d, 1H), 7,5 (t, 1H), 7,1 (s, 1H), 1,4 (s, 9H), 1,4 (s, 9H).

50 **Ejemplo 7: Procedimiento para la biosíntesis de N-(2-*tert*-butil-5-hidroxi-4-(1-hidroxi-2-metilpropan-2-il)fenil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxamida (27) y ácido 2-(5-*tert*-butil-2-hidroxi-4-(4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxamido)fenil)-2-metilpropanoico (28)**

55

60

65



30 Se compró *Streptomyces rimosus* (DSM 40260) de DSMZ como cultivo congelado. Este cultivo se usó para
 inocular agar inclinado, que se mantuvo y se guardó a 4 °C. Se preparó medio de extracto de levadura-extracto de
 malta-peptona (YMP) que contenía extracto de levadura (4 g/l), extracto de malta (10 g/l) y harina de soja (5 g/l) y se
 esterilizó a 130 °C durante 60 minutos. Se inocularon directamente cinco matraces que contenían 1 l de medio YMP
 con *S. rimosus* del agar inclinado. El cultivo se dejó crecer durante 2 - 3 días a 30 °C con agitación suave de
 aproximadamente 100 rpm. Bajo estas condiciones se han observado dos tipos de crecimiento, tanto una disolución
 turbia como partículas esféricas que se agregan en el fondo del matraz. El último tipo de crecimiento se ha mostrado
 que produce mayores conversiones al compuesto **27**. A continuación, las células se centrifugaron, se recogieron y se
 resuspendieron en dos matraces que contenían 1 l de tampón fosfato de potasio 0,1 M, pH 7,0. Se añadieron 5,0 g
 del compuesto **34** en 50 ml de N,N-dimetilformamida (DMF) a los matraces. Las reacciones avanzan durante 24
 horas a 30 °C con agitación suave de aproximadamente 100 rpm, momento en el que las conversiones del 7,59 %
 del compuesto **27** y del 1,17 % del compuesto **28** se indicaron por HPLC.

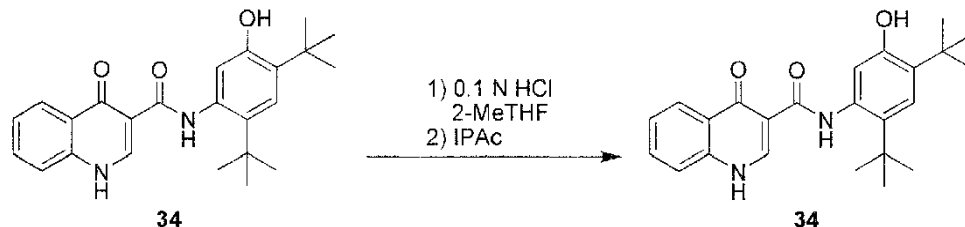
40 Ambos matraces se combinaron, se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 minutos y se resuspendieron en
 500 ml de metanol. Esta suspensión se agitó vigorosamente durante 30 minutos y a continuación se centrifugó de
 nuevo a 6000 rpm durante 10 minutos. La fase orgánica se recogió y el proceso se repitió dos veces. Los extractos
 de metanol se concentraron a vacío dando 2,50 g, 1,57 g y 1,11 g de material sólido, respectivamente. Se mostró
 que los sólidos de estos extractos contenían 74,78 - 91,96 % del compuesto **34**, 7,66 - 19,73 % del compuesto **27** y
 0,39 - 5,49 % del compuesto **28**. En un esfuerzo por seleccionar una porción del compuesto **34** de los productos de
 biooxidación, los sólidos de las dos primeras extracciones se combinaron, se suspendieron en 250 ml de metanol, se
 agitaron vigorosamente durante 1 hora y se filtraron a vacío. Mientras que los compuestos **27** y **28** se enriquecieron
 en el filtrado (22,09 y 6,14 %, respectivamente), los sólidos todavía también contuvieron el compuesto **27** (8,96 %) y
 el compuesto **28** (0,50 %).

