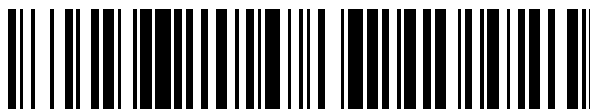


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 683 633**

51 Int. Cl.:

C07D 215/233 (2006.01)

A61K 31/47 (2006.01)

A61P 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.03.2010** **PCT/US2010/028062**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.09.2010** **WO10108155**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.03.2010** **E 10710748 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.05.2018** **EP 2408749**

54 Título: **Moduladores de regulador de conductancia transmembrana de la fibrosis quística**

30 Prioridad:

20.03.2009 US 162130 P

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

27.09.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**YANG, XIAOQING;
HADIDA RUAH, SARA, S.;
GROOTENHUIS, PETER, D.J.;
VAN GOOR, FREDRICK, 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 2 683 633 T3

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

DESCRIPCIÓN

Moduladores de regulador de conductancia transmembrana de la fibrosis quística

5 CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere a moduladores de regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística ("CFTR"), composiciones de los mismos, y su uso en terapia. La presente invención también se refiere a métodos para tratar enfermedades usando moduladores de CFTR.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] La fibrosis quística (FQ) es una enfermedad genética recesiva que afecta a aproximadamente 30.000 niños y adultos en los Estados Unidos y aproximadamente 30.000 niños y adultos en Europa. A pesar del progreso en el tratamiento de la FQ, no hay cura.

[0003] La FQ es causada por mutaciones en el gen regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) que codifica un canal de ion de cloruro epitelial responsable de ayudar en la regulación de la absorción y secreción de agua y sal en diversos tejidos. Los fármacos de molécula pequeña, conocidos como potenciadores que aumentan la probabilidad de apertura del canal de CFTR, representan una estrategia terapéutica potencial para tratar la FQ.

[0004] Específicamente, CFTR es un canal de aniones mediado por AMPc/ATP que se expresa en una variedad de tipos de células, incluyendo absorción y células epiteliales secretoras, donde regula flujo de aniones a través de la membrana, así como la actividad de otros canales iónicos y proteínas. En las células del epitelio, el funcionamiento normal del CFTR es fundamental para el mantenimiento del transporte de electrolitos en todo el cuerpo, incluidos los tejidos respiratorios y digestivos. CFTR está compuesto por aproximadamente 1.480 aminoácidos que codifican una proteína compuesta por una repetición en tándem de dominios de transmembrana, cada uno con seis hélices transmembrana y un dominio de unión a nucleótidos. Los dos dominios transmembrana están unidos por un dominio regulatorio (R) grande y polar con múltiples sitios de fosforilación que regulan la actividad del canal y el tráfico celular.

[0005] El gen que codifica CFTR se ha identificado y secuenciado (Véase Gregory, RJ et al (1990) Nature 347: 382-386; Rich, DP et al (1990) Nature 347: 358-362), (Riordan, JR y otros (1989) Science 245: 1066 - 1073). Un defecto en este gen causa mutaciones en CFTR que producen fibrosis quística ("FQ"), la enfermedad genética mortal más común en los seres humanos. La fibrosis quística afecta aproximadamente a uno de cada 2.500 bebés en los Estados Unidos. Dentro de la población general de los Estados Unidos, hasta 10 millones de personas portan una sola copia del gen defectuoso sin aparentes efectos negativos. Por el contrario, las personas con dos copias del gen asociado a la FQ padecen los efectos debilitantes y fatales de la FQ, incluida la enfermedad pulmonar crónica.

[0006] En pacientes con FQ, las mutaciones en CFTR expresado endógenamente en el epitelio respiratorio conducen a reducción de la secreción de aniones apical causando un desequilibrio en transporte de iones y fluidos. La disminución resultante en el transporte de aniones contribuye a una mayor acumulación de moco en el pulmón y las infecciones microbianas que las acompañan y que finalmente causan la muerte en pacientes con FQ. Además de la enfermedad respiratoria, los pacientes con FQ suelen padecer problemas gastrointestinales e insuficiencia pancreática que, si no se tratan, ocasionan la muerte. Además, la mayoría de los hombres con fibrosis quística son infértiles y la fertilidad disminuye entre las mujeres con fibrosis quística. En contraste con los efectos severos de dos copias del gen asociado a FQ, los individuos con una copia única del gen asociado a FQ exhiben una mayor resistencia al cólera y a la deshidratación resultante de la diarrea, quizás explicando la frecuencia relativamente alta del gen de FQ en la población.

[0007] El análisis de secuencia del gen CFTR de cromosomas de FQ ha revelado una variedad de mutaciones causantes de enfermedades (Cutting, GR et al (1990) Nature 346: 366-369; Dean, M. et al (1990) Cell 61: 863: 870 y Kerem, BS et al., (1989) Science 245: 1073 - 1080, Kerem, B-S y otros (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 87: 8447 - 8451). Hasta la fecha, se han identificado más de 1.000 mutaciones que causan enfermedades en el gen de la 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 CFTR, y se denomina comúnmente $\Delta F508$ -CFTR. Esta mutación ocurre en aproximadamente el 70% de los casos de fibrosis quística y se asocia con una enfermedad grave.

[0008] La supresión de residuo 508 en $\Delta F508$ -CFTR evita que la proteína naciente se pliegue correctamente. Esto da como resultado la incapacidad de la proteína mutante para salir de la sala de emergencias y el tráfico a la membrana plasmática. Como resultado, el número de canales presentes en la membrana es mucho menor que el observado en las células que expresan CFTR de tipo salvaje. Además del tráfico deteriorado, la mutación resulta en un canal defectuoso. Juntos, la reducción del número de canales en la membrana y la activación defectuosa conducen a un transporte aniónico reducido a través de los epitelios, lo que produce un transporte defectuoso de iones y fluidos. (Quinton, PM (1990), FASEB J. 4: 2709 - 2727). Los estudios han demostrado, sin embargo, que los

números reducidos de $\Delta F508$ -CFTR en la membrana son funcionales, aunque menos que el tipo salvaje CFTR. (Dalemans et al., (1991), Nature Lond., 354: 526 - 528, Denning et al., Supra, Pasyk y Foskett (1995), J. Cell, Biochem., 270: 12347 - 50). Además de $\Delta F508$ -CFTR, otras mutaciones que causan enfermedades en CFTR que dan como resultado tráfico defectuoso, síntesis y/o canalización pueden regularse hacia arriba o hacia abajo para alterar la secreción de aniones y modificar la progresión y/o severidad de la enfermedad.

[0009] Aunque CFTR transporta una variedad de moléculas, además de aniones, es evidente que este papel (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 epitelial Na^+ , ENaC, co-transportador $\text{Na}^+/\text{2Cl}^-/\text{K}^+$, bomba Na^+/K^+ -ATPasa y los canales de la membrana basolateral K^+ , que son responsables de la absorción de cloruro en la célula.

[0010] Estos elementos trabajan juntos para conseguir el transporte direccional a través del epitelio a través de su expresión selectiva y la localización dentro de la célula. La absorción de cloruro tiene lugar por la actividad coordinada de ENaC y CFTR presente en la membrana apical y la bomba Na^+/K^+ -ATPasa y los canales iónicos Cl^- expresados en la superficie basolateral de la célula. El transporte activo secundario de cloruro desde el lado luminal conduce a la acumulación de cloruro intracelular, que después puede salir pasivamente de la célula a través de canales de Cl^- , dando como resultado un transporte vectorial. La disposición del co-transportador $\text{Na}^+/\text{2Cl}^-/\text{K}^+$, bomba Na^+/K^+ -ATPasa y la membrana basolateral de los canales de K^+ en la superficie basolateral y CFTR en el lado luminal coordinan la secreción de cloruro a través de CFTR en el lado luminal. Debido a que el agua probablemente nunca se transporte activamente, su flujo a través del epitelio depende de pequeños gradientes osmóticos transepiteliales generados por el flujo masivo de sodio y cloruro.

[0011] Como se discutió anteriormente, se cree que la supresión de residuo 508 en $\Delta F508$ -CFTR impide que la proteína naciente se pliegue correctamente, dando como resultado la incapacidad de esta proteína mutante para salir del ER, y el tráfico 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 los tejidos epiteliales se reduce significativamente. De hecho, este fenómeno celular del procesamiento ER defectuoso de los transportadores ABC por la maquinaria ER ha demostrado ser la base subyacente no solo para la enfermedad de la FQ, sino también para una amplia gama de otras enfermedades aisladas y hereditarias.

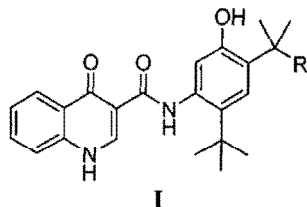
[0012] Por consiguiente, existe la necesidad de moduladores de la actividad de CFTR y composiciones de los mismos, que se pueden usar para modular la actividad del CFTR en la membrana celular de un mamífero.

[0013] Hay una necesidad de métodos de tratamiento de enfermedades causadas por mutación en CFTR al utilizar tales moduladores de la actividad de CFTR.

[0014] Hay una necesidad de métodos para modular la actividad de CFTR en una membrana celular ex vivo de un mamífero. Los documentos WO2009/036412 A1 y WO2006/002421 A2 describen moduladores para transportadores ABC que incluyen CFTR. El documento WO2007/075901 A2 describe profármacos de moduladores de transportadores ABC, particularmente de moduladores CFTR.

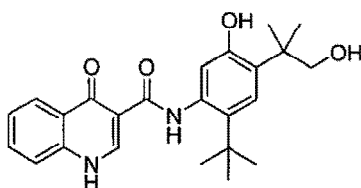
SUMARIO DE LA INVENCION

[0015] En un aspecto, esta invención se refiere a un compuesto de Fórmula I:



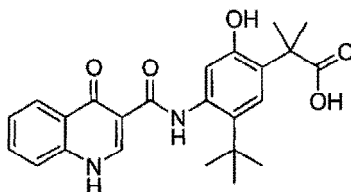
una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde R es COOH o CH_2OH .

[0016] En una realización, el compuesto tiene la estructura:



una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

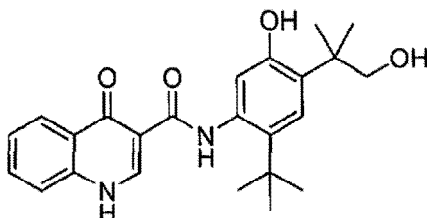
[0017] En otra realización, el compuesto tiene la estructura:



una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

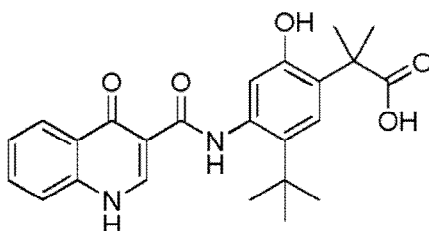
[0018] En un aspecto, esta invención se refiere a una composición farmacéutica que incluye un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde R se define como anteriormente, y un vehículo o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

[0019] En una realización de la composición farmacéutica, el compuesto tiene la estructura:



una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

[0020] En otra realización de la composición farmacéutica, el compuesto tiene la estructura:

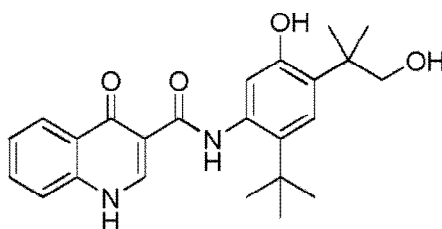


una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

[0021] Las realizaciones de este aspecto también pueden incluir una composición farmacéutica que contiene un agente adicional seleccionado entre un agente mucolítico, un broncodilatador, un antibiótico, un agente antiinfeccioso, un agente antiinflamatorio, un modulador de CFTR o un agente nutricional.

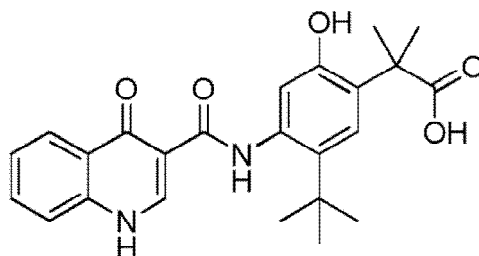
[0022] Se describe aquí un método in vitro para modular la actividad CFTR en una muestra biológica que comprende la etapa de poner en contacto dicha muestra biológica con un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde R se define como anteriormente.

[0023] En una realización del método in vitro de modular la actividad de CFTR descrita aquí, el compuesto tiene la estructura:



o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

[0024] En otra realización del método in vitro de modular la actividad de CFTR descrita aquí, el compuesto tiene la estructura:



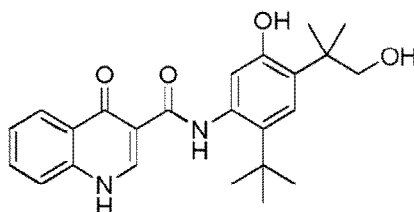
una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

[0025] En otro aspecto, la invención también proporciona una composición como se define en el presente documento para su uso en un método para tratar o disminuir la gravedad de una enfermedad en un paciente que comprende administrar a dicho paciente una de las composiciones tal como se define en el presente documento, y que dicha enfermedad es seleccionada de fibrosis quística, asma, EPOC inducida por humo, bronquitis crónica, rinosinusitis, estreñimiento, pancreatitis, insuficiencia pancreática, infertilidad masculina causada por ausencia congénita bilateral del conducto deferente (CBAVD), enfermedad pulmonar leve, pancreatitis idiopática, aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA), hepatopatía, enfisema hereditario, hemocromatosis hereditaria, deficiencias de coagulación-fibrinólisis, tal como deficiencia de proteína C, angioedema hereditario de tipo 1, deficiencias de procesamiento de lípidos, como hipercolesterolemia familiar, quilomicronemia de tipo 1, abetalipoproteinemia, enfermedades de almacenamiento lisosomal, tal como enfermedad de células I/pseudo-Hurler, mucopolisacaridosis, Sandhof/Tay-Sachs, Crigler-Najjar de tipo II, poliendocrinopatía/hiperinsulinemia, diabetes mellitus, enanismo de Laron, deficiencia de mieloperoxidasa, hipoparatiroidismo primario, melanoma, glicanosis CDG de tipo 1, hipertiroidismo congénito, osteogénesis imperfecta, hipofibrinogenemia hereditaria, deficiencia de TCA, diabetes insípida (DI), neurohipófisis DI, DI nefrótica, síndrome de Charcot-Marie Tooth, enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher, enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, parálisis supranuclear progresiva, enfermedad de Pick, varios trastornos neurológicos de la poliglutamina como Huntington, espinocerebelar ataxia de tipo I, atrofia muscular espinal y bulbar, atrofia dentatorubral pallidoluisiana y distrofia miotónica, así como encefalopatías espongiiformes, como enfermedad hereditaria de Creutzfeldt-Jakob (debido a un defecto en el procesamiento de la proteína priónica), enfermedad de Fabry, síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, EPOC, enfermedad de ojo seco o enfermedad de Sjogren, osteoporosis, osteopenia, curación ósea y crecimiento óseo (incluida la reparación ósea, regeneración ósea, reducción de la retención ósea y aumento de la deposición ósea), síndrome de Gorham, canalopatías por cloruro como miotonía congénita (formas de Thomson y Becker), síndrome de Bartter tipo III, Enfermedad de Dent, hiperekplexia, epilepsia, hiperekplexia, enfermedad de almacenamiento lisosomal, síndrome de Angelman y Discinesia Ciliar Primaria (DCP), un término para trastornos hereditarios de la estructura y/o función de los cilios, que incluye DCP con situs inversus (también conocido como síndrome de Kartagener), DCP sin situs inversus y aplasia ciliar.

[0026] En otra realización, la enfermedad se selecciona de FQ, la EPOC, EPOC inducida por humo, pancreatitis, y rinosinusitis.

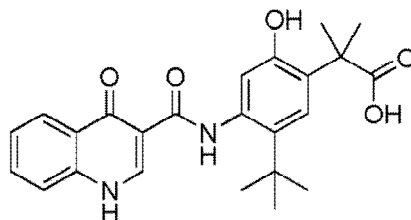
[0027] En ciertas realizaciones, la enfermedad es fibrosis quística.

[0028] En una realización, la composición comprende el compuesto que tiene la estructura:



o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

[0029] En otra realización, la composición comprende el compuesto que tiene la estructura:



o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

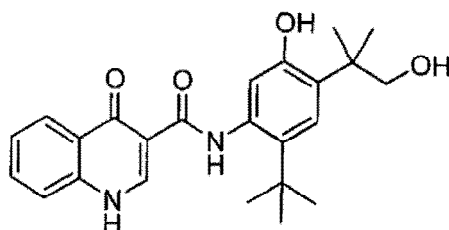
[0030] En otro aspecto, la presente invención proporciona un kit para uso en la medición de la actividad de CFTR o un fragmento del mismo en una muestra biológica *in vitro* o *in vivo* que comprende (i) una composición que comprende un compuesto de Fórmula I o cualquiera de las realizaciones anteriores; e (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.

[0031] En una realización de este aspecto, 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 del CFTR o un fragmento del mismo en presencia del compuesto adicional con la densidad del CFTR o un fragmento del mismo en presencia de dicha composición que comprende un compuesto de Fórmula I.

[0032] En realizaciones preferidas, el kit se usa para medir la densidad de CFTR o un fragmento del mismo.

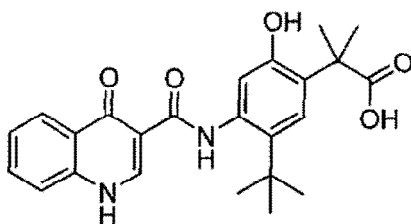
[0033] En una realización preferida adicional, el kit se usa para medir la densidad de dicho CFTR o un fragmento del mismo y la etapa de comparar la actividad de dicho CFTR o un fragmento del mismo proporciona una medida de la densidad de dicho CFTR o un fragmento del mismo.

[0034] En una realización del kit para su uso en la medición de la actividad de CFTR, el compuesto tiene la estructura:



o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

[0035] En otra realización del kit para su uso en la medición de la actividad de CFTR, el compuesto tiene la estructura:



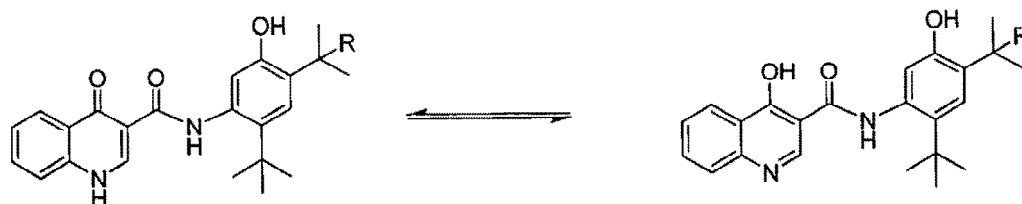
o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

[0036] Los compuestos de Fórmula I proporcionan propiedades ventajosas tales como, pero no limitados al aumento de la polaridad, solubilidad acuosa favorable, el volumen de distribución inferior y penetración en el tejido inferior.