50 El filtrado de metanol que contenía aproximadamente 2,2 g de sólidos disueltos se adsorbió sobre 4,5 g de
 sílice y se purificó por cromatografía ultrarrápida usando un gradiente del 100 % de diclorometano al 88:12 de
 diclorometano/metanol. Las fracciones que contenían el compuesto **27** se concentraron a vacío y adicionalmente se
 secaron mediante liofilización para obtener 130 mg del compuesto **27** (98,5 % de pureza por HPLC). Una fracción
 que contenía el compuesto **28** impuro también se concentró a vacío, dando menos de 10 mg de sólido.

60 El sedimento de células se resuspendió en 500 ml de metanol y se homogeneizó en un BeadBeater para
 separar las células y recuperar cualquier producto restante. La fase orgánica se obtuvo centrifugando la suspensión
 homogeneizada a 6000 rpm durante 10 minutos. Ésta se añadió al sólido obtenido de la tercera extracción y los
 sólidos filtrados del enriquecimiento de la suspensión de las dos primeras extracciones y se suspendió a reflujo
 durante la noche. A continuación, la suspensión se enfrió y se filtró con succión para obtener 1,99 g de sólido. El
 sólido se re-disolvió en 300 ml de metanol que luego se adsorbió sobre aproximadamente 5 g de sílice y se purificó
 por cromatografía ultrarrápida usando un gradiente de 100 % de diclorometano a 94:6 de diclorometano/metanol
 proporcionando 820 mg de sólido que contenía el compuesto **34** y el compuesto **27**, además de otras impurezas.
 Éste se volvió a tratar en columna usando un gradiente de disolvente más gradual (100 % de DCM hasta una mezcla

de 6 % de MeOH/94 % de DCM) para obtener 89 mg adicionales del compuesto 27. El espectro de RMN ¹H estuvo de acuerdo con el informado anteriormente.

Ejemplo 8: Procedimiento para la recrystalización de N-(2,4-di-terc-butil-5-hidroxifenil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxamida (34)



Se cargó el compuesto **34** (1,0 eq) a un reactor. Se añadió 2-MeTHF (20,0 vol), seguido de HCl 0,1 N (5,0 vol). La disolución bifásica se agitó y se separó y la fase orgánica superior se lavó dos veces más con HCl 0,1 N (5,0 vol). La disolución orgánica se filtró con pulido para eliminar cualquier partícula y se dispuso en un segundo reactor. La disolución filtrada se concentró a no más de 35 °C (temperatura de la camisa) y no más de 8,0 °C (temperatura de reacción interna) a presión reducida a 10 vol. Se añadió acetato de isopropilo (IPAc) (10 vol) y la disolución se concentró a no más de 35 °C (temperatura de la camisa) y no más de 8,0 °C (temperatura de reacción interna) a 10 vol. La adición de IPAc y la concentración se repitió 2 más veces durante un total de 3 adiciones de IPAc y 4 concentraciones a 10 vol. Después de la concentración final, se cargaron 10 vol de IPAc y la suspensión se calentó a reflujo y se mantuvo a esta temperatura durante 5 horas. La suspensión se enfrió a 0,0 °C +/- 5 °C durante 5 horas y se filtró. La torta se lavó con IPAc (5 vol) una vez. El sólido resultante se secó en una estufa de vacío a 50,0 °C +/- 5,0 °C.

Ejemplo 9: Procedimiento general para probar la solubilidad a pH 7,4

Se usó un ensayo de matraz oscilante de alto rendimiento para determinar la solubilidad de los compuestos en tampón a pH 7,4. Para calcular la concentración de los compuestos en disolución se ejecutaron dos condiciones por compuesto: 300 uM en 100 % de DMSO y 200 uM en tampón fosfato a pH 7,4 con 2 % de DMSO presente. Cada muestra se dejó agitar durante la noche, a continuación se inyectó sobre HPLC-UV para determinar el área del pico usando las siguientes condiciones: columna Phenomenex 00A-4251-B0 – 30 x 2,00 mm Luna 3u C18(2) 100A; velocidad de flujo 0,8 ml/min; volumen de inyección 20 ul; fases móviles agua de calidad para HPLC con 0,1 % de ácido fórmico y acetonitrilo de calidad para HPLC con 0,1 % de ácido fórmico; área del pico determinada a 254 nm. La solubilidad en uM se calculó usando la siguiente ecuación: conc. = (área del pico a pH 7,4) / (área del pico a la condición de patrón de DMSO 300 uM) x concentración 300 uM de condición de patrón. Los picos de interés se identificaron en condiciones de tampón basándose en el tiempo de retención (RT) del pico de mayor área en la condición de patrón de DMSO 300 uM.