DESCRIPCIÓN DETALLADA**DEFINICIONES**

- 5 **[0037]** Los compuestos de esta invención incluyen los descritos en general anteriormente, y se ilustran adicionalmente mediante las clases, subclases, y especies descritas aquí. Como se usa en el presente documento, se aplicarán las siguientes definiciones a menos que se indique lo contrario.
- 10 **[0038]** El término "transportador ABC" como se usa en este documento significa una proteína ABC-transportadora o un fragmento de la misma que comprende al menos un dominio de unión, donde 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 en el transportador ABC que puede unirse a un modulador. Véase, por ejemplo, Hwang, TC et al., J. Gen. Physiol. (1998): 111 (3), 477 - 90.
- 15 **[0039]** El término "CFTR" como se usa en este documento significa CFTR o una mutación del mismo capaz de actividad reguladora, incluyendo, pero no limitado a, $\Delta F508$ CFTR y G551D CFTR (véase, por ejemplo, <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>, para mutaciones de CFTR).
- 20 **[0040]** El término "modular" como se usa en la presente memoria significa aumentar o disminuir en una cantidad medible.
- [0041]** Para los propósitos de esta invención, los elementos químicos se identifican de acuerdo con la Periodic Table of Elements, versión CAS, Handbook of Chemistry and Physics, 75ª ed. Además, 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 edición, Ed.: Smith, MB y March, J., John Wiley & Sons, Nueva York: 25 2001, cuyos contenidos completos se incorporan aquí como referencia.
- [0042]** El término "estable", como se usa aquí, se refiere a compuestos que no se alteran sustancialmente cuando se someten a condiciones para permitir su producción, detección, y preferentemente su recuperación, purificación y uso para uno o más de los propósitos revelados aquí. En algunas realizaciones, un compuesto estable o un compuesto químicamente factible es uno que no se altera sustancialmente 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.
- 30 **[0043]** El término "grupo protector" (PG) como se usa en el presente documento, representa a aquellos grupos destinados a proteger un grupo funcional, tal como, por ejemplo, un alcohol, amina, carboxilo, carbonilo, etc., contra reacciones indeseables durante los procedimientos sintéticos. Los grupos protectores usados comúnmente se describen en Greene y Wuts, Protective Groups in Organic Systems, 3ª Edición (John Wiley & Sons, Nueva York, 1999), que se incorpora aquí como 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, 40 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 no protegidos tales como alanina, leucina, fenilalanina y similares; grupos sulfonilo tales como bencenosulfonilo, *p*-toluenosulfonilo y similares; grupos de 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*-bifenililo)-1-metiletoxicarbonilo, α,α -dimetilo-3,5-dimetoxibenciloxicarbonilo, benzhidriloxicarbonilo, *t*-butiloxicarbonilo, diisopropilmetonoxicarbonilo, isopropiloxicarbonilo, etoxicarbonilo, metoxicarbonilo, aliloxicarbonilo, 2,2,2, -tricloroetoxicarbonilo, fenoxocarbonilo, 4-nitrofenoxi carbonilo, fluorenilo-9-metoxicarbonilo, ciclopentiloxicarbonilo, adamantiloxicarbonilo, 50 ciclohexiloxicarbonilo, feniltiocarbonilo y similares, grupos arilalquilo tales como bencilo, trifenilmetilo, benciloximetilo y similares y grupos sililo tales como trimetilsililo y similares. Los grupos N-protectores preferidos son *terc*-butiloxicarbonilo (Boc).
- [0044]** Los ejemplos de grupos protectores útiles para los ácidos son ésteres de alquilo sustituidos tales como 9-fluorenilmetilo, metoximetilo, metiltiometilo, tetrahidropiranoilo, tetrahidrofuranilo, metoxietoximetilo, 2-(trimetilsililo)etoximetilo, benciloximetilo, pivaloiloetoximetilo, fenilacetoximetilo, triisopropilsililmetilo, cianometilo, acetol, fenacilo, ésteres de fenacilo sustituidos, 2,2,2-tricloroetilo, 2-haloetilo, ω -cloroalquilo, 2-(trimetilsililo)etilo, 2-metiltoetilo, *t*-butilo, 3-metilo-3-pentilo, diciticlopropilmetilo, ciclopentilo, ciclohexilo, alilo, metalilo, cinamilo, fenilo, ésteres de sililo, ésteres de bencilo y de bencilo sustituido, ésteres de 2,6-dialquilfenilo tales como pentafluorofenilo, 2,6-dialquilfenilo. Los grupos protectores preferidos para los ácidos son ésteres metílicos o etílicos.
- 60 **[0045]** Los métodos de adición (un proceso generalmente denominado "protección") y eliminación (proceso generalmente denominado "desprotección") de tales grupos protectores de amina y ácido son bien conocidos en la técnica y están disponibles, por ejemplo en P.J.Kocienski, Protecting Groups, Thieme, 1994, que se incorpora aquí por referencia en su totalidad y en Greene and Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 3ª Edición (John Wiley & Sons, Nueva York, 1999).

[0046] A menos que se indique lo contrario, todas las formas tautoméricas de los compuestos de la invención están dentro del alcance de la invención. Es decir, los compuestos de Fórmula I pueden existir como tautómeros:



[0047] Además, a menos que se indique otra cosa, las estructuras representadas en el presente documento también pretenden incluir compuestos que difieren sólo en la presencia de uno o más átomos isotópicamente enriquecidos. Por ejemplo, los compuestos que tienen las estructuras presentes, excepto por la sustitución de hidrógeno por deuterio o tritio, o la sustitución de un carbono por un carbono enriquecido en ^{13}C o ^{14}C , están dentro del alcance de esta invención. Tales compuestos son útiles, por ejemplo, como herramientas analíticas, sondas en ensayos biológicos o como agentes terapéuticos.

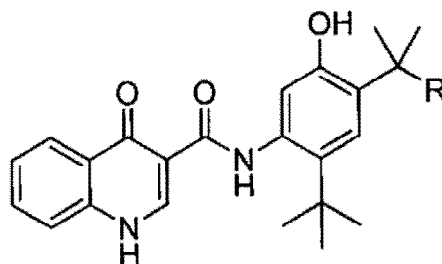
[0048] Ejemplos de disolventes adecuados son, pero no se limitan a, agua, metanol, diclorometano (DCM), acetonitrilo, dimetilformamida (DMF), acetato de etilo (EtOAc), alcohol isopropílico (IPA), acetato de isopropilo (IPAC), tetrahidrofurano (THF), metiletilcetona (MEK), t-butanol y N-metilpirrolidona (NMP).

[0049] Ejemplos de agentes de acoplamiento adecuados son, pero no se limitan a, 1-(3-(dimetilamino)propilo)-3-etilo-carbodiimida (EDCI), hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-ilo)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HBTU), 1-hidroxibenzotriazol (HOBt), hexafluorofosfato de uronio 2-(1H-7-azabenzotriazol-1-ilo)-1,1,3,3-tetrametilo (HATU), tetrafluoroborato de 2-cloro-1,3-dimetilo-2-imidazolio, 1-H-benzotriazolio-1-[bis(dimetilamino)metileno]-5-clorohexafluorofosfato (HCTU), 2-cloro-4,6-dimetoxi-1,3,5-triazina y anhídrido fosfónico de 2-propano (T3P®).

[0050] Ejemplos de bases adecuadas son, pero no se limitan a, K_2CO_3 , N-metilmorfolina (NMM), trietilamina (TEA), amina de diisopropilo-etilo (DIEA), piridina, hidróxido de potasio, hidróxido de sodio, y metóxido de sodio.

COMPUESTOS

[0051] En una realización, la invención incluye un compuesto de Fórmula I:



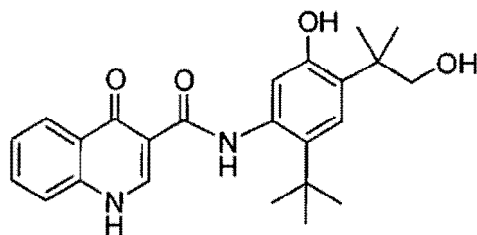
I

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde R es COOH o CH_2OH .

[0052] En algunas realizaciones, R es CH_2OH .

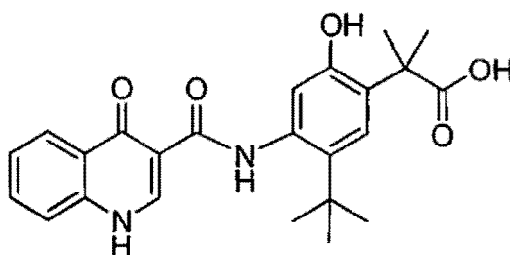
[0053] En algunas realizaciones, R es COOH .

[0054] En otra realización, la invención incluye un compuesto de la estructura:



o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

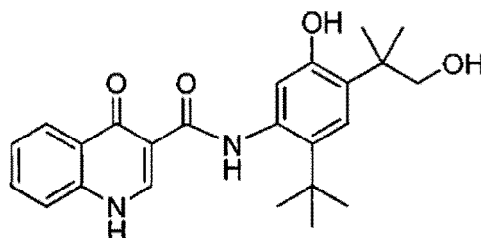
[0055] En otra realización, la invención incluye un compuesto de la estructura:



o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

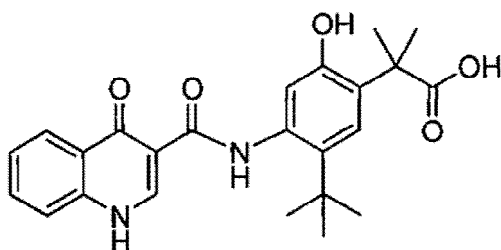
[0056] En una realización, la invención incluye una composición farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula I, y un vehículo o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

[0057] En otra realización, la invención incluye una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la estructura:



y un vehículo o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

[0058] En otra realización, la invención incluye una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la estructura:



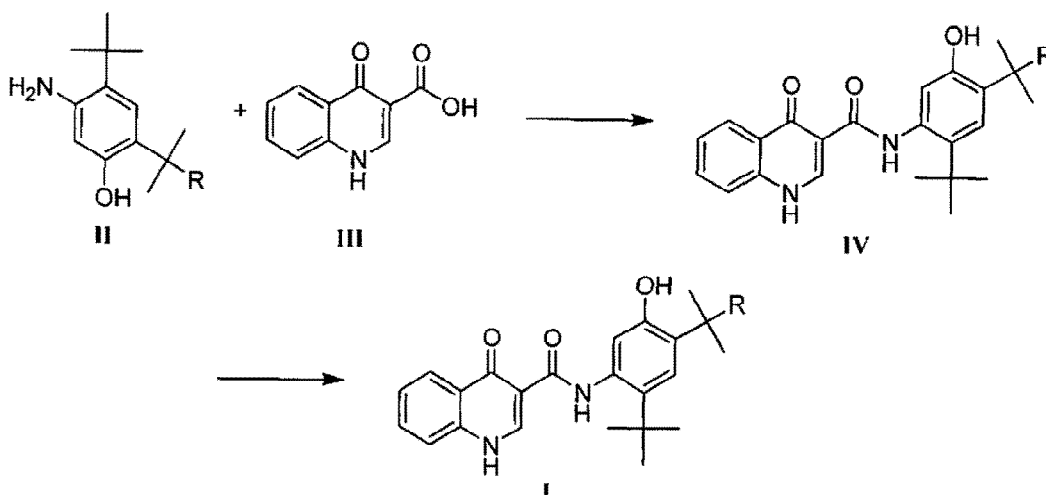
y un vehículo o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

[0059] En otra forma de realización, la composición farmacéutica comprende además un agente adicional seleccionado entre un agente mucolítico, un broncodilatador, un antibiótico, un agente anti-inyectivo, un agente anti-inflamatorio, un modulador de CFTR, o un agente nutricional.

5 III. SÍNTESIS GENERAL

[0060] Los compuestos de Fórmula I se pueden sintetizar de acuerdo con el Esquema 1.

Esquema 1

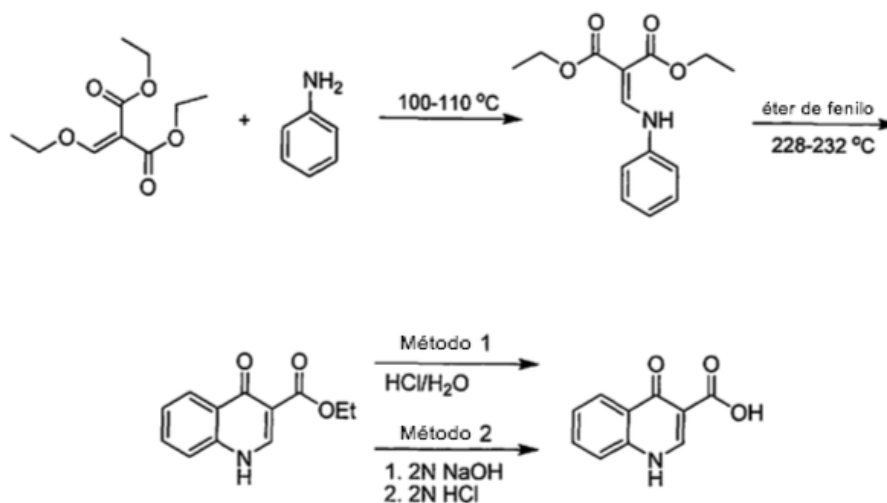


[0061] En el Esquema 1, las anilinas de fórmula II, en donde R y OH opcional e independientemente llevan grupos protectores sobre el mismo, se hacen reaccionar con intermedios de ácido carboxílico de Fórmula III en condiciones de acoplamiento para formar compuestos de Fórmula IV. Los compuestos de Fórmula IV que llevan uno o más grupos protectores se pueden desproteger a continuación para proporcionar derivados de Fórmula I.

[0062] La reacción de acoplamiento descrito en el Esquema 1 puede lograrse mediante la disolución de los reactivos en un disolvente adecuado, tratando la solución resultante con un reactivo de acoplamiento adecuado, opcionalmente en presencia de una base adecuada.

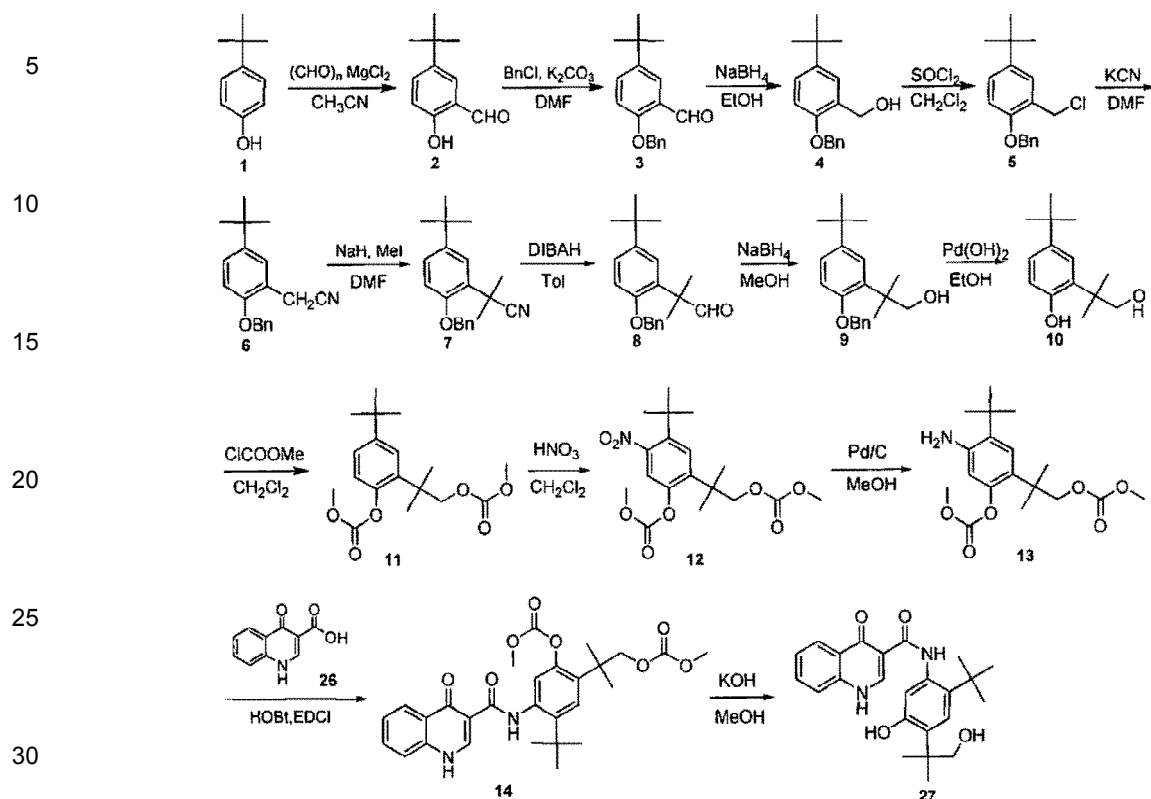
[0063] Los derivados de quinolina de Fórmula III se pueden sintetizar de acuerdo con el Esquema 2.

Esquema 2



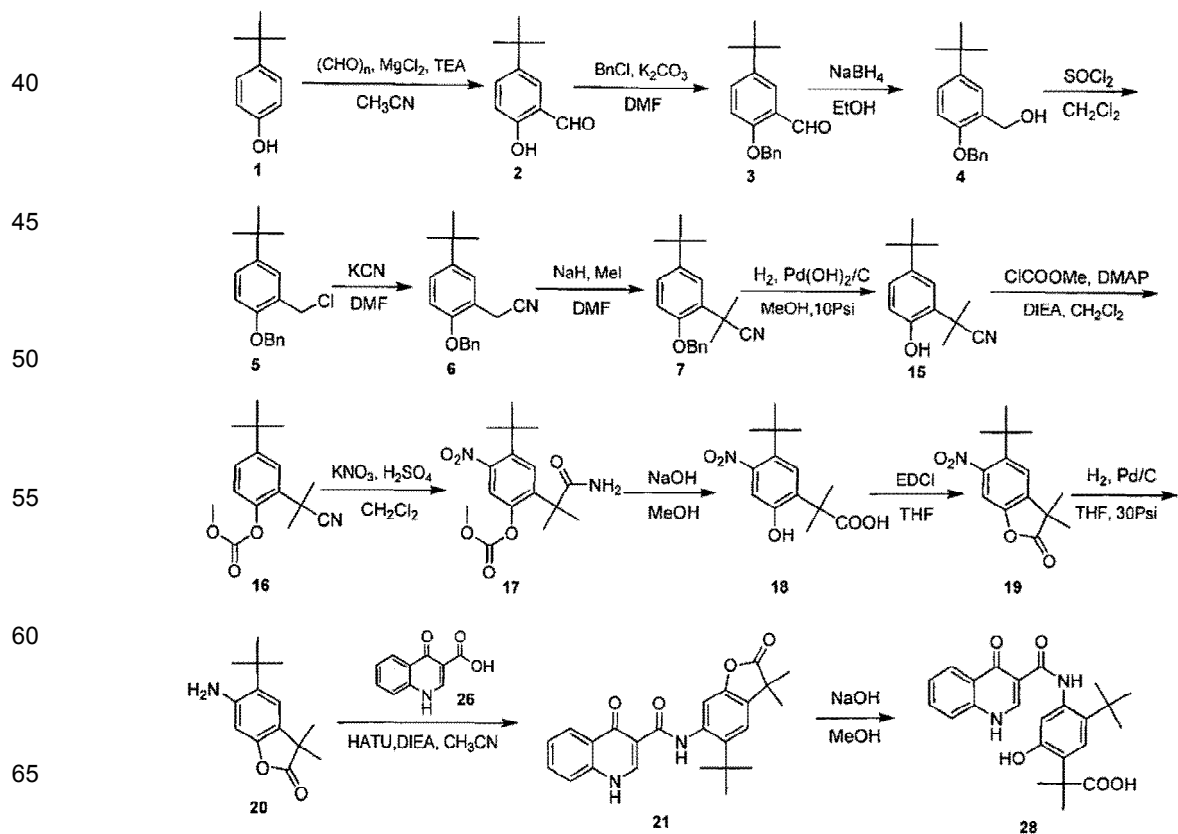
[0064] Las anilinas de fórmula II, en donde R es $-\text{CH}_2\text{OH}$ se pueden sintetizar según el Esquema 3.

Esquema 3



[0065] Las anilinas de Fórmula II, en donde R es -COOH pueden sintetizarse de acuerdo con el Esquema 4.

Esquema 4



USOS Y MÉTODOS DE USO

Composiciones farmacéuticamente aceptables

[0066] En un aspecto de la presente invención, se proporcionan composiciones farmacéuticamente aceptables, en las que estas composiciones comprenden cualquiera de los compuestos como se describe en el presente documento, y comprenden opcionalmente un portador, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, estas composiciones opcionalmente comprenden adicionalmente uno o más agentes terapéuticos adicionales.

[0067] También se apreciará que ciertos de los compuestos de presente invención pueden existir en forma libre para el tratamiento, o cuando sea apropiado, como un derivado farmacéuticamente aceptable o un profármaco del mismo. De acuerdo con la presente invención, un derivado o profármaco farmacéuticamente aceptable incluye, pero no se limita a, sales, ésteres, sales de tales ésteres farmacéuticamente aceptables, o cualquier otro aducto o derivado que, tras la administración a un paciente que lo necesita, es capaz de proporcionar, directa o indirectamente, un compuesto como se describe aquí de otro modo, o un metabolito o residuo del mismo.

[0068] Tal como se utiliza aquí, el término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellas sales que son, dentro del alcance del juicio médico, adecuadas para uso en contacto con los tejidos de humanos y animales inferiores sin toxicidad, irritación, respuesta alérgica y similares, y son acordes con una relación beneficio/riesgo razonable. Una "sal farmacéuticamente aceptable" significa cualquier sal o sal no tóxica de un éster de un compuesto de esta invención que, tras la administración a un receptor, es capaz de proporcionar, directa o indirectamente, un compuesto de esta invención o un metabolito inhibidor activo o residuo del mismo.

[0069] Las sales farmacéuticamente aceptables son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, SM Berge, et al. describe sales farmacéuticamente aceptables en detalle en J. Pharmaceutical Sciences, 1977, 66, 1-19. Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de esta invención incluyen los derivados de ácidos y bases inorgánicas y orgánicas adecuadas. Ejemplos de sales de adición de ácido no tóxicas farmacéuticamente aceptables son sales de un grupo amino formado 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 técnica tales como el intercambio iónico. Otras sales farmacéuticamente aceptables incluyen adipato, alginato, ascorbato, aspartato, bencenosulfonato, benzoato, bisulfato, borato, butirato, canforato, canforsulfonato, citrato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, edisilato (etanodisulfonato), etanosulfonato, formiato, fumarato, glucoheptonato, glicerofosfato, gluconato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, hidroyoduro, 2-hidroxi-etanosulfonato, lactobionato, lactato, laurato, lauril sulfato, 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, sales de valerato, y similares. Las sales derivadas de bases apropiadas incluyen sales de metal alcalino, metal alcalinotérreo, amonio y $N^+(C_{1-4} \text{alquilo})_4$. Esta invención también prevé la cuaternización de cualquier grupo básico que contenga nitrógeno de los compuestos descritos en este documento. Pueden obtenerse productos solubles o dispersables en agua o aceite mediante dicha cuaternización. Las sales de metales alcalinos o alcalinotérreos representativas incluyen sodio, litio, potasio, calcio, magnesio y similares. Otras sales farmacéuticamente aceptables incluyen, cuando sea apropiado, amonio no tóxico, amonio cuaternario y cationes de amina formados usando contraiones tales como haluro, hidróxido, carboxilato, sulfato, fosfato, nitrato, alquilsulfonato inferior y arilsulfonato.

[0070] Como se describió anteriormente, las composiciones farmacéuticamente aceptables de la presente invención comprenden adicionalmente un portador farmacéuticamente aceptable, adyuvante o vehículo, que, como se usa aquí, incluye cualquiera y todos los disolventes, diluyentes, u otro vehículo líquido, dispersión o adyuvantes de suspensión, agentes tensioactivos, agentes isotónicos, agentes espesantes o emulsionantes, conservantes, aglutinantes sólidos, lubricantes y similares, adecuados para la forma de dosificación particular deseada. Remington's Pharmaceutical Sciences, Decimosexta edición, EW Martin (Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1980) describe diversos vehículos utilizados en la formulación de composiciones farmacéuticamente aceptables y técnicas conocidas para la preparación de los mismos. Excepto en la medida en que cualquier medio de vehículo convencional sea incompatible con los compuestos de la invención, tal como mediante la producción de cualquier efecto biológico indeseable o mediante la interacción de otra manera de manera perjudicial con cualquier otro componente de la composición farmacéuticamente aceptable, se contempla que su uso sea dentro del alcance de esta invención. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, intercambiadores de iones, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas séricas, tales como albúmina sérica humana, sustancias reguladoras tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico o sorbato de potasio, mezclas parciales de glicéridos de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, como sulfato de protamina, hidrogenofosfato disódico, hidrogenofosfato de potasio, cloruro de sodio, sales de zinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, poliacrilatos, ceras, polímeros de bloque de polietileno-polioxipropileno, grasa de lana, azúcares tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y sus derivados tales como celulosa de sodio de carboximetilo, celulosa de etilo y

acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; excipientes tales como manteca de cacao y ceras para supositorios; aceites tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón; aceite de cártamo; aceite de sésamo; aceite de oliva; aceite de maíz y aceite de soja; glicoles; tal propilenglicol o polietilenglicol; ésteres tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; agentes tamponantes tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua libre de pirógenos; solución salina isotónica; la solución de Ringer; las soluciones de alcohol etílico y tampón de fosfato, así como otros lubricantes no tóxicos compatibles como sulfato de laurilo sódico y estearato de magnesio, así como agentes colorantes, agentes liberadores, agentes de revestimiento, edulcorantes, aromatizantes y conservantes, conservantes y antioxidantes también pueden estar presentes en la composición, conforme al juicio del formulador.

Usos de compuestos y composiciones farmacéuticamente aceptables

[0071] En aún otro aspecto, se describe aquí un método para tratar, o reducir la gravedad de una afección, enfermedad, o trastorno implicado por mutación de CFTR. En ciertas realizaciones, se describe un método para tratar una afección, enfermedad o trastorno implicado por una deficiencia de la actividad CFTR, comprendiendo el método la administración de una composición que comprende un compuesto de Fórmula I a un sujeto, preferiblemente un mamífero, que lo necesita.

[0072] En otro aspecto, se describe un método para tratar o disminuir la gravedad de una enfermedad en un paciente que comprende la administración a dicho paciente de una de las composiciones definidas aquí, y dicha enfermedad se selecciona de fibrosis quística, asma, EPOC inducida por humo, bronquitis crónica, rinosinusitis, estreñimiento, pancreatitis, insuficiencia pancreática, infertilidad masculina causada por ausencia congénita bilateral del conducto deferente (CBAVD), enfermedad pulmonar leve, pancreatitis idiopática, aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA), enfermedad hepática, enfisema hereditario, hemocromatosis hereditaria, coagulación -deficiencias de fibrinólisis, como deficiencia de proteína C, angioedema hereditario de tipo 1, deficiencias de procesamiento de lípidos, como hipercolesterolemia familiar, quilomicronemia de tipo 1, abetalipoproteinemia, enfermedades de almacenamiento lisosomal, como enfermedad de células I/pseudo-Hurler, mucopolisacaridosis, Sandhof/Tay-Sachs, Crigler-Najjar de tipo II, poliendocrinopatía/hiperinsulinemia, diabetes mellitus, enanismo de Laron, deficiencia de mieloperoxidasa, hipoparatiroidismo primario, melanoma, glicanosis CDG de tipo 1, hipertiroidismo congénito, osteogénesis imperfecta, hipofibrinogenemia hereditaria, deficiencia de ACT, diabetes insípida (DI), DI neurohipofisaria, DI nefrótica, síndrome de Charcot-Marie Tooth, enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher, enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, parálisis supranuclear progresiva, enfermedad de Pick, varios trastornos neurológicos de poliglutamina como Huntington, ataxia espinoocerebelosa de tipo I, atrofia muscular espinal y bulbar, atrofia dentallubral pallidolusiana y distrofia miotónica, así como encefalopatías espongiformes, como la enfermedad hereditaria de Creutzfeldt-Jakob (debido a un defecto en el procesamiento de la proteína del prión), Enfermedad de Fabry, síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, EPOC, enfermedad del ojo seco o enfermedad de Sjogren, osteoporosis, osteopenia, curación ósea y crecimiento óseo (incluida la reparación ósea, la regeneración ósea, la reducción de la resorción ósea y el aumento de la deposición ósea), el síndrome de Gorham, canalopatías de cloruro como miotonía congénita (formas de Thomson y Becker), síndrome de Bartter de tipo III, enfermedad de Dent, hiperekplexia, epilepsia, hiperekplexia, enfermedad de almacenamiento lisosomal, síndrome de Angelman y discinesia ciliar primaria (DCP), un término para trastornos hereditarios de la estructura y/o función de los cilios, incluyendo DCP con situs inversus (también conocido como síndrome de Kartagener), DCP sin situs inversus y aplasia ciliar.

[0073] El método descrito en este documento incluye tratar o disminuir la gravedad de la fibrosis quística en un paciente que comprende administrar a dicho paciente una de las composiciones tal como se define en el presente documento. Como se describe en este documento, 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. Como se describe en este documento, el método incluye tratar o disminuir la gravedad de la fibrosis quística en un paciente que posee la mutación $\Delta F508$ de CFTR humana que comprende administrar a dicho paciente una de las composiciones como se define en este documento. Como se describe en este documento, el método incluye tratar o disminuir la gravedad de la fibrosis quística en un paciente que posee la mutación G551D de CFTR humana que comprende administrar a dicho paciente una de las composiciones como se define en este documento. Como se describe en este documento, el método incluye tratar o disminuir la gravedad de la fibrosis quística en un paciente que posee la mutación $\Delta F508$ de CFTR humana en al menos un alelo que comprende administrar a dicho paciente una de las composiciones como se define en este documento. Como se describe en este documento, el método incluye tratar o disminuir la gravedad de la 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 como se define en este documento. Como se describe aquí, el método incluye tratar o disminuir la gravedad de la fibrosis quística en un paciente que posee la mutación G551D de CFTR humana en al menos un alelo que comprende administrar a dicho paciente una de las composiciones como se define en este documento. Como se describe en este documento, el método incluye tratar o disminuir la gravedad de la fibrosis quística en un paciente que posee la mutación G551D de CFTR humana en ambos alelos que comprende administrar a dicho paciente una de las composiciones como se define en este documento.

[0074] El método descrito en este documento incluye reducir la gravedad de la fibrosis quística en un paciente que comprende la administración a dicho paciente de una de las composiciones tal como se define en el presente documento. Como se describe en este documento, 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. Como se describe en este documento, el método incluye disminuir la gravedad de la fibrosis quística en un paciente que posee la mutación $\Delta F508$ de CFTR humano que comprende administrar a dicho paciente una de las composiciones como se define en este documento. Como se describe en el presente documento, el método incluye disminuir la gravedad de la fibrosis quística en un paciente que posee la mutación G551D de CFTR humana que comprende administrar a dicho paciente una de las composiciones como se define en este documento. Como se describe en este documento, el método incluye disminuir la gravedad de la 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 como se define en este documento. Como se describe en este documento, el método incluye disminuir la gravedad de la 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 como se define en este documento. Como se describe en este documento, el método incluye disminuir la gravedad de la fibrosis quística en un paciente que posee la mutación G551D de CFTR humana en al menos un alelo que comprende administrar a dicho paciente una de las composiciones como se define en este documento. Como se describe en este documento, el método incluye disminuir la gravedad de la fibrosis quística en un paciente que posee la mutación G551D de CFTR humana en ambos alelos que comprende administrar a dicho paciente una de las composiciones como se define en este documento.

[0075] En algunos aspectos, se describe aquí un método para tratar o disminuir la gravedad de la osteoporosis en un paciente que comprende administrar a dicho compuesto de paciente de Fórmula 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

[0076] Como se describe aquí, el método de tratar o disminuir la gravedad de la osteoporosis en un paciente que comprende administrar a dicho paciente una composición farmacéutica como se describe aquí.

[0077] En algunos aspectos, se describe en el presente documento un método para tratar o disminuir la gravedad de la osteopenia en un paciente que comprende administrar a dicho paciente compuesto de Fórmula 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

[0078] Como se describe en el presente documento, el método de tratar o disminuir la gravedad de la osteopenia en un paciente que comprende administrar a dicho paciente una composición farmacéutica como se describe aquí.

[0079] En algunos aspectos, se describe aquí un método de curación del hueso y/o la reparación ósea en un paciente que comprende administrar a dicho paciente compuesto de Fórmula 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

[0080] Como se describe aquí, el método de curación del hueso y/o la reparación ósea en un paciente que comprende administrar a dicho paciente una composición farmacéutica como se describe aquí.

[0081] En algunos aspectos, se describe aquí un método de reducción de la resorción ósea en un paciente que comprende administrar a dicho paciente compuesto de Fórmula 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

[0082] En algunos aspectos, se describe en el presente documento un método para aumentar la deposición ósea en un paciente que comprende administrar a dicho paciente compuesto de Fórmula 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

[0083] Como se describe aquí, el método de aumento de la deposición ósea en un paciente que comprende administrar a dicho paciente una composición farmacéutica como se describe aquí.

[0084] En algunos aspectos, se describe aquí un método para tratar o disminuir la gravedad de la EPOC en un paciente que comprende administrar a dicho paciente compuesto de Fórmula 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

[0085] Como se describe aquí, el método de tratar o disminuir la gravedad de la EPOC en un paciente comprende la administración a dicho paciente de una composición farmacéutica como se describe aquí.

[0086] En algunos aspectos, se describe aquí un método para tratar o disminuir la gravedad de la EPOC inducida por humo en un paciente que comprende administrar a dicho paciente compuesto de Fórmula 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

[0087] Como se describe aquí, el método de tratar o disminuir la gravedad de humo inducida por la EPOC en un paciente que comprende administrar a dicho paciente una composición farmacéutica como se describe aquí.

[0088] En algunos aspectos, se describe aquí un método para tratar o disminuir la gravedad de la bronquitis crónica en un paciente que comprende administrar a dicho paciente compuesto de Fórmula 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

[0089] Como se describe aquí, el método de tratar o disminuir la gravedad de la bronquitis crónica en un paciente comprende administrar a dicho paciente una composición farmacéutica como se describe en el presente documento. De acuerdo con una realización alternativa preferida, se describe en la presente un método para tratar la fibrosis quística que comprende la etapa de administrar a dicho mamífero una composición que comprende un compuesto de la presente invención.

[0091] Según la invención, una "cantidad eficaz" del compuesto o composición farmacéuticamente aceptable es la cantidad eficaz para tratar o disminuir la gravedad de una o más de las enfermedades, trastornos o condiciones como se menciona anteriormente.

[0092] Descrito con más detalle en el presente documento es un método de administración de una composición farmacéutica mediante la administración oral a un paciente al menos una vez por día de la composición que comprende un compuesto de Fórmula 1. Como se describe aquí, el método comprende administrar una composición farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula 1 cada 24 horas. Como se describe en este documento, el método comprende administrar una composición farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula 1 cada 12 horas. Como se describe en este documento, el método comprende administrar una composición farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula 1 tres veces al día. Como se describe en este documento, el método comprende administrar una composición farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula 1 cada 4 horas.

[0093] Los compuestos y composiciones, de acuerdo con el método de la presente invención, pueden administrarse usando cualquier cantidad y cualquier vía de administración eficaz para tratar o disminuir la gravedad de una o más de las enfermedades, trastornos o condiciones como se menciona anteriormente.

[0094] En ciertas realizaciones, los compuestos y composiciones de la presente invención son útiles para tratar o disminuir la gravedad de la fibrosis quística en pacientes que exhiben actividad CFTR residual en la membrana apical de los 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 la actividad CFTR utilizando técnicas electrofisiológicas *in vivo* o *ex vivo*, la medición de concentraciones Cl⁻ de sudor o saliva, o técnicas bioquímicas o histoquímicas *ex vivo* para controlar la densidad de la superficie celular. Usando tales métodos, la actividad de CFTR residual puede detectarse fácilmente en pacientes heterocigotos u homocigotos para una variedad de diferentes mutaciones, que incluyen pacientes homocigotos o heterocigotos para la mutación más común, $\Delta F508$.

[0095] En otra realización, los compuestos y composiciones de la presente invención son útiles para tratar o disminuir la gravedad de la fibrosis quística en pacientes que tienen actividad CFTR residual inducida o aumentada utilizando métodos farmacológicos o de terapia génica. Tales métodos aumentan la cantidad de CFTR presente en la superficie celular, induciendo de este modo una actividad de CFTR hasta ahora ausente en un paciente o aumentando el nivel existente de actividad de CFTR residual en un paciente.

[0096] En una realización, los compuestos y composiciones de la presente invención son útiles para tratar o disminuir la gravedad de la fibrosis quística en los pacientes dentro de ciertos genotipos que presentan actividad de CFTR residual, por ejemplo, mutaciones de clase III (de regulación o de compuerta deteriorada), mutaciones de clase IV (conductancia alterada), o mutaciones de clase V (síntesis reducida) (Lee R. Choo-Kang, Pamela L., Zeitlin, fibrosis quística de tipo I, II, III, IV y V Transmembrane Conductance Regulator Defects and Opportunities of Therapy; Current Opinion in Pulmonary Medicine 6: 521 - 529, 2000). Otros genotipos de pacientes que muestran actividad de CFTR residual incluyen pacientes homocigotos para una de estas clases o heterocigotos con cualquier otra clase de mutaciones, que incluyen mutaciones de clase I, mutaciones de clase II o una mutación que carece de clasificación.

[0097] En una realización, los compuestos y composiciones de la presente invención son útiles para tratar o disminuir la gravedad de la fibrosis quística en pacientes dentro de ciertos fenotipos clínicos, por ejemplo, un fenotipo clínico moderado a leve que por lo general se correlaciona con la cantidad de actividad de CFTR residual en la membrana apical del epitelio. Dichos fenotipos incluyen pacientes que presentan insuficiencia pancreática o pacientes diagnosticados con pancreatitis idiopática y ausencia bilateral congénita del conducto deferente o enfermedad pulmonar leve.

[0098] 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 preferiblemente en forma de unidad de dosificación para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. La expresión "forma de unidad de dosificación" como se usa en el presente documento se refiere a una unidad físicamente discreta de agente apropiada para el paciente a tratar. Se entenderá, sin embargo, que el uso diario total de los compuestos y composiciones de la presente invención será

decidido por el médico tratante dentro del alcance del buen criterio médico. El nivel de dosis efectivo específico para cualquier paciente u organismo particular dependerá de una variedad de factores que incluyen el trastorno que se trata y la gravedad del trastorno; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada; la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del paciente; el tiempo de administración, la vía de administración y la tasa de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; medicamentos usados en combinación o coincidentes con el compuesto específico empleado, y factores similares bien conocidos en las artes médicas. El término "paciente", como se usa en el presente documento, significa un animal, preferiblemente un mamífero, y lo más preferiblemente un ser humano.

[0099] Las composiciones farmacéuticamente aceptables de esta invención pueden administrarse a seres humanos y otros animales por vía oral, rectal, parenteral, intracisternal, intravaginal, intraperitoneal, tópica (como mediante polvos, ungüentos, gotas o parche), bucal, como un spray oral o nasal, o similar, dependiendo de la gravedad de la infección que se trata. En ciertas realizaciones, los compuestos de la invención se pueden administrar por vía oral o parenteral a niveles de dosificación de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg y preferiblemente de aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 25 mg/kg, del peso corporal del sujeto por día, una o más veces al día, para obtener el efecto terapéutico deseado.

[0100] Las formas de dosificación líquidas para administración oral incluyen, pero no se limitan a, emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además de los compuestos activos, las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes usados comúnmente en la técnica 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, semilla de algodón, maní, maíz, gérmenes, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurfurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán, y mezclas de los mismos. Además de los diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes edulcorantes, aromatizantes y perfumantes.

[0101] Las preparaciones inyectables, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles se pueden formular de acuerdo con la técnica conocida usando agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución, suspensión o emulsión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse están el agua, la solución de Ringer, la USP y la solución isotónica de cloruro de sodio. Además, los aceites fijos estériles se emplean convencionalmente como un disolvente o medio de suspensión. Para este fin, se puede emplear cualquier aceite fijo blando incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. Además, los ácidos grasos tales como el ácido oleico se usan en la preparación de inyectables.

[0102] Las formulaciones inyectables se pueden esterilizar, 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 su utilización.

[0103] Para prolongar el efecto de un compuesto de la presente invención, a menudo es deseable disminuir la absorción del compuesto de la inyección subcutánea o intramuscular. Esto puede lograrse mediante el uso de una suspensión líquida de material cristalino o amorfo con escasa solubilidad en agua. La velocidad de absorción del compuesto depende entonces de su velocidad 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 administrada por vía parenteral se logra disolviendo o suspendiendo el compuesto en un vehículo de aceite. Las formas de depósito inyectables se preparan formando matrices microencapsuladas del compuesto en polímeros biodegradables tales como polilactida-poliglicólido. Dependiendo de la relación de compuesto a polímero y la naturaleza del polímero particular empleado, se puede controlar la velocidad de liberación del compuesto. Los ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). Las formulaciones inyectables de depósito también se preparan atrapando el compuesto en liposomas o microemulsiones que son compatibles con los tejidos corporales.

[0104] Las composiciones para administración rectal o vaginal son preferiblemente supositorios que pueden prepararse mezclando los compuestos de esta invención con excipientes o vehículos no irritantes adecuados tales como manteca de cacao, polietilenglicol o una cera para supositorios que son sólidos a temperatura ambiente pero líquidos a temperatura corporal y, por lo tanto, se derriten en el recto o la cavidad vaginal y liberan el compuesto activo.

[0105] Las formas de dosificación sólidas para administración 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 inerte, farmacéuticamente aceptable tal como citrato sódico o fosfato dicálcico y/o a) cargas o extendedores tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y ácido silícico, b) aglutinantes tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y goma arábiga, c) humectantes tales como glicerol, d) agentes disgregantes tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido

algúnico, ciertos silicatos y carbonato de sodio, e) agentes retardadores de la solución tales como parafina, f) aceleradores de la absorción tales como compuestos de amonio cuaternario, g) agentes humectantes tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol; h) absorbentes tales como caolín y arcilla de bentonita, y i) lubricantes tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio y mezclas de los mismos. En el caso de cápsulas, tabletas y píldoras, la forma de dosificación también puede comprender agentes tamponantes.

[0106] Las composiciones sólidas de un tipo similar también se pueden emplear como cargas en cápsulas de gelatina rellenas blandas y duras usando excipientes tales como lactosa o azúcar de la leche así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares. Las formas de dosificación sólidas de tabletas, grageas, cápsulas, píldoras y gránulos se pueden preparar con revestimientos y cubiertas tales como revestimientos entéricos y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de formulación farmacéutica. Pueden contener opcionalmente agentes opacificantes y también pueden ser de una composición en la que liberan el (los) ingrediente(s) activo(s) solo(s), o preferentemente, en una cierta parte del tracto intestinal, opcionalmente, de forma retardada. Los ejemplos de composiciones de inclusión que se pueden usar incluyen sustancias poliméricas y ceras. También se pueden emplear 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 así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

[0107] Los compuestos activos también pueden estar en forma microencapsulada con uno o más excipientes como se ha indicado anteriormente. Las formas de dosificación sólidas de tabletas, grageas, cápsulas, píldoras y gránulos se pueden preparar con revestimientos y cubiertas tales como revestimientos entéricos, recubrimientos que controlan la liberación y otros revestimientos bien conocidos en la técnica de 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. Dichas formas de dosificación también pueden comprender, como es práctica normal, sustancias adicionales distintas de los diluyentes inertes, por ejemplo, lubricantes de formación de comprimidos y otros auxiliares de formación de comprimidos, tales como estearato de magnesio y celulosa microcristalina. En el caso de cápsulas, tabletas y píldoras, las formas de dosificación también pueden comprender agentes tamponantes. Pueden contener opcionalmente agentes opacificantes y también pueden ser de una composición en la que liberan el (los) ingrediente(s) activo(s) solo, o preferentemente, en una cierta parte del tracto intestinal, opcionalmente, de forma retardada. Los ejemplos de composiciones de inclusión que se pueden usar incluyen sustancias poliméricas y ceras.