VI. ENSAYOS DE ACTIVIDAD

Ejemplo 10: Procedimiento general para ensayos de actividad

Ensayos para detectar y medir las propiedades de potenciación de ΔF508-CFTR de compuestos

Métodos ópticos de potencial de membrana para ensayar las propiedades de modulación de ΔF508-CFTR de compuestos

El ensayo utiliza colorantes de detección del voltaje fluorescentes para medir cambios en el potencial de membrana usando un lector de placas fluorescente (por ejemplo, FLIPR III, Molecular Devices, Inc.) como lectura para el aumento en ΔF508-CFTR funcional en células NIH 3T3. La fuerza propulsora para la respuesta es la creación de un gradiente de iones cloruro conjuntamente con la activación de canales por una única etapa de adición de líquido después de haber tratado previamente las células con compuestos y cargarse posteriormente con un colorante de detección del voltaje.

Identificación de compuestos potenciadores

Para identificar potenciadores de ΔF508-CFTR se desarrolló un formato de ensayo de HTS de adición doble. Este ensayo de HTS utiliza colorantes de detección del voltaje fluorescentes para medir cambios en el potencial de membrana en FLIPR III como una medición para aumentar la apertura (conductancia) de Δ508 CFTR en células NIH 3T3 de ΔF508-CFTR de temperatura corregida. La fuerza propulsora para la respuesta es un gradiente de iones Cl⁻ conjuntamente con la activación de canales con forskolina en una única etapa de adición de líquido usando un lector de placas fluorescente tal como FLIPR III después de haber tratado previamente las células

con compuestos potenciadores (o control de vehículo de DMSO) y cargarse posteriormente con un colorante de redistribución.

Disoluciones

5 Disolución del baño nº 1: (en mM) NaCl 160, KCl 4,5, CaCl₂ 2, MgCl₂ 1, HEPES 10, pH 7,4 con NaOH.
Disolución del baño libre de cloruro: Las sales de cloruro en la disolución del baño nº 1 se sustituyen con sales de gluconato.

10 **Cultivo celular** Se usan fibroblastos de ratón NIH3T3 que expresan establemente Δ F508-CFTR para las mediciones ópticas del potencial de membrana. Las células se mantienen a 37 °C en 5 % de CO₂ y 90 % de humedad en medio Eagle modificado por Dulbecco complementado con glutamina 2 mM, 10 % de suero bovino fetal, 1 X NEAA, β -ME, 1 X pen/estrep y HEPES 25 mM en matraces de cultivo de 175 cm². 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 horas a 37 °C antes cultivar a 27 °C durante 24 horas 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. Ensayos electrofisiológicos para ensayar las propiedades de modulación de Δ F508-CFTR de compuestos.

1. Ensayo en cámara de Ussing

20 Se realizaron experimentos en cámara de Ussing sobre células epiteliales de las vías respiratorias polarizadas que expresan Δ F508-CFTR para caracterizar adicionalmente los moduladores de Δ 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 (Galiotta, 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 medio acondicionado con NIH3T3. Después de cuatro días se eliminó el medio apical y las células se cultivaron en una interfase de 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 Δ F508-CFTR.

30 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 Cl⁻ de basolateral a apical (I_{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 ($V_{mantenimiento} = 0$ mV) a 37 °C. La disolución basolateral contuvo (en mM) NaCl 145, K₂HPO₄ 0,83, KH₂PO₄ 3,3, MgCl₂ 1,2, CaCl₂ 1,2, Glucosa 10, 10 HEPES (pH ajustado a 7,35 con NaOH) y la disolución apical contuvo (en mM) Gluconato de Na 145, MgCl₂ 1,2, CaCl₂ 1,2, glucosa 10, HEPES 10 (pH ajustado a 7,35 con NaOH).