[0108] Las formas de dosificación para administración tópica o transdérmica de un compuesto de esta invención incluyen pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, polvos, soluciones, pulverizaciones, inhalantes o parches. El componente activo se mezcla en condiciones estériles con un vehículo farmacéuticamente aceptable y cualquier conservante o tampón necesario según se requiera. La formulación oftálmica, gotas para los oídos y gotas para los ojos también se contemplan dentro del alcance de esta invención. Adicionalmente, la presente invención contempla el uso de parches transdérmicos, que tienen la ventaja adicional de proporcionar la administración controlada de un compuesto al cuerpo. Dichas formas de dosificación se preparan disolviendo o dispensando el compuesto en el medio apropiado. Los potenciadores de la absorción también pueden usarse para aumentar el flujo del compuesto a través de la piel. La velocidad puede controlarse proporcionando una membrana de control de la velocidad o dispersando el compuesto en una matriz o gel de polímero.

[0109] La actividad de un compuesto utilizado en esta invención como un modulador de CFTR puede ensayarse según los métodos descritos en general en la técnica y en los ejemplos de la presente memoria.

[0110] También se apreciará que los compuestos y composiciones farmacéuticamente aceptables de la presente invención se pueden emplear en terapias de combinación, es decir, los compuestos y composiciones farmacéuticamente aceptables pueden administrarse simultáneamente con, antes de, o posteriormente a, uno o más procedimientos terapéuticos o médicos deseados. La combinación particular de terapias (terapéuticas o procedimientos) para empleo en un régimen de combinación tendrá en cuenta la compatibilidad de los tratamientos y/o procedimientos terapéuticos deseados y el efecto terapéutico deseado a alcanzar. También se apreciará que las terapias empleadas pueden lograr un efecto deseado para el mismo trastorno (por ejemplo, un compuesto de la invención se puede administrar simultáneamente con otro agente usado para tratar el mismo trastorno), o pueden lograr diferentes efectos (por ejemplo, control de cualquier efecto adverso). Como se usa en el presente documento, los agentes terapéuticos adicionales que se administran normalmente para tratar o prevenir una enfermedad o afección particular se conocen como "apropiados para la enfermedad o afección que se trata".

[0111] En una realización, el agente adicional se selecciona de un agente mucolítico, broncodilatador, un agente anti-biótico, anti-infeccioso, un agente antiinflamatorio, un modulador CFTR distinto de un compuesto de la presente invención, o un agente nutricional.

[0112] En una realización, el agente adicional es un antibiótico. Los ejemplos de antibióticos útiles en la presente invención incluyen tobramicina, que incluye polvo inhalado de tobramicina (TIP), azitromicina, aztreonam, incluyendo la forma aerosolizada de aztreonam, ampicacina, incluyendo formulaciones liposomales de los mismos,

ciprofloxacina, incluyendo formulaciones de los mismos adecuadas para administración por inhalación, levofloxacina, incluyendo formulaciones aerosolizadas de las mismas, y combinaciones de dos antibióticos, por ejemplo, fosfomicina y tobramicina.

5 **[0113]** En otra realización, el agente adicional es un mucolítico. Los ejemplos de mucolíticos útiles en la presente incluyen Pulmozyme®.

[0114] En otra realización, el agente adicional es un broncodilatador. Ejemplos de broncodilatadores incluyen albuterol, sulfato de metaprotenerol, acetato de pirbuterol, salmeterol o sulfato de tetrabulina.

10 **[0115]** En otra realización, el agente adicional es eficaz para restaurar el líquido de la superficie de las vías respiratorias pulmonares. Tales agentes mejoran el movimiento de la sal dentro y fuera de las células, permitiendo que la mucosidad de las vías respiratorias del pulmón esté más hidratada y, por lo tanto, se aclare más fácilmente. Ejemplos de tales agentes incluyen solución salina hipertónica, denufosal tetrasódico ([[(3S, 5R)-5-(4-amino-2-oxopirimidina-1-ilo)-3-hidroxiolano-2-ilo]metoxi-hidroxifosforil] [[(2R, 3S, 4R, 5R)-5-(2,4-dioxopirimidina-1-ilo)-3, 4-dihidroxiolano-2-ilo]metoxi-hidroxifosforil]oxihidroxifosforil] hidrogenofosfato), o bronchitol (en formulación ligada de manitol).

20 **[0116]** En otra realización, el agente adicional es un agente antiinflamatorio, es decir, un agente que puede reducir la inflamación en los pulmones. Los ejemplos de tales agentes útiles en la presente incluyen ibuprofeno, ácido docosahecanoico (DHA), sildenafil, glutatión inhalado, pioglitazona, hidroxiclороquina o simvastatina.

25 **[0117]** En otra realización, el agente adicional es un modulador CFTR distinto del compuesto 1, es decir, un agente que tiene el efecto de modular la actividad CFTR. Ejemplos de tales agentes incluyen ataluren ("PTC124®"; ácido 3-[5-(2-fluorofenilo)-1,2,4-oxadiazol-3-ilo]benzoico), sinapultida, lancovutida, depelestat (un inhibidor de elastasa de neutrófilo recombinante humano), cobiprostona (7-[(2R, 4aR, 5R, 7aR)-2-[(3S)-1,1-difluoro-3-metilpentilo]-2-hidroxi-6-oxooctahidrociclopenta[b]pirano-5-ilo]ácido heptanoico) o ácido (3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-ilo)ciclopropanocarboxamido)-3-metilpiridina-2-ilo)benzoico. En otra realización, el agente adicional es ácido (3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-ilo)ciclopropanocarboxamido)-3-metilpiridina-2-ilo)benzoico.

30 **[0118]** En otra realización, el agente adicional es un agente nutricional. Ejemplos de tales agentes incluyen pancrelipasa (reemplazo de la enzima pancreática), incluyendo Pancrease®, Pancreacarb®, Ultrase® o Creon®, Liprotomase® (anteriormente Trizyte®), Aquadeks® o inhalación de glutatión. En una realización, el agente nutricional adicional es pancrelipasa.

35 **[0119]** La cantidad de agente terapéutico adicional presente en las composiciones de esta invención no será más que la cantidad que normalmente se administraría en una composición que comprende ese agente terapéutico como el único agente activo. Preferiblemente, la cantidad de agente terapéutico adicional en las composiciones descritas actualmente variará de aproximadamente 50% a 100% de la cantidad normalmente presente en una composición que comprende ese agente como el único agente terapéuticamente activo.

40 **[0120]** Los compuestos de esta invención o composiciones farmacéuticamente aceptables de los mismos también pueden incorporarse en composiciones para recubrir un dispositivo médico implantable, tales como prótesis, válvulas artificiales, injertos vasculares, stents y catéteres. Por consiguiente, la presente invención, en otro aspecto, incluye una composición para recubrir un dispositivo implantable que comprende un compuesto de la presente invención como se describe en general anteriormente, y en clases y subclases de la presente, y un vehículo adecuado para recubrir dicho dispositivo implantable. En otro aspecto más, la presente invención incluye un dispositivo implantable recubierto con una composición que comprende un compuesto de la presente invención como se describe en general anteriormente, y en clases y subclases de este documento, y un vehículo adecuado para recubrir dicho dispositivo implantable. Revestimientos adecuados y la preparación general de dispositivos implantables revestidos se describen en las patentes de los Estados Unidos 6.099.562; 5.886.026; y 5.304.121. Los revestimientos son típicamente materiales poliméricos biocompatibles tales como un polímero de hidrogel, polimetildisiloxano, policaprolactona, polietilenglicol, ácido poliláctico, acetato de vinilo de etileno y mezclas de los mismos. Los revestimientos pueden estar opcionalmente cubiertos adicionalmente por una capa superior adecuada de fluorosilicona, polisacáridos, polietilenglicol, fosfolípidos o combinaciones de los mismos para impartir características de liberación controlada en la composición.

55 **[0121]** Otro aspecto de la descripción se refiere a la modulación de la actividad de CFTR en una muestra biológica o un paciente (*in vitro*), método que comprende poner en contacto dicha muestra biológica con un compuesto de Fórmula I o una composición que comprende dicho compuesto. El término "muestra biológica", como se usa en este 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 fluidos corporales o extractos de los mismos.

60 **[0122]** La modulación de CFTR en una muestra biológica es útil para una variedad de propósitos que son conocidos por un experto en la técnica. Los ejemplos de tales propósitos incluyen, pero no se limitan al estudio de CFTR en fenómenos biológicos y patológicos; y la evaluación comparativa de nuevos moduladores de CFTR.

[0123] En otra realización más de la divulgación, se proporciona un método para modular la actividad de un canal aniónico *in vitro* que comprende la etapa de poner en contacto dicho canal con un compuesto de Fórmula I. En realizaciones preferidas de la divulgación, el canal aniónico es un canal de cloruro o un canal de bicarbonato. En otras realizaciones preferidas, el canal aniónico es un canal de cloruro.

[0124] La presente descripción proporciona un método para aumentar el 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 I.

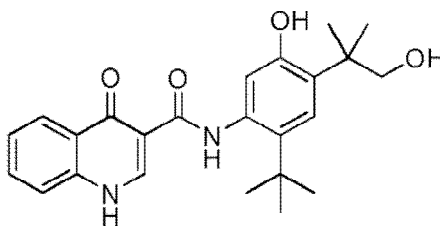
[0125] Según otra realización preferida de la descripción, la actividad del CFTR se mide al medir el potencial de voltaje de transmembrana. Los medios para medir el potencial de voltaje a través de una membrana en la muestra biológica pueden emplear cualquiera de los métodos conocidos en la técnica, tales como el ensayo del potencial de membrana óptica u otros métodos electrofisiológicos.

[0126] El ensayo potencial de membrana óptica utiliza sensores FRET sensibles al voltaje descritos por Gonzalez y Tsien (Véase, Gonzalez, JE y RY Tsien (1995) "Voltage sensing by fluorescence resonance energy transfer in single cells." Biophys J 69 (4): 1272-80, y Gonzalez, JE y RY 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 cambios de fluorescencia tales como el lector de sonda de voltaje/iones (VIPR) (Véase, González, JE, K. Oades, y otros (1999) "Cell-based assays and instrumentation for screening ion-channel targets" Drug Discov Today 4 (9): 431-439).

[0127] Estos ensayos sensibles al voltaje se basan en el cambio en la transferencia de energía resonante de fluorescencia (FRET) entre el colorante sensible a la tensión soluble en la membrana, DiSBAC₂(3), y un fosfolípido fluorescente, CC2-DMPE, que está unido a la valva externa de la membrana plasmática y actúa como donador de FRET. Los cambios en el potencial de membrana (V_m) hacen que el DiSBAC₂(3) con carga negativa se redistribuya a través de la membrana plasmática y la cantidad de transferencia de energía de CC2-DMPE cambia en consecuencia. Los cambios en la emisión de fluorescencia se pueden controlar usando VIPR™ II, que es un controlador de líquidos integrado y un detector fluorescente diseñado para realizar pantallas basadas en células en placas de microtitulación de 96 o 384 pocillos.

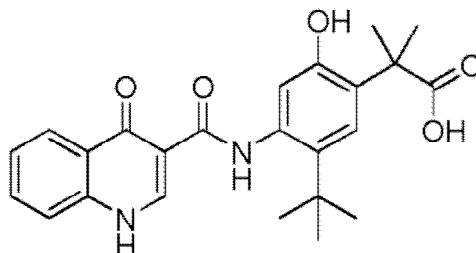
[0128] Aquí se describe un método para modular la actividad CFTR en una muestra biológica que comprende la etapa de poner en contacto dicha muestra biológica con un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde R se define como anteriormente.

[0129] Aquí se describe un método *in vitro* para modular la actividad de CFTR en una muestra biológica que comprende la etapa de poner en contacto dicha muestra biológica con un compuesto de la estructura:



o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

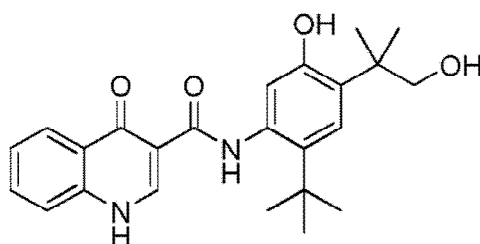
[0130] Aquí se describe un método *in vitro* para modular la actividad de CFTR en una muestra biológica que comprende la etapa de poner en contacto dicha muestra biológica con un compuesto de la estructura:



o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

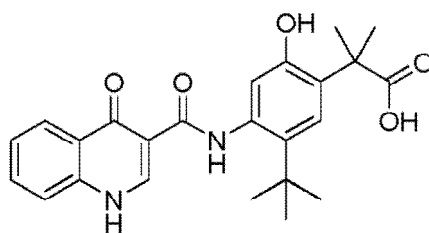
[0131] En una realización, la presente invención proporciona una cantidad efectiva de un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde R se define como anteriormente para uso en un método para tratar o disminuir la gravedad de una enfermedad en un paciente y dicha enfermedad se selecciona de fibrosis quística, asma, EPOC inducida por humo, bronquitis crónica, rinosinusitis, estreñimiento, pancreatitis, insuficiencia pancreática, infertilidad masculina causada por ausencia congénita bilateral del conducto deferente (CBAVD), enfermedad pulmonar leve, pancreatitis idiopática, aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA), enfermedad hepática, enfisema hereditario, hemocromatosis hereditaria, deficiencias de coagulación y fibrinólisis, como deficiencia de proteína C, angioedema hereditario de tipo 1, deficiencias de procesamiento de lípidos, como hipercolesterolemia familiar, quilomicronemia de tipo 1, abetalipoproteinemia, enfermedades de almacenamiento lisosomal, tal como enfermedad de células I/pseudo-Hurler, mucopolisacaridosis, Sandhof/Tay-Sachs, Crigler-Najjar tipo II, poliendocrinopatía/hiperinsulinemia, diabetes mellitus, enanismo de Laron, deficiencia de mieloperoxidasa, hipoparatiroidismo primario, melanoma, glicanosis CDG tipo 1, hipertiroidismo congénito, osteogénesis imperfecta, hipofibrinogenemia hereditaria, deficiencia de ACT, diabetes insípido (DI), DI neurohipofisario, DI nefrótico, síndrome de Charcot-Marie Tooth, enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher, enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, parálisis supranuclear progresiva, enfermedad de Pick, varios trastornos neurológicos de la poliglutamina como Huntington, ataxia espinocerebelosa tipo I, atrofia muscular espinal y bulbar, atrofia pallidoluisiana dentatorubral y distrofia miotónica, así como encefalopatías espongiiformes, como enfermedad hereditaria de Creutzfeldt-Jakob (debido a un defecto en el procesamiento de la proteína priónica), enfermedad de Fabry, síndrome de Gertsman-Sträussler-Scheinker, EPOC, enfermedad del ojo seco o enfermedad de Sjogren.

[0132] Como se describe en este documento, el método incluye tratar o disminuir la gravedad de una enfermedad en un paciente administrando a dicho paciente una cantidad efectiva de un compuesto que tiene la estructura:



o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

[0133] Como se describe, el método incluye tratar o disminuir la gravedad de una enfermedad en un paciente administrando a dicho paciente una cantidad efectiva de un compuesto que tiene la estructura:



o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

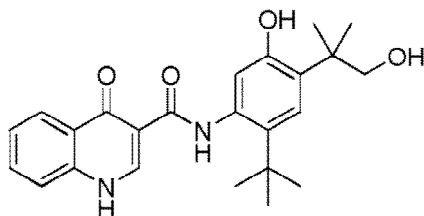
[0134] En una realización adicional, la enfermedad es fibrosis quística.

[0135] En otro aspecto, la presente invención proporciona un kit para uso en la medición de 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 I o cualquiera de las realizaciones anteriores; e (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.

[0136] 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 del CFTR en presencia del compuesto adicional con la densidad del CFTR en presencia de dicha composición que comprende un compuesto de Fórmula I.

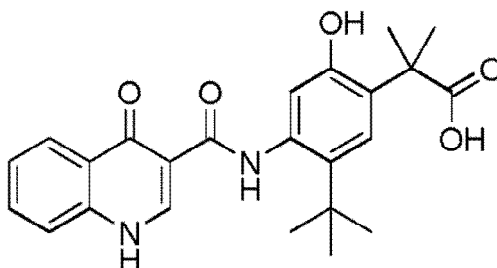
[0137] En realizaciones preferidas, el kit se usa para medir la densidad de CFTR.

[0138] En una realización, el kit incluye una composición que comprende un compuesto que tiene la estructura:



o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

[0139] En una realización, el kit incluye una composición que comprende un compuesto que tiene la estructura:



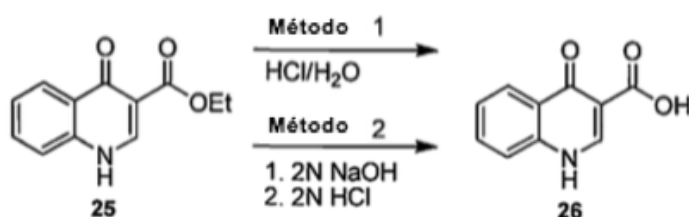
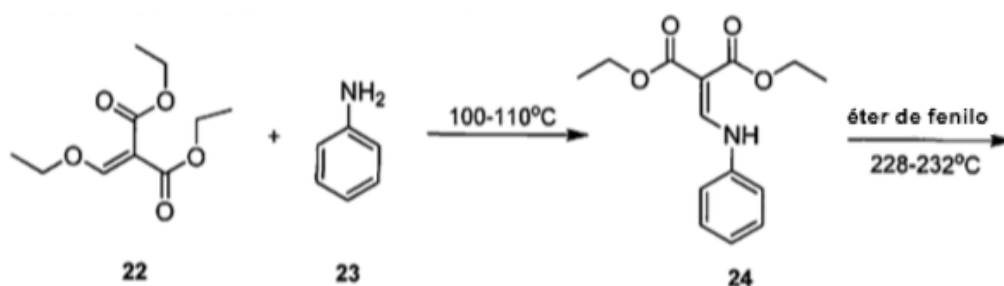
o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

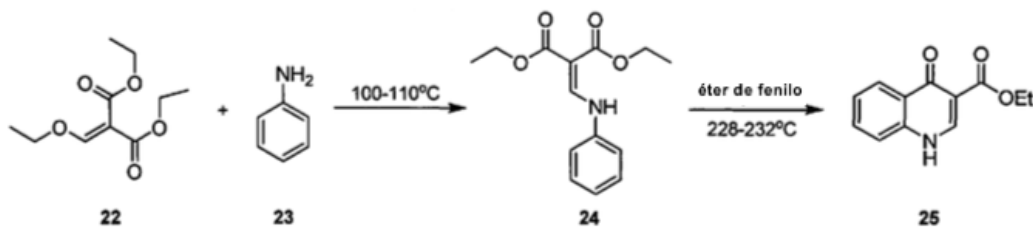
[0140] Para que la invención descrita en este documento pueda entenderse más completamente, se exponen los siguientes ejemplos. Debe entenderse que estos ejemplos son solo para fines ilustrativos y no deben interpretarse como limitativos de esta invención de ninguna manera.

EJEMPLOS

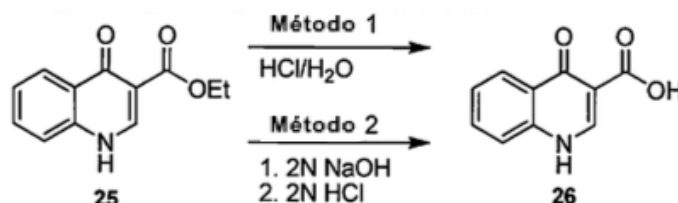
Preparación 1: *Síntesis total de ácido 4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico (26)*

[0141]



Procedimiento para la preparación de 4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxilato de etilo (25)**[0142]**

[0143] Compuesto **23** (4,77 g, 47,7 mmol) se añadió gota a gota al compuesto **22** (10 g, 46,3 mmol) con flujo N_2 subsuperficial para expulsar a etanol por debajo de 30°C durante 0,5 horas. La solución luego se calentó a 100-110°C y se agitó durante 2,5 horas. Después de enfriar la mezcla a menos de 60°C, se añadió éter difenílico. La solución resultante se añadió gota a gota a éter difenílico que se había calentado a 228-232°C durante 1,5 horas con flujo subsuperficial de N_2 para expulsar el etanol. La mezcla se agitó a 228-232°C durante otras 2 horas, se enfrió por debajo de 100°C y luego se añadió heptano para precipitar el producto. La suspensión espesa resultante se agitó a 30°C durante 0,5 horas. Los sólidos se filtraron después, y la torta se lavó con heptano y se secó a vacío para dar el compuesto **25** como un sólido marrón. 1H RMN (DMSO- d_6 ; 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).

Procedimiento para la preparación de ácido 4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico (26)**[0144]****Método 1**

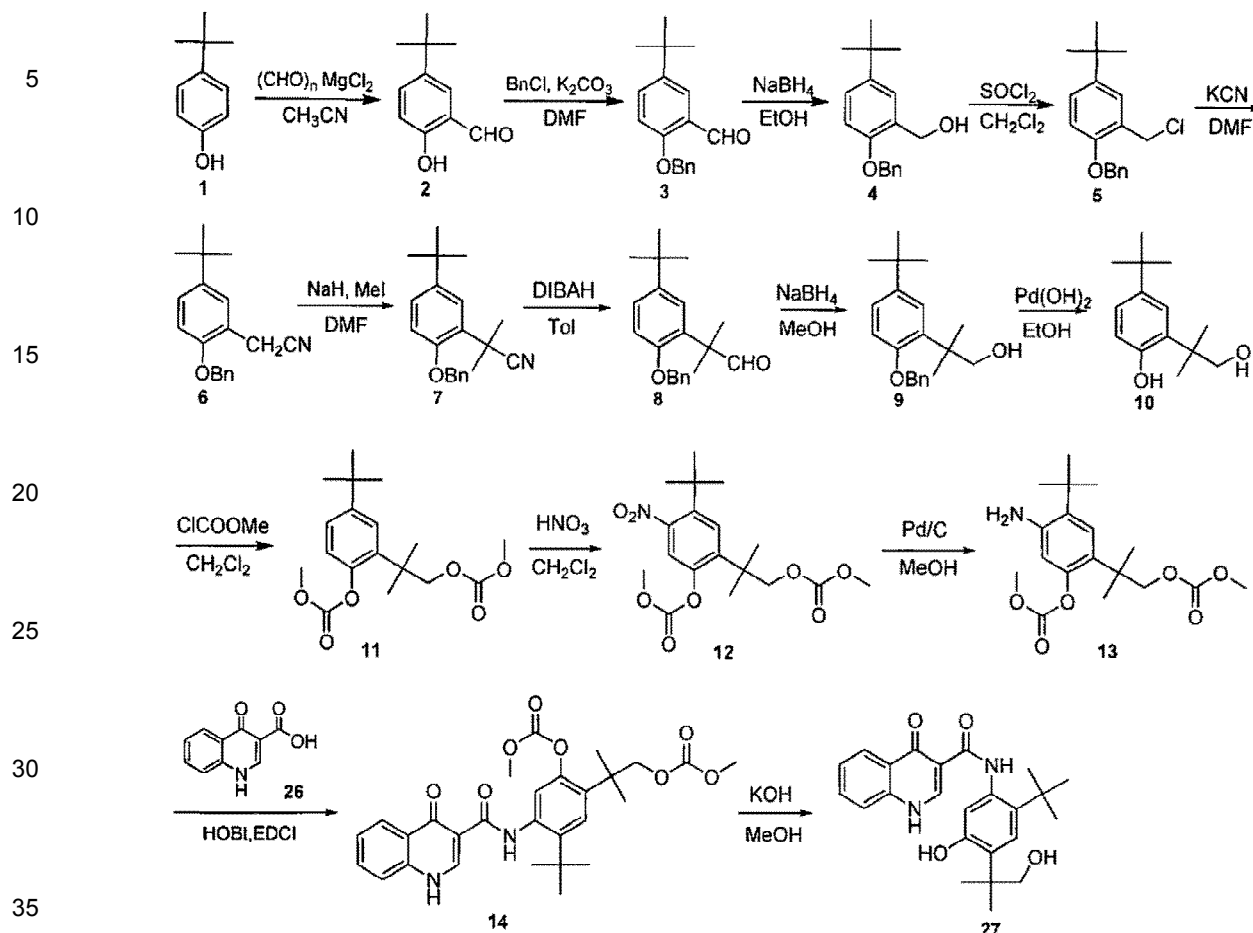
[0145] Compuesto **25** (1,0 eq) se suspendió en una solución de HCl (10,0 eq) y H_2O (11,6 vol). La suspensión se calentó a 85 - 90°C, aunque las temperaturas alternativas también son adecuadas para esta etapa de hidrólisis. Por ejemplo, la hidrólisis puede realizarse alternativamente a una temperatura 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 agitarse a 85 - 90°C durante aproximadamente 6,5 horas, se tomaron muestras de la reacción para completar la reacción. La agitación puede realizarse bajo cualquiera de las temperaturas adecuadas para la hidrólisis. La solución se enfrió luego a 20 - 25°C y se filtró. El reactor/torta se aclaró con H_2O (2 vol x 2). La torta se lavó luego con 2 vol H_2O hasta pH $\geq$ 3,0. La torta se secó luego a vacío a 60°C para dar el compuesto **26**.

Método 2

[0146] Compuesto **25** (11,3 g, 52 mmol) se añadió a una mezcla de 10% de NaOH (ac) (10 mL) y etanol (100 mL). La solución se calentó a reflujo durante 16 horas, se enfrió a 20-25°C y luego el pH se ajustó a 2-3 con 8% de HCl. La mezcla se agitó luego durante 0,5 horas y se filtró. La torta se lavó con agua (50 mL) y luego se secó a vacío para dar el compuesto **26** como un sólido marrón. 1H RMN (DMSO- d_6 ; 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).

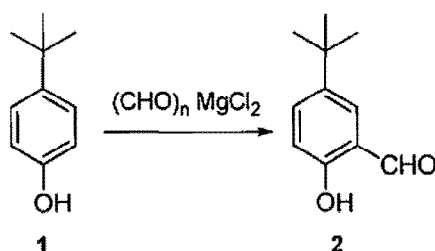
Ejemplo 1: Síntesis total de N-(2-terc-butilo-5-hidroxi-4-(1-hidroxi-2-metilpropan-2-ilo)fenilo)-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida (27)

[0147] El esquema general de la síntesis del compuesto **27** se muestra a continuación, seguido por el procedimiento para la síntesis de cada intermedio sintético.



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

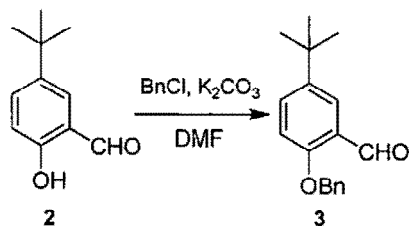
[0148]



[0149] A una solución agitada de compuesto 1 (700 g, 4,66 mol) en CH_3CN (7,0 L) se añadió MgCl_2 (887 g, 9,32 mol), para-formaldehído (1,190 g) y TEA (2,5 L, 17,9 mol) en atmósfera de N_2 . 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 3 M HCl (ac). La suspensión se dejó en agitación hasta que la solución se volvió transparente. La capa orgánica se separó y la capa acuosa se extrajo con MTBE (3 Lx3). Las capas orgánicas se combinaron y se concentraron a sequedad. El residuo se disolvió en MTBE (4000 mL), se lavó con agua (1000 mLx2) y salmuera (1000 mL), se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró, luego se concentró para dar el compuesto 2 como un sólido de color amarillo claro que se usó en la siguiente reacción sin más secado o purificación. ^1H RMN (CDCl_3 ; 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)

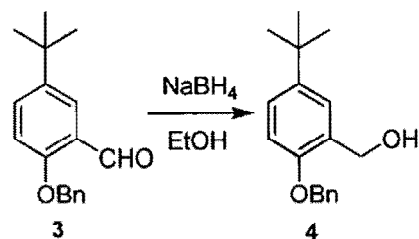
[0150]



[0151] A una solución agitada del compuesto **2** (614,5 g, 3,33 mol) en DMF (3,5 L) se añadió K_2CO_3 (953 g, 6,90 mol) y cloruro de bencilo (480 g, 3,80 mol). La mezcla se calentó a 90°C y se dejó en agitación durante 3 horas. La suspensión se enfrió a temperatura ambiente, luego se añadió MTBE (2 L), seguido de agua (12 L). La mezcla se agitó después durante 10 minutos y la capa acuosa se separó y se extrajo con MTBE (2 Lx3). Las capas orgánicas se combinaron y se lavaron con agua (2 Lx2) y salmuera (1,5 L X 1) y se concentraron para dar el compuesto **3** como un sólido amarillo claro. ^1H RMN (DMSO-d_6 ; 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-butilbencílico (4)

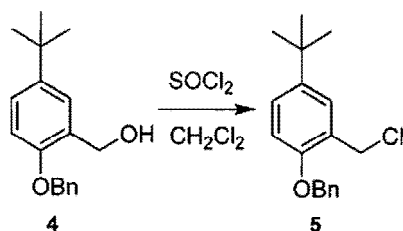
[0152]



[0153] A una suspensión agitada del compuesto **3** (974 g, 3,63 mol) en MeOH (4000 mL) se añadió lentamente NaBH_4 (121 g, 3,20 mol) a $0-20^\circ\text{C}$. La solución se dejó en agitación a 15°C durante 3 horas, y luego se enfrió a 0°C . Se añadió 2N HCl (ac) (1300 mL) gota a gota a menos de 20°C . La solución se filtró luego y se evaporó a sequedad, y el residuo se disolvió en MTBE (5 L). La solución se lavó luego con agua (2 Lx2) y salmuera (1,5 L X 1). La evaporación del disolvente dio el compuesto **4** como un sólido amarillo claro que se usó en la siguiente reacción sin purificación adicional. ^1H RMN (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).

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

[0154]



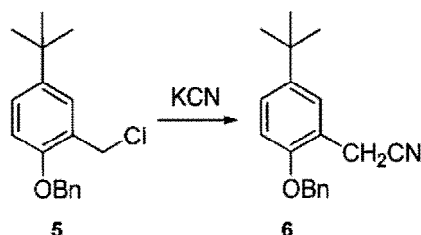
[0155] A una solución agitada de compuesto **4** (963 g, 3,56 mol) en DCM anhidro (2000 mL) se añadió lentamente SOCl_2 (535 g, 4,5 mol) a 0°C . La mezcla se agitó a 20°C durante 2 horas, luego se concentró a vacío para dar el compuesto **5** como un aceite, que se usó en la siguiente reacción sin más secado o purificación.

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

[0156]

5

10



15

[0157] A una solución agitada del compuesto **5** (1045 g, 3,54 mol) en DMF anhidro (1000 mL) se le añadió KCN (733 g, 11,3 mol). 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. La capa orgánica se separó luego y la capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (3000 mL X 2). Las capas orgánicas se combinaron y se lavaron con agua (4 Lx2) y salmuera (3 Lx1), luego se concentraron *a vacío* para dar el compuesto **6** como un sólido amarillo. ¹H RMN (DMSO-d₆; 400 MHz) δ 7,51 (m), δ 7,37 (m), 7,02 (d), δ 5,17 (s), δ 3,88 (s), 1,26 (s).

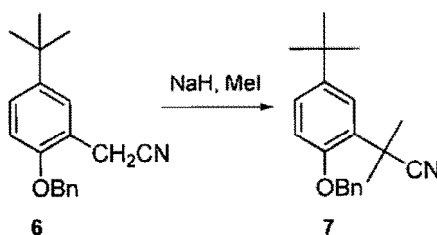
20

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

[0158]

25

30



35

40

[0159] A una suspensión agitada de NaH (86 g, 2,15 moles, 60% en aceite mineral) en DMF (1000 mL) se añadió gota a gota una solución del compuesto **6** (100,0 g, 0,358 mol) en DMF (500 mL) a 20°C. Después de agitarse durante 30 minutos, se añadió MeI (205 g, 1,44 moles) en DMF (500 mL) gota a gota a menos de 30°C durante un período de 2 horas. La suspensión se agitó durante 1,5 horas a 25-30°C, luego se añadió hielo (100 g) lentamente hasta que no se generó gas. El pH se ajustó a aproximadamente 7 mediante la adición lenta de 2N HCl. La mezcla se diluyó con agua (4 L) y MTBE (2 L). La capa orgánica se separó y la capa acuosa se extrajo con MTBE (500 mLx2). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua y salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y después se concentraron *a vacío* para dar el compuesto **7** como un sólido blanco. ¹H RMN (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)

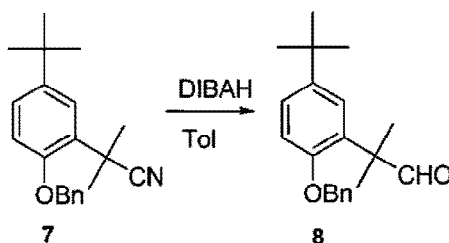
45

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

[0160]

50

55



60

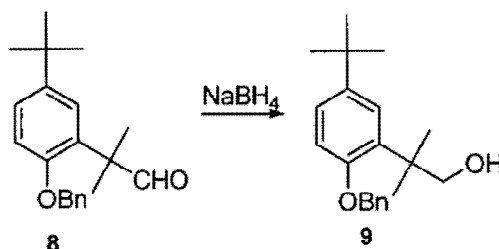
65

[0161] A una solución agitada del compuesto **7** (20 g, 0,065 mol) en tolueno (300 mL), se añadió gota a gota DIBALH (80 mL, 1 M en tolueno) a aproximadamente -60 a -50°C. Después de agitarse durante 2 horas, se añadió 6 N HCl (300 mL) a la mezcla de reacción y se continuó la agitación durante 30 minutos. A continuación, se separó la capa orgánica, se lavó con 2 N HCl seguido de una solución NaHCO₃, a continuación, una solución de salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró *a vacío* para proporcionar el compuesto **8** como un aceite. El producto se usó en la siguiente reacción sin purificación adicional. ¹H RMN (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-butilfenilo)-2-metilpropano-1-ol (9)

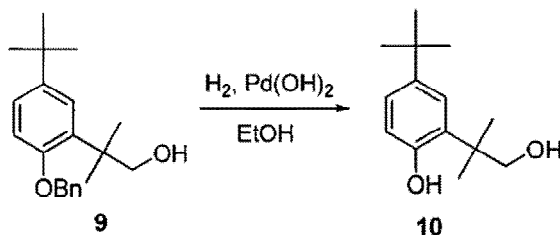
[0162]



[0163] A una solución en agitación del compuesto **8** (9,21 g, 0,030 mol) en MeOH (150 mL) se añadió lentamente NaBH_4 (2,3 g, 0,061 mol) a 0°C. Después de agitar la mezcla a 20°C durante 3 horas, se añadieron 12 mL de 6 N HCl y la mezcla se agitó durante 30 minutos adicionales. La solución luego se concentró a aproximadamente un cuarto del volumen original y se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se separó y se lavó con agua y salmuera, se secó con Na_2SO_4 , se filtró, y después se concentró *a vacío* para proporcionar el compuesto **9** como un sólido blanco. ^1H RMN (DMSO- d_6 ; 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-butilfenilo)-2-metilpropano-1-ol (10)

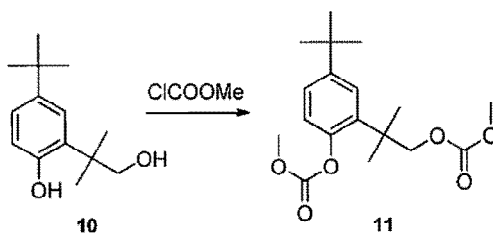
[0164]



[0165] Se agitó $\text{Pd}(\text{OH})_2$ (1 g) y el compuesto **9** (9,26 g, 0,030 mol) en MeOH (200 mL) en hidrógeno a una presión de 20-30 psi durante 16-18 horas. La mezcla luego se filtró a través de Celite®, y el filtrado se concentró para dar el compuesto **10** como un sólido blanco. ^1H RMN (DMSO- d_6 ; 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-metilpropano-2-ilo)-4-terc-butilbenceno (11)

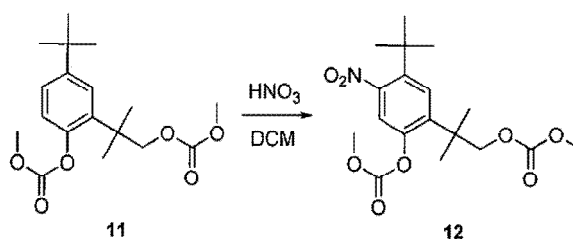
[0166]



[0167] A una solución agitada del compuesto **10** (23,2 g, 0,10 mol), DMAP (1,44 g) y DIEA (72,8 g, 0,56 mol) en DCM anhidro (720 mL) se añadió gota a gota cloroformiato de metilo (43,5 g, 0,46 mol) en DCM (160 mL) a 0°C. Después la mezcla se agitó a 20°C durante 16 horas, se lavó con agua, 1 N HCl y salmuera, se secó con MgSO_4 y se concentró *a vacío*. El residuo se purificó usando cromatografía en columna sobre gel de sílice (1:20 de EtOAc: éter de petróleo) para dar el compuesto **11** como un sólido blanco. ^1H RMN (DMSO- d_6 ; 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).

Procedimiento para la preparación de 1-((metilcarboxi)oxi)-2-(1-((metilcarboxi)oxi)-2-metilpropano-2-ilo)-4-terc-butilo-5-nitro-benceno (12)

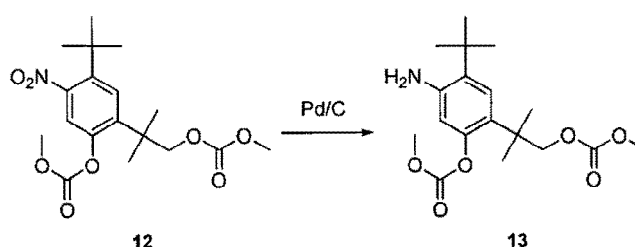
[0168]



[0169] A una solución agitada de compuesto **11** (32 g, 0,095 mol) en DCM (550 mL) se añadió gota a gota 98% H_2SO_4 (43 g, 0,43 mol) a 0°C . Después de agitarse durante 20 minutos a 0°C , 65% HNO_3 (16,2 g, 0,17 mol) se añadió a la mezcla gota a gota a 0°C . La mezcla se agitó después a $1-10^\circ\text{C}$ durante 4 horas y luego se añadió agua helada (200 mL). La capa acuosa se separó y se extrajo con DCM (200 mL X 3) y las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (ac), NaHCO_3 y salmuera, luego se secaron con MgSO_4 y se concentraron *al vacío*. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (EtOAc 1:20: éter de petróleo) para proporcionar el compuesto **12** en bruto como un aceite.

Procedimiento para la preparación de 2-terc-butilo-5-((metilcarboxi)oxi)-4-(1-((metilcarboxi)oxi)-2-metilpropano-2-ilo) anilina (13)

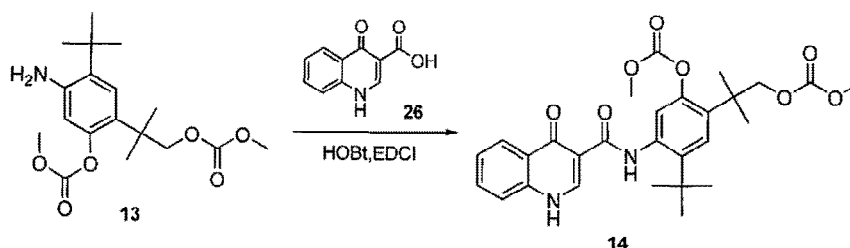
[0170]



[0171] Pd/C (2,6 g) y el compuesto **12** (14 g, en bruto) se agitaron en MeOH (420 mL) a temperatura ambiente bajo hidrógeno a 20-30 psi de presión durante 16-18 horas. La mezcla luego se filtró con kieselguhr®, y el filtrado se concentró *al vacío*. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (EtOAc 1:10: éter de petróleo) para dar el compuesto **13** como un sólido gris. ^1H RMN (CDCl_3 ; 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)

Procedimiento para la preparación de N-(2-terc-butilo-5-((metilcarboxi)oxi)-4-(1-((metilcarboxi)oxi)-2-metilo-propano-2-ilo)fenilo)-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida (14)

[0172]

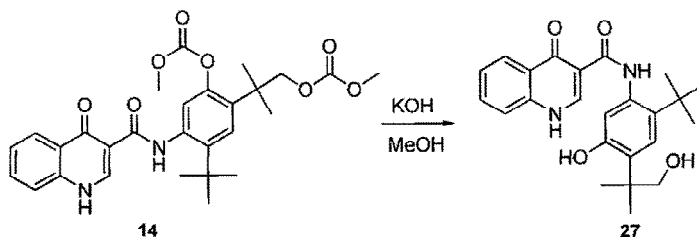


[0173] Se añadió EDCI (5,6 g, 0,029 mol), HOBT (3,8 g, 0,028 mol) y DIEA (6,6 g, 0,051) a una solución agitada del compuesto **26** (5,0 g, 0,026 mol) en DMF anhidro (120 mL) a 0°C . Después de agitarse durante 1 hora, la mezcla se añadió gota a gota a una solución del compuesto **13** (3,0 g, 0,008 mol) en DCM (30 mL) a 0°C . La mezcla se agitó a 25°C durante 72 horas, y luego se concentró *al vacío*. El residuo se disolvió en EtOAc (225 mL) y se lavó

con agua (120 ml X 1), 1N HCl (120 mL) y salmuera, se secó con Na₂SO₄ y se concentró *al vacío*. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (EtOAc: éter de petróleo 1:1) para dar el compuesto **14** como un sólido blanco. ¹H RMN (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, 1 H), 7,39 (s, 1 H), 6,72 (s, 1 H), 4,34 (s, 2 H), 3,82 (s, 3 H), 3,74 (s, 3 H), 1,41 (s, 9 H), 1,40 (s, 6 H).