Identificación de compuestos potenciadores

45 El protocolo típico utilizó un gradiente de concentración de 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 Cl⁻ a través del epitelio. Se añadieron forskolina (10 μ M) y todos los compuestos de prueba al lado apical de los insertos de cultivo celular. La eficacia de los potenciadores de Δ F508-CFTR putativos se comparó con la del potenciador conocido, genisteína.

50 2. Registro de pinzamiento zonal

Se monitorizó la corriente de Cl⁻ total en células Δ 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 °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, MgCl₂ 2, CaCl₂ 2, EGTA 10, HEPES 10 y 240 μ g/ml de anfotericina-B (pH ajustado a 7,35 con HCl). El medio extracelular contuvo (en mM) NMDG-Cl 150, MgCl₂ 2, CaCl₂ 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 Δ F508-CFTR, se añadieron forskolina 10 μ M y genisteína 20 μ M al baño y la relación de corriente-voltaje se monitorizó cada 30 s.

Identificación de compuestos potenciadores

65 La capacidad de potenciadores de Δ F508-CFTR para aumentar la corriente de Cl⁻ de Δ 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 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

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 CO₂ y 90 % de humedad en medio Eagle modificado por Dulbecco complementado con glutamina 2 mM, 10 % de suero bovino fetal, 1 X NEAA, β -ME, 1 X pen/estrep y HEPES 25 mM en matraces de cultivo de 175 cm². Para los registros de células completas, se sembraron 2.500 - 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

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., 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, CaCl₂ 5, MgCl₂ 2 y HEPES 10 (pH ajustado a 7,35 con base Tris). El baño contuvo (en mM): NMDG-Cl 150, MgCl₂ 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 fosfatasas, 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 membrana que contenían ≤ 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

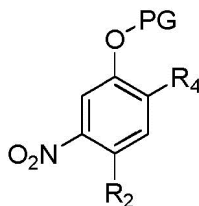
Se usan fibroblastos de ratón NIH3T3 que expresan establemente $\Delta F508$ -CFTR para las lecturas de pinzamiento zonal de membrana escindida. Las células se mantienen a 37 °C en 5 % de CO₂ y 90 % de humedad en medio Eagle modificado por Dulbecco complementado con glutamina 2 mM, 10 % de suero bovino fetal, 1 X NEAA, β -ME, 1 X pen/estrep y HEPES 25 mM en matraces de cultivo de 175 cm². 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 - 48 h a 27 °C antes de uso.

Los compuestos de fórmula 1 son útiles como moduladores de transportadores del casete de unión a ATP.

Reivindicaciones

1. Un proceso para la preparación de un compuesto de Fórmula 8

5



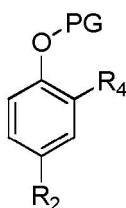
10

Formula 8

15

que comprende nitrar un compuesto de Fórmula 7 usando una mezcla de ácido sulfúrico y ácido nítrico en presencia de diclorometano

20



25

Formula 7

en el que PG es un grupo protector y R₂ y R₄ son cada uno *terc*-butilo, y en el que el compuesto nitro de Fórmula 8 se purifica por cristalización, en el que PG es propoxiformilo, metanosulfonilo, 4-nitro-benzoílo, etoxiformilo, butoxiformilo, *t*-butoxiformilo, *i*-propoxiformilo o metoxiformilo.

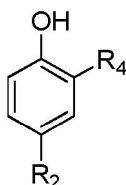
30

2. El proceso de la reivindicación 1, en el que PG es metoxiformilo.

3. El proceso de la reivindicación 1, que comprende además producir un compuesto de fórmula 7 haciendo reaccionar un compuesto de Fórmula 6

35

40



45

Formula 6

con un reactivo capaz de provocar que un grupo protector se una al oxígeno fenólico de un compuesto de Fórmula 6 en presencia de un disolvente.