Procedimiento para la preparación de N-(2-terc-butilo-5-hidroxi-4-(1-hidroxi-2-metilpropano-2-ilo)fenilo)-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida (27)

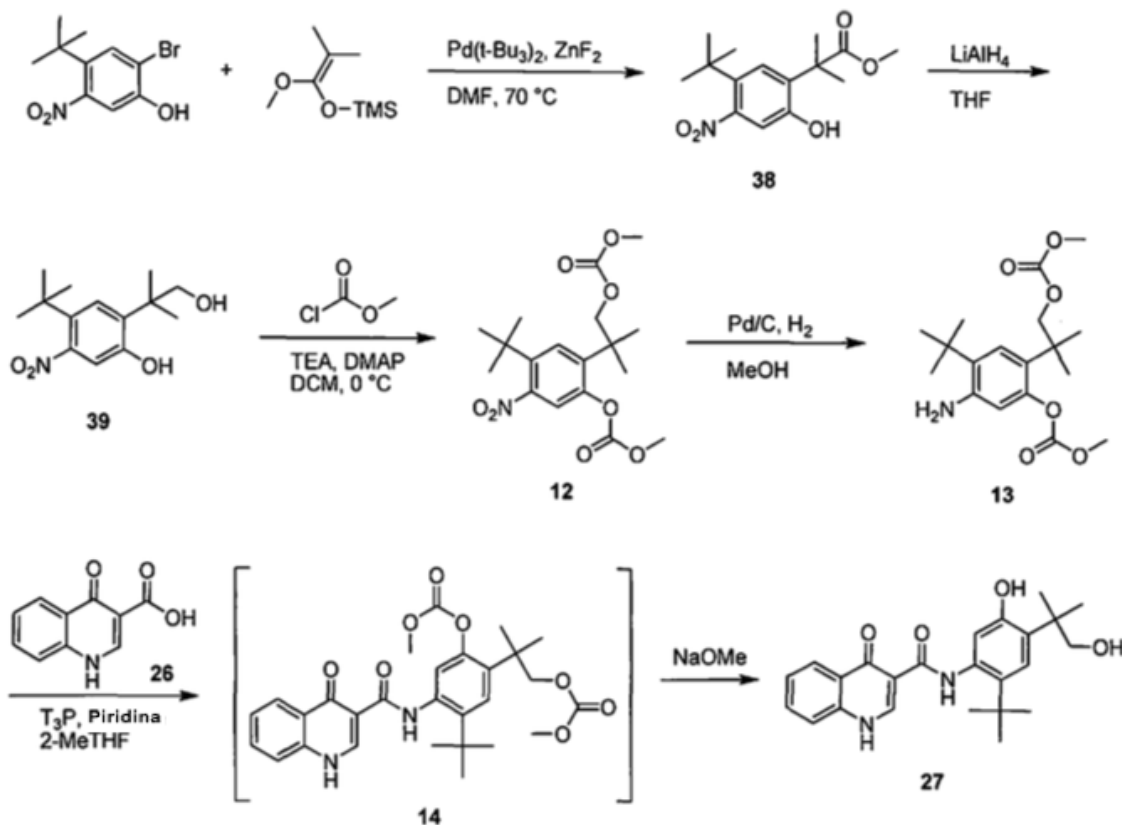
[0174]



[0175] A una solución agitada de KOH (1,2 g, 0,02 mol) en MeOH (80 mL) se añadió el compuesto **14** (1,9 g, 0,0036 mol) a 0°C. Después de agitarse durante 2-3 h a 5-15°C, la mezcla se concentró a sequedad. El residuo se trituro luego en agua (10 mL), se filtró, se lavó con DCM y se secó *a vacío* durante 24 horas para dar el compuesto **27** como un sólido blanco. ¹H RMN (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). MS Encontrado (M + H) 409,2

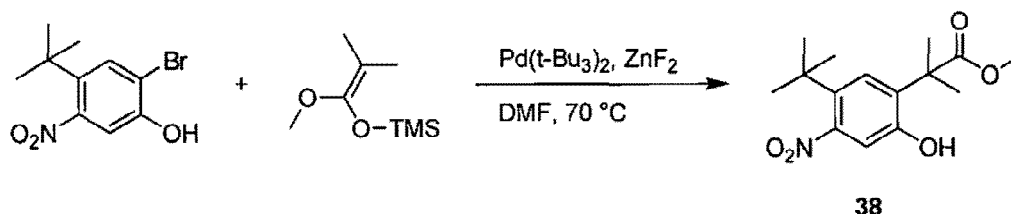
Ejemplo 2: Síntesis Total Alternativa de N-(2-terc-butilo-5-hidroxi-4-(1-hidroxi-2-metilpropano-2-ilo)fenilo)-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida (27)

[0176]



Procedimiento para la preparación de 2-(5-terc-butilo-2-hidroxi-4-nitrofenilo)-2-metilpropanoato de metilo (38):

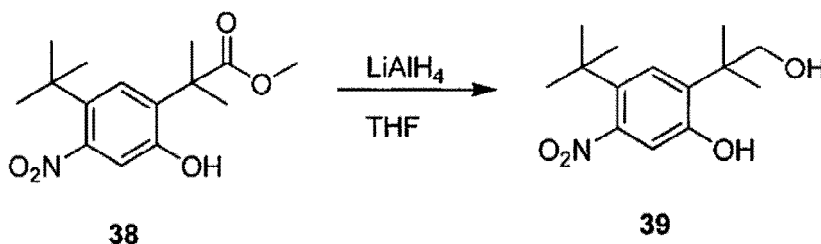
[0177]



[0178] Una mezcla de 2-bromo-4-terc-butilo-5-nitrofenol (15,00 g, 54,72 mmol), bis(tri-terc-butilfosfano)paladio(O) (1,422 g, 2,783 mmol), fluoruro de zinc (2,82 g, 27,27 mmol), metilo trimetilsililo dimetilcetena acetal (MTDA) (19,35 g, 111,0 mmol) 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 agitarse durante una hora, la fase acuosa se extrajo con MTBE. La fase orgánica se secó a vacío para proporcionar el producto bruto como un sólido marrón. La purificación del producto se realizó mediante trituración en n-heptano. ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) 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)

Procedimiento para la preparación de 4-terc-butilo-2-(1-hidroxi-2-metilpropano-2-ilo)-5-nitrofenol (39):

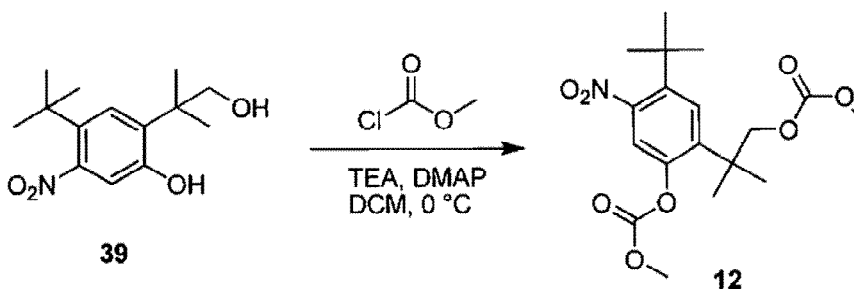
[0179]



[0180] Una solución 1M de hidruro de litio y aluminio en THF (11,80 mL, 11,80 mmol) se añadió a una solución de 2-(5-terc-butilo-2-hidroxi-4-nitrofenilo)-2-metilpropanoato (5,36 g, 18,15 mmol) en THF (50 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 h, y luego se diluyó con metanol. La mezcla se acidificó con 1N HCl (pH 1-2) y la fase acuosa se extrajo con MTBE. La fase orgánica se secó a vacío para proporcionar 4-terc-butilo-2-(1-hidroxi-2-metilpropano-2-ilo)-5-nitrofenol que se usó sin purificación adicional en la siguiente etapa. ¹H-NMR (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, 6 H)

Procedimiento para la preparación de carbonato de 4-terc-butilo-2-(2-metoxycarbonilo-1,1-dimetilo-etilo)-5-nitro-fenilo] metilo (12)

[0181]

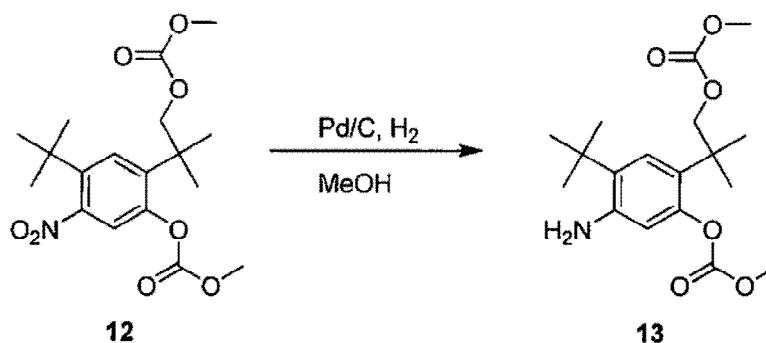


[0182] A una solución de 4-terc-butilo-2-(1-hidroxi-2-metilpropano-2-ilo)-5-nitrofenol (1,92 g, 7,18 mmol), trietilamina (1,745 g, 17,24 mmol), y dimetilaminopiridina (87,74 mg, 0,718 mmol) en diclorometano (30 mL) a 0°C se cargó

lentemente con cloroformiato de metilo (2,376 g, 25,14 mmol), manteniendo 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 1N HCl (pH 1-2). La fase acuosa se extrajo con DCM y los extractos orgánicos combinados se secaron *al vacío*. El semisólido ámbar bruto se recristalizó en metanol y diclorometano para dar el compuesto del título como un sólido cristalino amarillo. ¹H-RMN (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, 9 H); 1,35 (s, 6 H)

Procedimiento para la preparación de carbonato de 5-amino-4-terc-butilo-2-(2-metoxycarboniloxi-1,1-dimetilo-etilo)fenilo] metilo (13):

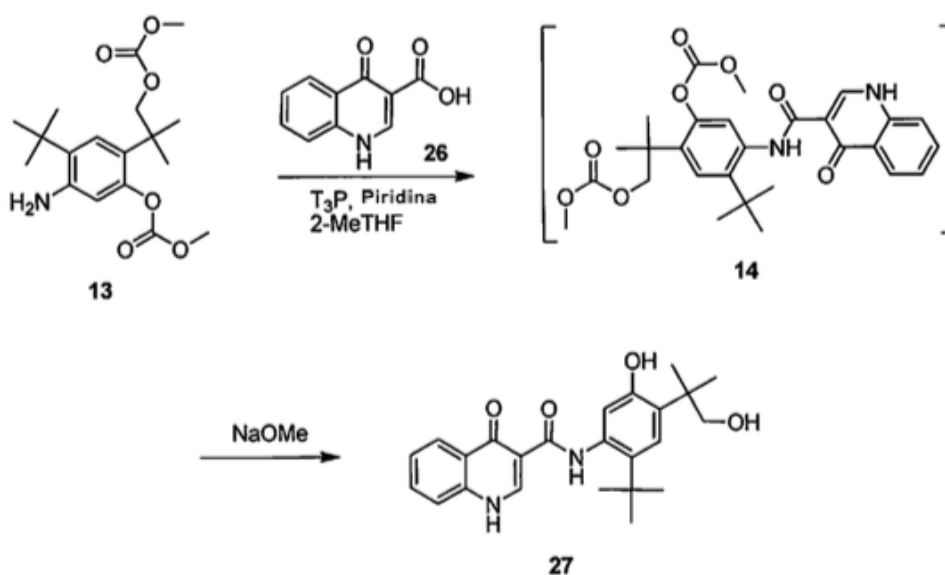
[0183]



[0184] Una mezcla de carbonato de [4-terc-butilo-2-(2-metoxycarboniloxi-1,1-dimetilo-etilo)-5-nitrofenilo] metilo (1,27 g, 3,313 mmol) y Pd/C (75 mg, 0,035 mmol) en metanol (50 mL) se purgó con nitrógeno. Después de purgar el matraz con hidrógeno, la mezcla se hidrogenó durante 18 horas a temperatura y presión ambiente. La solución se filtró a través de Celite® y se secó *a vacío* para obtener el producto como un sólido. ¹H-RMN (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, 6 H)

Procedimiento para la preparación de N-(2-terc-butilo-5-hidroxi-4-(1-hidroxi-2-metilpropano-2-ilo)fenilo)-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida (27):

[0185]

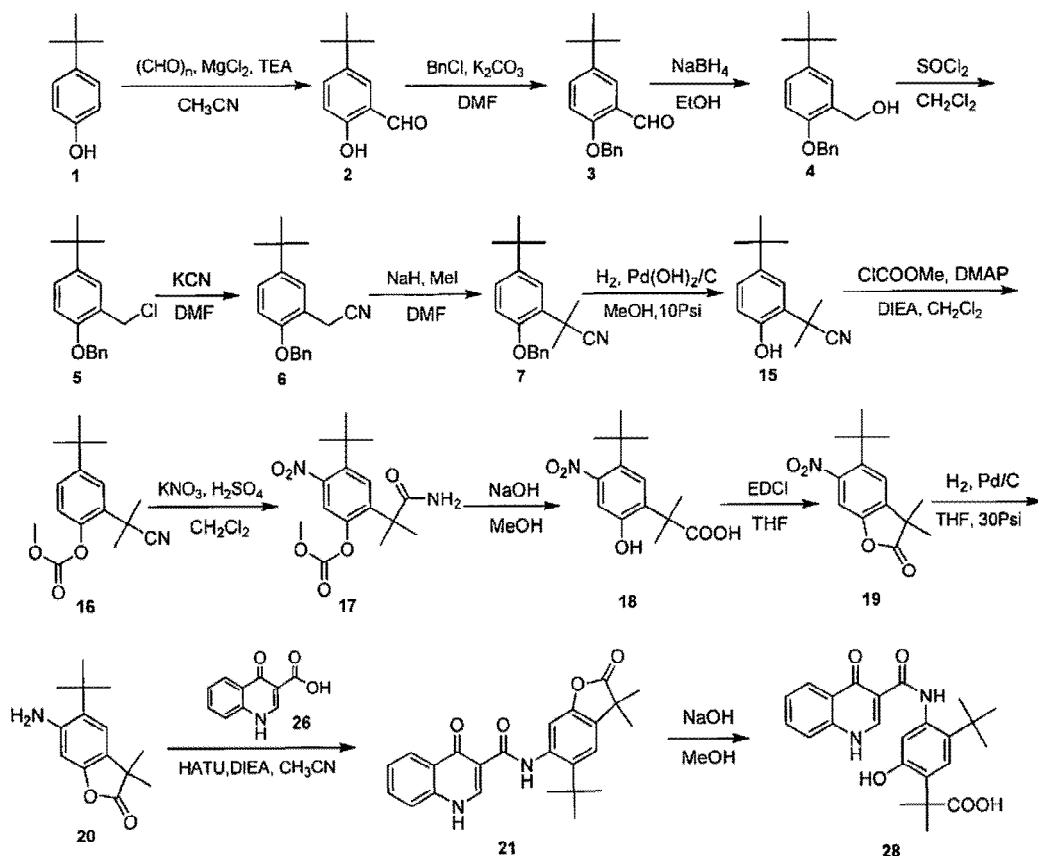


[0186] A una mezcla de carbonato de [5-amino-4-terc-butilo-2-(2-metoxycarboniloxi-1,1-dimetilo-etilo)fenilo] metilo (103 mg, 0,29 mmol), ácido 4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico (50 mg, 0,26 mmol), y piridina (42 mg, 0,53 mmol) en 2-MeTHF (3.0 mL) se cargó T3P como una solución al 50% en peso en 2-MeTHF (286 mg, 0,45 mmol). 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. Metóxido de sodio (39 mg, 0,72 mmol) se cargó a la fase orgánica y la solución se agitó durante 2 horas. La reacción se inactivó con 1N HCl, y después de separar las fases, la fase orgánica se lavó con 0,1N HCl. La fase orgánica se secó *in vacuo* para producir el Compuesto **27** como un sólido. El espectro ¹H-RMN fue consistente con el reportado anteriormente.

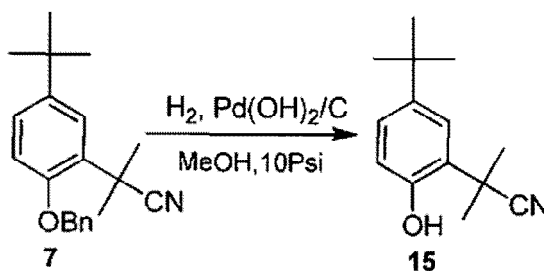
Ejemplo 3: Síntesis total de ácido 2-(5-terc-butilo-2-hidroxi-4-(4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamido)fenilo)-2-metilpropanoico (28):

[0187]



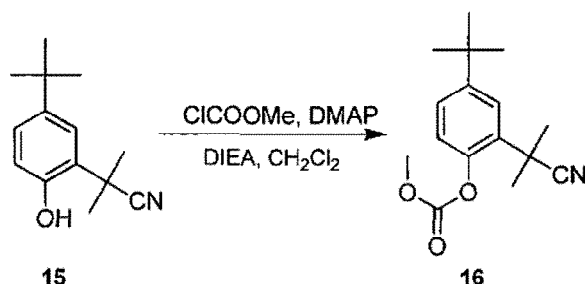
Procedimiento para la preparación de 2-(5-terc-butilo-2-hidroxifenilo)-2-metilpropanonitrilo (15)

[0188]



[0189] Se agitaron Pd(OH)₂/C (2,0 g) y el compuesto **7** (20,0 g, 0,104 mol) en MeOH (150 mL) a temperatura ambiente bajo hidrógeno a una presión de 10 psi durante 16-18 horas. La mezcla se filtró entonces a través de una almohadilla de Celite®, y el filtrado se concentró para dar el compuesto **15**, que se usó en la siguiente reacción sin purificación adicional. ¹H RMN (DMSO-d₆; 400 MHz) δ 9,83 (s), δ 7,24 (s), δ 7,18 (m), δ 6,80 (m), δ 1,71 (s), δ 1,24 (s).

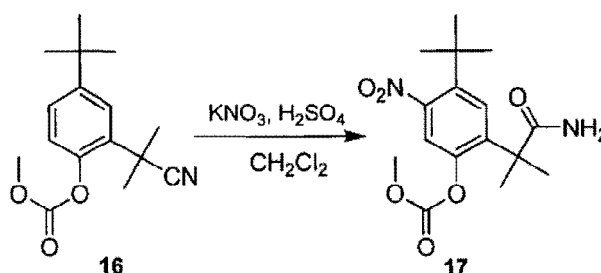
Procedimiento para la preparación de metilcarbonato de 4-terc-butilo-2-(2-cianopropano-2-ilo) fenilo (16)
[0190]



[0191] A una mezcla agitada del compuesto **15** (126,6 g, 0,564 mol), DMAP (6,0 g) y DIEA (188 g, 1,46 mol) en DCM anhidro (1500 mL) se añadió gota a gota cloroformiato de metilo (110 g, 1,17 mol) en DCM anhidro (300 mL) a 0°C en 2 horas. Después de agitarse durante 12 horas a 0°C, se añadió agua helada (1,5 L) y la mezcla se agitó a 0°C durante 30 minutos. La capa orgánica se separó y se lavó con 1 N HCl, agua y salmuera. La solución de DCM se secó sobre MgSO₄ y se concentró *a vacío* para dar el compuesto **16** como un sólido amarillo. ¹H RMN (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).

Procedimiento para la preparación de metilcarbonato de 2-(1-amino-2-metilo-1-oxopropano-2-ilo)-4-terc-butilo-5-nitrofenilo (17)

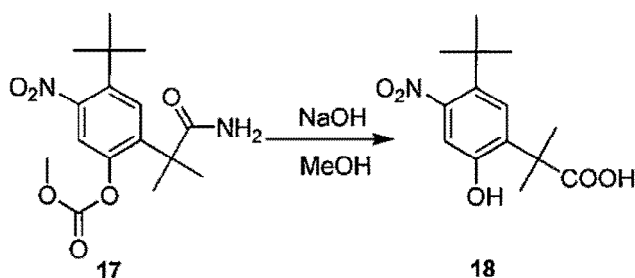
[0192]



[0193] A una mezcla agitada del compuesto **16** (10,0 g, 36,3 mmol) y KNO₃ (5,51 g, 54,5 mmol) en DCM (1000 mL) se añadió gota a gota 98% H₂SO₄ (145,4 g, 1,45 mol) a 0°C. La mezcla se agitó a 30°C durante 4 días. La capa H₂SO₄ luego se separó y se vertió en hielo-agua (50 g) y después se extrajo con DCM (100 mLx3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua, NaHCO₃ acuosa y salmuera, después se secó sobre MgSO₄ y se concentró *a vacío*. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (éter de petróleo/EtOAc 20:1 → 10:1 → 5:1 → 3:1) para dar el compuesto **17** como un sólido amarillo. ¹H RMN (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).

Procedimiento para la preparación de ácido 2-(5-terc-butilo-2-hidroxi-4-nitrofenilo)-2-metilpropanoico (18)

[0194]

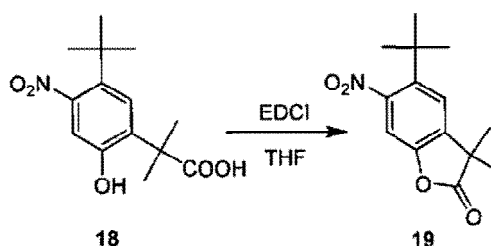


[0195] A una mezcla de compuesto **17** se añadió agua (7,3 g, 21,6 mmol) en metanol (180 mL) (18 mL) y NaOH (8,64 g, 216 mmol). La solución se calentó y mantuvo a reflujo durante 3 días. El disolvente se evaporó *al vacío* y el

residuo se disolvió en 140 mL de agua. Luego, la solución se acidificó a pH₂ mediante la adición de 2N HCl. La fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (100 mLx3), y las fases orgánicas combinadas se lavaron con agua y salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y después se concentró para dar el compuesto **18** como un sólido amarillo, que se usó en la siguiente reacción sin purificación adicional.

Procedimiento para la preparación de 5-terc-butilo-3,3-dimetilo-6-nitrobenzofurano-2(3H)-ona (19)

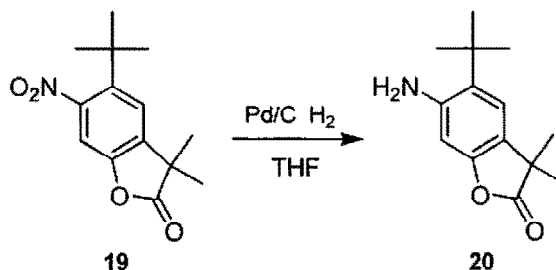
[0196]



[0197] A una solución del compuesto **18** (7,10 g, 25,2 mmol) en 710 mL de THF anhidro se añadió EDCI (14,5 g, 75,6 mmol). La suspensión resultante se dejó en agitación a 30°C durante la noche. El precipitado se filtró y se lavó a fondo con DCM. El filtrado se concentró a sequedad y el residuo se disolvió en DCM (100 mL). La solución se lavó con agua (50 mLx2) y salmuera (50 mL X 1). A continuación se secó la capa de DCM sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentró para dar el producto bruto, que se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (éter de petróleo/EtOAc 200:1 → 100:1 → 50:1) para dar el compuesto **19** como un sólido blanco. ¹H RMN (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-terc-butilo-3,3-dimetilbenzofurano-2(3H)-ona (20)

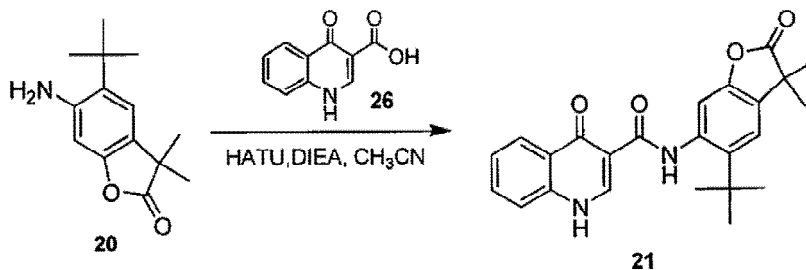
[0198]



[0199] Pd/C (1,50 g) y el compuesto **19** (3,00 g, 1,14 mmol) se suspendieron en THF (1500 mL) a 25°C bajo hidrógeno a 30 psi durante 4 horas. La mezcla luego se filtró a través de una almohadilla de Celite®, y el filtrado se concentró a vacío para dar el compuesto **20** como un sólido blanco. ¹H RMN (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-terc-butilo-3,3-dimetilo-2-oxo-2,3-dihidrobenzofurano-6-ilo)-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida (21)

[0200]

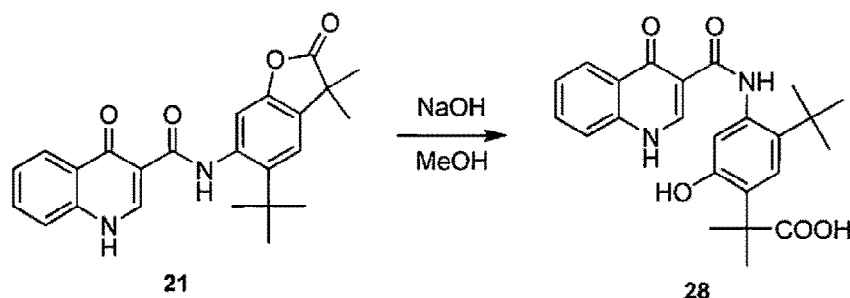


[0201] Una suspensión de HATU (17,6 g, 46,3 mol) y el compuesto **26** (8,36 g, 44,2 mmol) en acetonitrilo anhidro (1 L) se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadió el compuesto **20** (3,40 g, 14,6 mmol) a la suspensión, y después se añadió DIEA (11,5 g, 89,0 mmol) gota a gota. La mezcla se agitó a 45°C durante 4 días. El precipitado

resultante se filtró y se lavó a fondo con DCM. El filtrado se concentró a sequedad y el residuo se disolvió en DCM (200 mL) y se lavó con 1N HCl (200 mL X 2) seguido de 5% acuoso NaHCO₃ (200 mLx3) y después con salmuera (200 mL X 1). Después, la mezcla se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró a vacío. El residuo se purificó por medio de cromatografía en columna sobre gel de sílice (CH₂Cl₂/MeOH 100:1 → 50:1) para dar el compuesto **21** como un sólido de color amarillo claro. ¹H-RMN (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* 8 Hz, 1H); 7,84 - 7,75 (m, 2H); 7,55 - 7,48 (m, 3H); 1,47 (s, 6 H); 1,45 (s, 9H).

Procedimiento para la preparación de ácido 2-(5-terc-butilo-2-hidroxi-4-(4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamido)fenilo)-2-metilpropanoico (28)

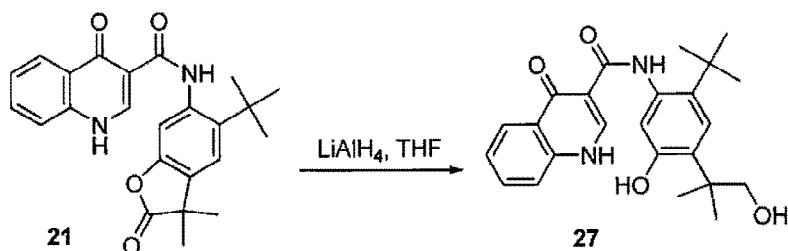
[0202]



[0203] A una solución agitada del compuesto **21** (0,9 g, 2,45 mmol) en MeOH (50 mL) se añadió NaOH (1,5 g, 37,5 mmol) a 0°C. Después de agitarse durante 16 horas a 40°C, el disolvente se evaporó a vacío, después el residuo se disolvió en H₂O (50 mL). El precipitado se filtró y el filtrado se lavó con DCM (100 mL X 1) y acetato de etilo (100 mL X 1). La capa acuosa se acidificó con 2N HCl a pH 1-2. El precipitado se filtró y se lavó con H₂O (80 mL) y heptano (50 mL). Se secó a vacío para dar el compuesto **28** como un sólido blanco. ¹H RMN (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). MS encontrado (M + H) 423,08

Ejemplo 4: Segunda síntesis alternativa de N-(2-terc-butilo-5-hidroxi-4-(1-hidroxi-2-metilpropano-2-ilo)fenilo)-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida (27)

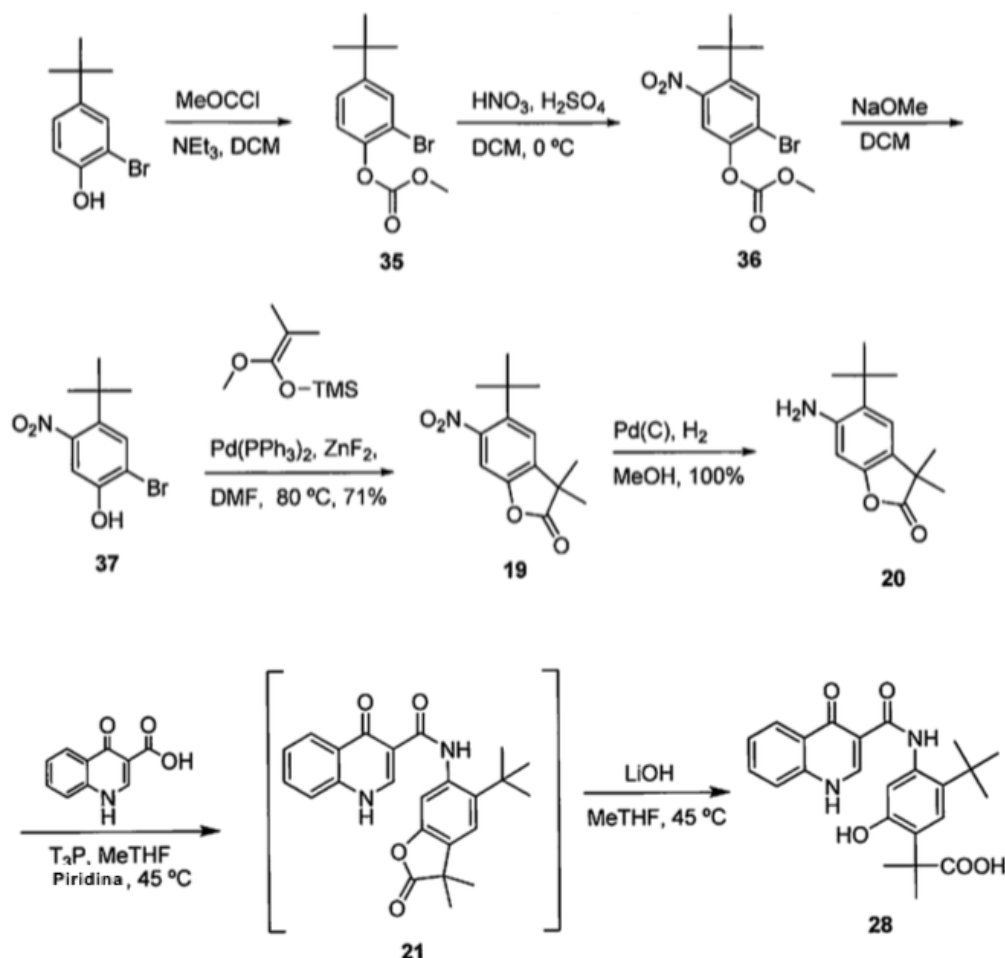
[0204]



[0205] Un matraz de fondo redondo de 3 bocas de 50 mL se equipó con agitador magnético, un borboteador de nitrógeno y termopar. El compuesto **21** (514 mg, 1,27 mmol) y 2-MeTHF (4 mL) se cargan en el matraz. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente. Se añadió hidruro de litio y aluminio (204 mg, 6,6 mmol) como sólido hasta que se logró una conversión del 100%, que se controló usando HPLC. Se añadieron sal de tetrahidrato de 2,3-dihidroxibutanodioato de sodio y potasio (50 mL de una solución de 400 g/L) y MTBE (50 mL) a la mezcla de reacción. La solución resultante se agitó durante 15 minutos y luego se dejó reposar durante 15 minutos. La capa orgánica se separó y el pH de la capa acuosa se ajustó a un pH de aproximadamente 6-7 por adición de ácido tartárico. La capa acuosa se extrajo con MTBE. La capa orgánica se concentró y se secó a alto vacío para proporcionar el compuesto del título como un polvo blanquecino. El espectro ¹H-RMN fue consistente con el reportado anteriormente.

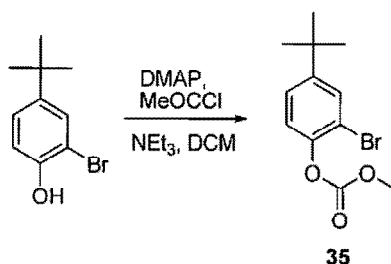
Ejemplo 5: Síntesis total alternativa de ácido 2-(5-terc-butilo-2-hidroxi-4-(4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida)fenilo)-2-metilpropanoico (28):

[0206]

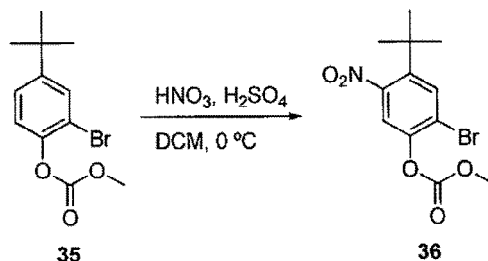


Procedimiento para la preparación de 2-bromuro de ácido carbónico, éster metílico de 4-terc-butilfenilo éster (35)

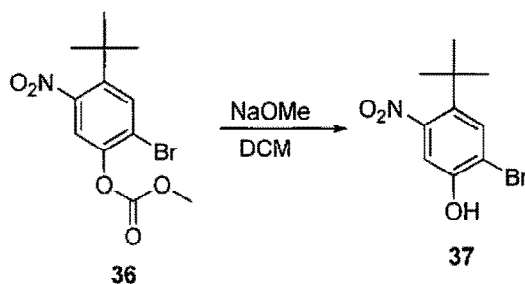
[0207]



[0208] Un matraz de 3 bocas de fondo redondo de 2 L fue equipado con agitador mecánico, burbujeador de nitrógeno y termopar. 2-Bromo-4-terc-butilo fenol (50 g, 211,7 mmol) seguido por DCM (1,75 L), DMAP (1,29 g, 10,58 mmol) y Et₃N (44,3 mL, 317,6 mmol). La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C. Se añadió cloroformiato de metilo (19,62 mL, 254 mmol) gota a gota a la mezcla de reacción. La mezcla se dejó calentar a temperatura ambiente mientras que se agitaba durante la noche. Cuando la reacción se completó, la mezcla se filtró a través de un embudo sinterizado. El filtrado se transfirió a un embudo de separación de 1 L. Para sofocar, se añadió 1N HCl (300 mL) al filtrado y la capa orgánica se separó. Después, la capa orgánica se lavó con una mezcla de 291 mL saturada de NaHCO₃ y 100 mL de agua. Las capas se separaron, y se determinó que la capa acuosa tenía un pH de aproximadamente 8. La capa orgánica se concentró y se secó a alto vacío durante aproximadamente 16 horas para dar el compuesto del título como un aceite amarillo claro, que se usó en el siguiente paso sin purificación adicional. ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) 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)

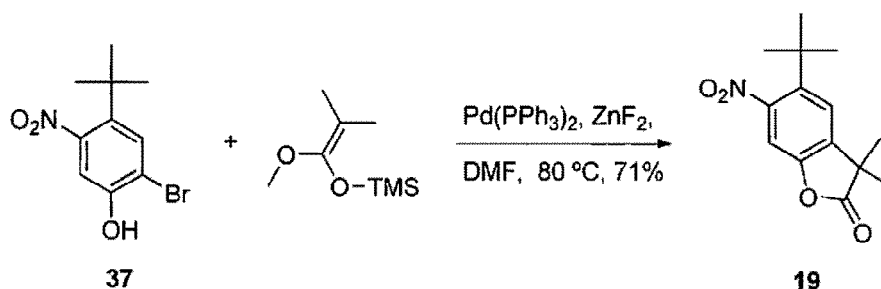
Procedimiento para la preparación de carbonato de (2-bromo-4-terc-butilo-5-nitro-fenil) metilo (36)**[0209]**

[0210] Un matraz de 3 bocas de fondo redondo de 2 L fue equipado con agitador mecánico, burbujeador de nitrógeno y termopar. El compuesto **35** (176 g, 612,9 mmol) y ácido sulfúrico concentrado (264 mL) se cargaron en el matraz. La mezcla de reacción se enfrió a -5°C - 0°C. Se añadió ácido nítrico (28,6 mL, 612,9 mmol) 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 solución se agitó durante 15 minutos y luego se dejó reposar durante 15 minutos. La capa orgánica se separó, se concentró y se secó a alto vacío para dar el compuesto del título como un aceite marrón oscuro, que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. ¹H-RMN (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-butilo-5-nitro-fenol (37)**[0211]**

[0212] Se cargó carbonato de (2-bromo-4-terc-butilo-5-nitro-fenilo)metilo (72,9 g, 219,5 mmol) en un reactor y se añadió DCM (291,6 mL). La solución de reacción amarilla se enfrió usando un baño de hielo. Se añadió metóxido sódico (67,04 g, 69,11 ml de 5,4 M, 373,2 mmol) en porciones a 2,2 - 6,9°C. Después de completar la adición, la reacción se calentó lentamente a temperatura ambiente. Cuando se completó, la reacción se enfrió a 0°C y se inactivó con 1M HCl (373,2 mL, 373,2 mmol). La mezcla bifásica se agitó durante 20 min y se transfirió a un embudo de decantación. La capa orgánica se separó y se lavó con agua (300 mL) seguido de salmuera (300 mL). La capa orgánica se concentró y el producto bruto se secó a alto vacío. El producto se purificó adicionalmente usando separación de cromatografía de fluido supercrítico (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 de PPU (30*150) de Princeton Chromatography, 100 bar, 35C, 220 nm. Se inyectó una inyección de 3,5 mL de una solución de 55-70 mg/mL. Los datos fueron recolectados usando el software SFC ProNTTo. El producto purificado recibido de la purificación de SFC era un solvato de metanol. Para eliminar el metanol, se realizó una destilación azeotrópica. El sólido amarillo oscuro, 2-bromo, 4-tertbuilo, el solvato de metanol de 5-nitro fenol, (111,3 g, 59,9 mmol) se cargó en un matraz de fondo redondo de 1 litro, seguido de heptano (500 mL). La suspensión se calienta a 64°C para obtener una solución clara. El disolvente se destiló a presión reducida (649 mbar) durante 30 minutos y luego se destiló hasta sequedad. Este procedimiento se repitió tres veces hasta que no se detectó MeOH por ¹H-NMR. El producto se secó a alto vacío durante 16 horas para dar el producto como un semisólido amarillo oscuro. ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*6) δ 11,2 (bs, OH), 7,69 (s, 1H); 7,03 (s, 1H); 1,30 (s, 9H)

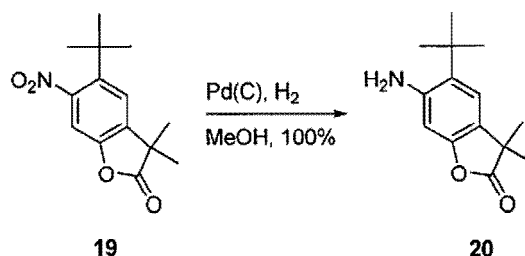
Procedimiento para la preparación de 5-terc-butilo-3,3-dimetilo-6-nitrobenzofurano-2(3H)-ona (19)**[0213]**



[0214] Se añadió difluorozinc (6,093 g, 58,92 mmol) a un matraz de fondo redondo, que se lavó abundantemente con nitrógeno. $\text{Pd}(\text{tBu}_3\text{P})_2$ (2 g, 3,835 mmol) se añadió entonces bajo corriente de nitrógeno. A continuación, se añadió 2-bromo-4-terc-butilo-5-nitro-fenol (16,15 g, 58,92 mmol) disuelto en DMF (80,75 mL) al matraz. La mezcla de reacción fue una suspensión naranja. Se añadió (1-metoxi-2-metilo-prop-1-enoxi) trimetilsilano (21,61 g, 25,13 mL, 117,8 mmol) 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 del filtro se lavó con MTBE (536,0 mL) y se añadió agua (893,3 mL) al filtrado. La mezcla se agitó durante 15 minutos y se suspendió durante otros 15 minutos. Las capas se separaron y se añadió 0,5M HCl (500 mL, 250,0 mmol) a la fase orgánica. Las capas se separaron y la capa orgánica se lavó con agua (500 mL). Las capas se separaron y la capa orgánica se lavó con NaCl (500 mL, 8% en peso). La capa orgánica se separó y el disolvente se eliminó *a vacío*. El producto bruto se obtuvo como un sólido cristalino marrón y luego se purificó a través de un tapón de sílice, usando hexano: MTBE 20: 1-10: 1 como eluyente. Las fracciones que contenían el producto se combinaron y el disolvente se eliminó *a vacío* para dar el producto puro como un sólido cristalino blanco. $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 7,80 (s, 1H); 7,62 (s, 1H); 1,49 (s, 6 H); 1,34 (s, 9H)

Procedimiento para la preparación de 6-amino-5-terc-butilo-3,3-dimetilbenzofurano-2(3H)-ona (20)

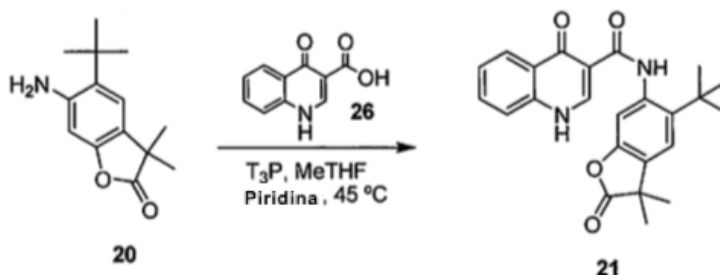
[0215]



[0216] Se colocó paladio sobre carbón (húmedo, 5% en peso) en un matraz de fondo redondo bajo atmósfera de nitrógeno. Luego se añadió 5-terc-butilo-3,3-dimetilo-6-nitro-benzofurano-2-ona (4,7 g, 17,85 mmol) al recipiente. Se cargó cuidadosamente metanol (120 mL) al recipiente en atmósfera de nitrógeno. Después, el recipiente se purgó con N_2 , se evacuó, después se cargó con gas de hidrógeno. El recipiente se evacuó y se recargó con gas de hidrógeno, y luego se introdujo una corriente continua de gas de 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 a alto vacío para dar un sólido cristalino blanco. $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 7,05 (s, 1H); 6,48 (s, 1H); 5,02 (s, 2H, NH_2); 1,34 (s, 6 H); 1,30 (s, 9H)