50

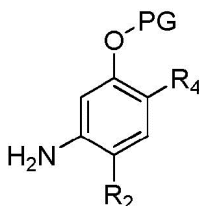
4. El proceso de la reivindicación 3, en el que el disolvente es éter dietílico, o cloruro de metileno.

5. El proceso de la reivindicación 4, en el que el disolvente es cloruro de metileno.

6. El proceso de la reivindicación 1, que comprende además producir un compuesto de Fórmula 5

55

60



65

Formula 5

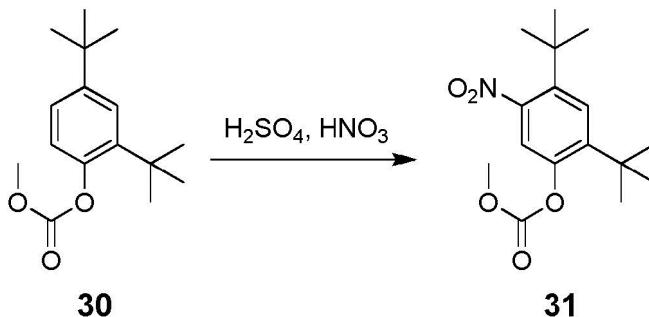
reduciendo un compuesto de fórmula 8.

7. Un proceso para la preparación del Compuesto 31, que comprende poner en contacto el Compuesto 30 con una mezcla de ácido nítrico y ácido sulfúrico en presencia de diclorometano

5

10

15



20

8. El proceso de la reivindicación 7, en el que la reacción se neutraliza añadiendo la mezcla de la reacción a agua fría.

9. El proceso de la reivindicación 8, en el que la capa acuosa se extrae con diclorometano.

25

10. El proceso de la reivindicación 9, en el que el diclorometano se lava además con agua.

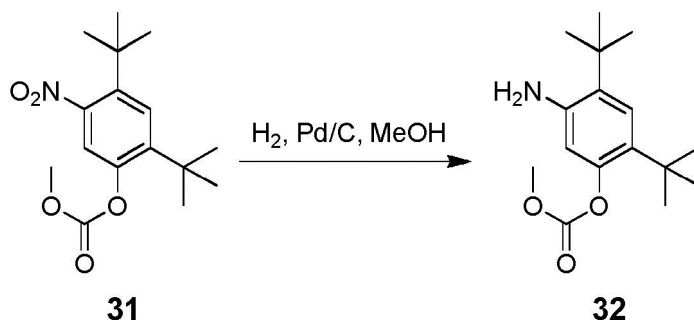
11. El proceso de la reivindicación 7, en el que el producto se aísla por cristalización con hexano.

12. El proceso de la reivindicación 7, que comprende además poner en contacto el Compuesto 31 en presencia de un gas de hidrógeno, paladio sobre carbono, y metanol para proporcionar el Compuesto 32

30

35

40

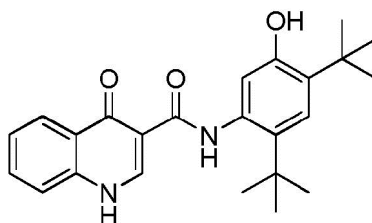


45

13. El proceso de cualquier reivindicación anterior, en el que el proceso comprende además la preparación de un compuesto que tiene la estructura:

50

55

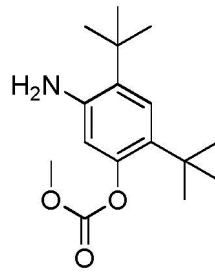


14. Un compuesto seleccionado del Compuesto 32 y el Compuesto 33:

60

65

5



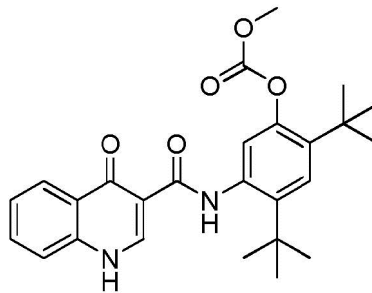
10

Compuesto 32

y

15

20



25

Compuesto 33

30

15. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 14, en el que el compuesto es el Compuesto 32.

16. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 14, en el que el compuesto es el Compuesto 33.

35

40

45

50

55

60

65