Procedimiento para la preparación de N-(5-terc-butilo-3,3-dimetilo-2-oxo-2,3-dihidrobenzofurano-6-ilo)-4-oxo-1,4-dihidroquinoline-3-carboxamida (21)

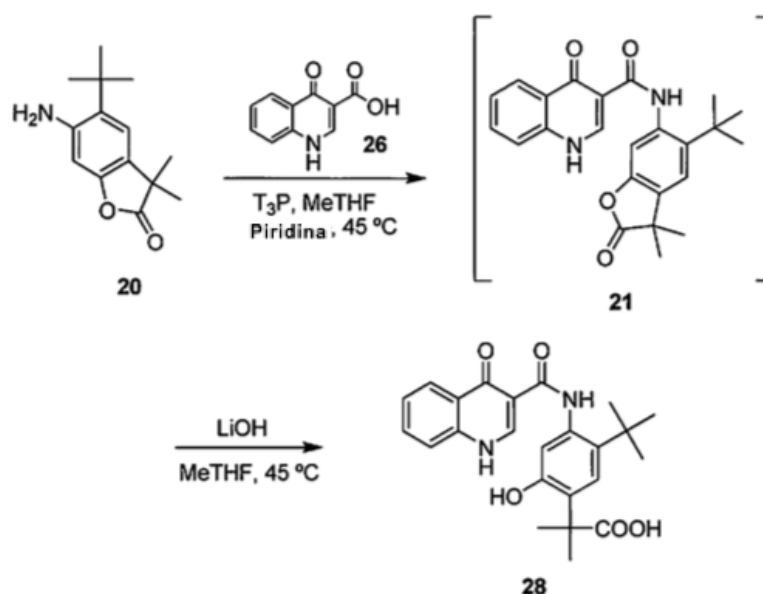
[0217]



[0218] Se cargó un recipiente de reacción con el compuesto **26** (2,926 g, 15,43 mmol), Compuesto **20** (4,32 g, 18,52 mmol), 2-MeTHF (35,99 mL), y posteriormente 50% de T3P en 2-MeTHF (13,36 g, 21,00 mmol). Se añadió piridina (2,441 g, 2,496 mL, 30,86 mmol) y la suspensión se calentó a 47,5°C a $\pm 5^\circ\text{C}$ 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 capa orgánica se lavó con solución al 10% en peso de ácido cítrico (30 mL), agua (30 mL) y dos veces con NaHCO_3 (20 mL). La capa orgánica se lavó con salmuera (50 mL), se separó y el disolvente se eliminó a vacío. El producto bruto se disolvió en MTBE (100 mL) y se añadió hexano (200 mL) como antisolvente. Un sólido precipitó y la suspensión resultante se agitó durante dos horas. El sólido se recogió mediante filtración por succión y la torta se lavó con hexano. El producto resultante se secó en un horno de vacío a 55°C con purga de nitrógeno para dar el compuesto del título como un sólido beige. ^1H -RMN (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) 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 8 Hz, 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-butilo-2-hidroxi-4-(4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamido)fenilo)-2-metilpropanoico (28)

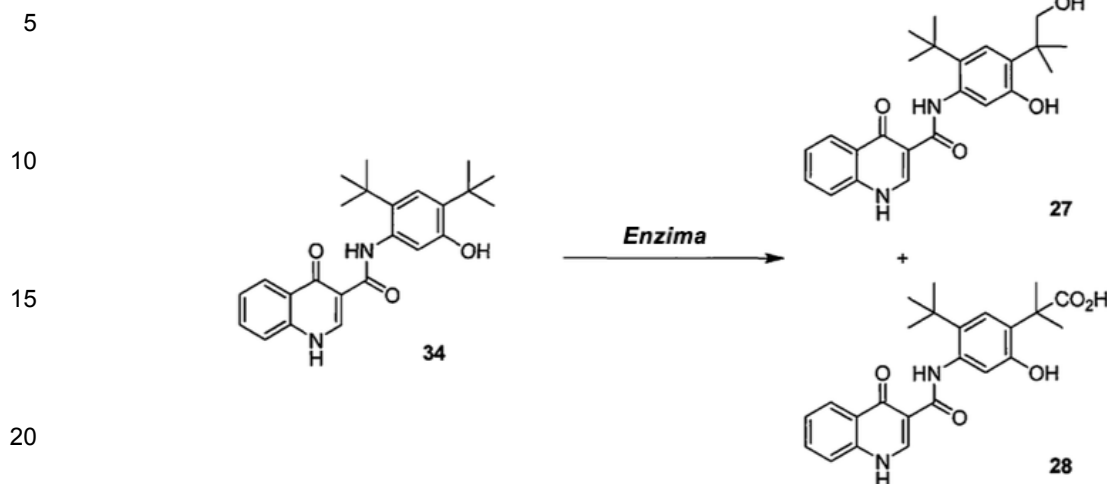
[0219]



[0220] El compuesto **26** (81,30 mg, 0,4288 mmol) y el Compuesto **20** (110 mg, 0,4715 mmol) se cargaron en un matraz de fondo redondo. Después se añadieron 2-MeTHF (1 mL) seguido de 50% de T3P en 2-MeTHF (371,4 mg, 0,5836 mmol) y piridina (67,84 mg, 69,37 μL , 0,8576 mmol) en 2-MeTHF. La suspensión se calentó a 47,5°C $\pm 5^\circ\text{C}$ durante la noche. Después de completarse, la reacción se enfrió a temperatura ambiente. Se agregaron 2-MeTHF (1,014 mL) y agua (811,2 μL). Las capas se separaron y la capa orgánica se lavó con agua (811,2 μL) y dos veces con NaHCO_3 (2 mL). La capa orgánica se transfirió a un matraz de fondo redondo. Se añadió LiOH (38,6 mg, 0,9 mmol) disuelto en agua (2 mL) y la reacción se calentó a 45°C. Después de la terminación, las capas se separaron y la capa orgánica se descartó. La capa acuosa se enfrió con un baño de hielo y se añadió ácido clorhídrico (10,72 mL de 1,0 M, 10,72 mmol) a la solución hasta que el pH alcanzó un pH de aproximadamente 3-4. La capa acuosa se extrajo dos veces con 2-MeTHF (5 mL), y las capas orgánicas se combinaron y se lavaron con salmuera (5 mL). La capa orgánica se separó y el disolvente se eliminó a vacío. El sólido resultante se secó en un horno de vacío con purga de nitrógeno a 50°C para dar el compuesto del título. ^1H RMN (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) 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: Procedimiento para la biosíntesis de N-(2-terc-butilo-5-hidroxi-4-(1-hidroxi-2-metilpropano-2-ilo)fenilo)-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida (27) y ácido 2-(5-terc-butilo-2-hidroxi-4-(4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamido)fenilo)-2-metilpropanoico (28)

[0221]



[0222] Se adquirió *Streptomyces rimosus* (DSM 40260) a partir de DSMZ como cultivo congelado. Este cultivo se usó para inocular inclinados de agar, que se mantuvieron y almacenaron a 4°C. Se preparó un 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. Cinco frascos que contenían 1 L de medio YMP se inocularon directamente con *S. rimosus* de los inclinados de agar. El cultivo se dejó crecer durante 2 - 3 días a 30°C con agitación suave de aproximadamente 100 rpm. En estas condiciones, se han observado dos tipos de crecimiento, ya sea una solución turbia o partículas esféricas que se agregan en el fondo del matraz. Se ha demostrado que el último tipo de crecimiento da como resultado conversiones más altas al Compuesto 27. Las células se centrifugaron, recogieron y resuspendieron en dos matraces que contenían 1 L de tampón de fosfato de potasio 0,1 M, pH 7,0. Se añadieron 5,0 g de Compuesto 34 en 50 mL de N,N-dimetilformamida (DMF) a los matraces. Las reacciones continuaron durante 24 horas a 30°C con agitación suave de aproximadamente 100 rpm en cuyo punto las conversiones de 7,59% del Compuesto 27 y 1,17% del Compuesto 28 se indicaron por HPLC.

[0223] 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 luego se centrifugó nuevamente a 6000 rpm durante 10 minutos. La capa orgánica se recogió y el proceso se repitió dos veces. Los extractos de metanol se concentraron *al vacío* para producir 2,50 g, 1,57 g y 1,11 g de material sólido, respectivamente. Se ha demostrado que los sólidos de estos extractos contienen 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 eliminar 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 al vacío. Mientras que los Compuestos 27 y 28 fueron enriquecidos en el filtrado (22,09 y 6,14%, respectivamente), los sólidos también contenían el Compuesto 27 (8,96%) y el Compuesto 28 (0,50%).

[0224] El filtrado de metanol que contiene aproximadamente 2,2 g de sólidos disueltos se adsorbió sobre 4,5 g de sílice y se purificó por cromatografía ultrarrápida usando un gradiente de 100% de diclorometano a 88:12 de diclorometano/metanol. Las fracciones que contenían el Compuesto 27 se concentraron *al vacío* y se secaron adicionalmente por liofilización para obtener 130 mg de Compuesto 27 (98,5% de pureza por HPLC). Una fracción que contenía el Compuesto 28 impuro también se concentró *al vacío* para producir menos de 10 mg de sólido.

[0225] El sedimento celular se resuspendió en 500 mL de metanol y se homogeneizó en un BeadBeater para separar las células y recuperar cualquier producto restante. La capa orgánica se obtuvo centrifugando la suspensión homogeneizada a 6000 rpm durante 10 minutos. Esto se añadió al sólido obtenido a partir de la tercera extracción y los sólidos filtrados del enriquecimiento en suspensión de las dos primeras extracciones y se suspendió a reflujo durante la noche. La suspensión se enfrió luego y se filtró por succión para obtener 1,99 g de sólido. El sólido se redisolvió en 300 mL de metanol que luego se adsorbió en aproximadamente 5 g de sílice y se purificó por cromatografía ultrarrápida usando un gradiente de diclorometano al 100% a diclorometano/metanol 94:6 para proporcionar 820 mg de sólido que contenía Compuesto 34 y Compuesto 27 así como otras impurezas. Esto se volvió a someter a cromatografía en columna usando un gradiente de disolvente más gradual (100% de DCM hasta una mezcla de 6% de MeOH/94% DCM) para obtener 89 mg adicionales del compuesto 27. El espectro ¹H-RMN era coherente con el que se informó anteriormente.

Ejemplo 7: Procedimiento general para ensayar la solubilidad a pH 7.4

[0226] Se usó un ensayo en matraz de agitación de alto rendimiento para determinar la solubilidad de los compuestos en tampón de pH 7,4. Para calcular la concentración de compuestos en solución, se llevaron a cabo dos condiciones por compuesto: 300 μ M en 100% de DMSO y 200 μ M en tampón fosfato pH 7,4 con DMSO al 2% presente. Cada muestra se dejó agitar durante la noche y luego se inyectó sobre HPLC-UV para determinar el área del pico usando las siguientes condiciones: Phenomenex 00A-4251-B0 - 30x2,00 mm Luna 3u C18(2) 100A columna; Velocidad de flujo de 0,8 mL/min; 20 μ L de volumen de inyección; agua de grado HPLC con ácido fórmico al 0,1% y acetonitrilo de grado HPLC con fases móviles de ácido fórmico al 0,1%; área de pico determinada a 254 nm. La solubilidad en μ M se calculó usando la siguiente ecuación: $\text{conc.} = (\text{área de pico pH 7,4}) / (\text{área de pico 300 } \mu\text{M de condición estándar de DMSO}) * \text{Concentración de 300 } \mu\text{M de condición estándar}$. Los picos de interés se identificaron en condiciones de tampón basadas en el tiempo de retención (TR) del pico de área más grande en la condición estándar de DMSO 300 μ M.

ENSAYOS DE ACTIVIDAD

Ejemplo 8: *Procedimiento general para ensayos de actividad*

Ensayos para la detección y la medición de propiedades de potenciación de Δ F508-CFTR de compuestos

Métodos ópticos potenciales de membrana para ensayar propiedades de modulación δ F508-CFTR de compuestos

[0227] El ensayo utiliza colorantes de detección de tensión fluorescentes para medir los cambios en el potencial de membrana usando un lector de placas fluorescentes (por ejemplo, FLIPR III, Molecular Devices, Inc.) como una lectura para el aumento en Δ F508-CFTR funcional en células NIH 3T3. La fuerza motriz para la respuesta es la creación de un gradiente de iones de cloruro en conjunción con la activación del canal mediante una única etapa de adición de líquido después de que las células hayan sido tratadas previamente con compuestos y posteriormente cargadas con un tinte sensible a la tensión.

Identificación de compuestos potenciadores

[0228] Para identificar potenciadores de Δ F508-CFTR, se desarrolló un formato de ensayo HTS de doble adición. Este ensayo HTS utiliza tintes de detección de tensión fluorescentes para medir los cambios en el potencial de membrana en FLIPR III como una medida para el aumento en gating (conductancia) de Δ F508 CFTR en la temperatura correcta células Δ F508 CFTR NIH 3T3. La fuerza motriz para la respuesta es un gradiente de ion Cl^- junto con la activación del canal con forskolina en un solo paso de adición de líquido usando un lector de placa fluorescente como FLIPR III después de que las células hayan sido tratadas previamente con compuestos potenciadores (o control del vehículo DMSO) y posteriormente se cargó con un tinte de redistribución.

Soluciones

[0229] Solución de baño n° 1: (en mM) NaCl 160, KCl 4,5, CaCl_2 2, MgCl_2 1, HEPES 10, pH 7,4 con NaOH. Solución de baño sin cloruro: Sales de cloruro en la solución de baño n.º1 se sustituyen por sales de gluconato.

[0230] **Cultivos celulares** Los fibroblastos de ratón NIH3T3 que expresan establemente Δ F508-CFTR se usan para mediciones ópticas de potencial de membrana. Las células se mantuvieron a 37°C en 5% de CO_2 y 90% de humedad en medio de Eagle modificado por Dulbecco complementado con 2 mM de glutamina, suero bovino fetal al 10%, 1 X NEAA, β -Me, 1 X pen/strep, y 25 mM de HEPES en frascos de cultivo de 175 cm^2 . 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 de 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 analizar las propiedades de modulación de Δ F508-CFTR de los compuestos.

1. Ensayo de cámara Ussing

[0231] Se realizaron experimentos de cámara Ussing sobre células epiteliales de vía aérea polarizadas que expresan Δ F508-CFTR para caracterizar adicionalmente los moduladores Δ F508-CFTR identificados en los ensayos ópticos. Los epitelios de las vías respiratorias sin FQ y FQ se aislaron del tejido bronquial, se cultivaron como se describió previamente (Galletta, LJV, Lantero, S., Gazzolo, A., Sacco, O., Romano, L., Rossi, GA y Zegarra-Moran, O. (1998) In Vitro Cell. Dev. Biol. 34, 478 - 481), y se colocaron en placas sobre filtros Costar® Snapwell™ que se pre-recubrieron con medios acondicionados con NIH3T3. Después de cuatro días, los medios apicales se eliminaron y las células se cultivaron en una interfaz de líquido con aire durante >14 días antes de su uso. Esto dio como resultado una monocapa de células columnares completamente diferenciadas que estaban ciliadas, rasgos que son característicos del epitelio de las vías respiratorias. HBE no FQ se aislaron de no fumadores que no tenían ninguna enfermedad pulmonar conocida. HBE de FQ se aislaron de pacientes homocigotos para Δ F508-CFTR.

[0232] HBE cultivados en insertos de cultivo celular Costar® Snapwell™ en una cámara Ussing (Physiologic Instruments, Inc., San Diego, CA), y la resistencia transepitelial y la corriente de cortocircuito en presencia de un

gradiente Cl^- basolateral a apical (I_{SC}) se midieron utilizando un sistema de abrazadera de voltaje (Departamento de Bioingeniería, Universidad de Iowa, IA). Brevemente, HBE se examinaron bajo condiciones de grabación con tensión de fijación ($V_{\text{sujeción}} = 0 \text{ mV}$) a 37°C . La solución basolateral contenía (en mM) 145 NaCl, 0,83 K_2HPO_4 , 3,3 KH_2PO_4 , 1,2 MgCl_2 , 1,2 CaCl_2 , 10 Glucosa, 10 HEPES (pH ajustado a 7,35 con NaOH) y la solución apical contenida (en mM) 145 NaGluconato, 1,2 MgCl_2 , 1,2 CaCl_2 , 10 glucosa, 10 HEPES (pH ajustado a 7,35 con NaOH).

Identificación de compuestos potenciadores

[0233] El protocolo típico utilizó un gradiente de concentración de Cl^- de la membrana basolateral a apical. Para configurar este gradiente, se usaron timbres normales en la membrana basolateral, mientras que el NaCl apical se reemplazó por gluconato de sodio equimolar (titulado a pH 7,4 con NaOH) para dar un gran gradiente de concentración de Cl^- grande en todo el epitelio. La forskolina (10 μM) y todos los compuestos de prueba se añadieron al lado apical de los insertos de cultivo celular. La eficacia de los supuestos potenciadores de $\Delta\text{F508-CFTR}$ se comparó con la del potenciador conocido, la genisteína.

2. Grabaciones pinza de parche

[0234] La corriente de Cl^- total en células $\Delta\text{F508-NIH3T3}$ se controló usando la configuración de grabación de parche perforado como se describe previamente (Rae, J., Cooper, K., Gates, P., y Watsky, M. (1991) J Neurosci. Methods 37, 15 - 26). Los registros de pinza de tensión se realizaron a 22°C usando un amplificador de pinza de parche Axopatch 200B (Axon Instruments Inc., Foster City, CA). La solución de pipeta contenía (en mM) 150 *N*-metilo-D-glucamina (NMDG)-Cl, 2 MgCl_2 , 2 CaCl_2 , 10 EGTA, 10 HEPES, y 240 $\mu\text{g/ml}$ de anfotericina-B (pH ajustado a 7,35 con HCl). El medio extracelular contenía (en mM) 150 NMDG-Cl, 2 MgCl_2 , 2 CaCl_2 , 10 HEPES (pH ajustado a 7,35 con HCl). La generación de impulsos, la adquisición de datos y el análisis se realizaron utilizando una PC equipada con una interfaz Digidata 1320 A/D junto con Clampex 8 (Axon Instruments Inc.). Para activar $\Delta\text{F508-CFTR}$, se añadieron forskolina 10 μM y genisteína 20 μM al baño y se controló la relación corriente-voltaje cada 30 segundos.

Identificación de compuestos potenciadores

[0235] La capacidad de potenciadores $\Delta\text{F508-CFTR}$ para aumentar la corriente Cl^- $\Delta\text{F508-CFTR}$ macroscópica ($I_{\Delta\text{F508}}$) en células NIH3T3 que expresan establemente $\Delta\text{F508-CFTR}$ también se investigó utilizando técnicas de grabación de parche perforado. Los potenciadores identificados a partir de los ensayos ópticos evocaron un aumento dependiente de la dosis en $I_{\Delta\text{F508}}$ con potencia y eficacia similares observadas en los ensayos ópticos. En todas las células examinadas, el potencial de inversión antes y durante la aplicación del potenciador fue de alrededor de -30 mV, que es el E_{Cl} calculado (-28 mV).

Cultivo de células

[0236] Fibroblastos de ratón NIH3T3 que expresan establemente $\Delta\text{F508-CFTR}$ se utilizan para las grabaciones de célula entera. Las células se mantuvieron a 37°C en 5% de CO_2 y 90% de humedad en medio de Eagle modificado de Dulbecco suplementado con 2 mM de glutamina, suero bovino fetal al 10%, 1 X NEAA, β -ME, 1 X pen/strep, y 25 mM de HEPES en 175 cm^2 de frascos de cultivo. Para grabaciones de células completas, se sembraron de 2.500 a 5.000 células en cubreobjetos de vidrio recubiertos con poli-L-lisina y se cultivaron durante 24-48 horas a 27°C antes de probar la actividad de los potenciadores; e incubados con o sin el compuesto de corrección a 37°C para medir la actividad de los correctores.

3. Grabaciones de un solo canal

[0237] Se observó la actividad de activación de wt-CFTR y de $\Delta\text{F508-CFTR}$ corregido a temperatura expresada en células NIH3T3 usando registros de parche de membrana de dentro hacia afuera extirpados como se describió previamente (Dalemans, W., Barbry, P., Champigny, G., Jallat, S., Dott, K., Dreyer, D., Crystal, RG, Pavirani, A., Lecocq, JP., Lazdunski, M. (1991) Nature 354, 526 - 528) usando un amplificador de pinza de parche Axopatch 200B. (Axon Instruments Inc.). La pipeta contenía (en mM): 150 NMDG, 150 de ácido aspártico, 5 CaCl_2 , 2 MgCl_2 , y 10 HEPES (pH ajustado a 7,35 con base Tris). El baño contenía (en mM): 150 NMDG-Cl, 2 MgCl_2 , 5 EGTA, 10 TES, y base 14 Tris (pH ajustado a 7,35 con HCl). Después de la escisión, tanto wt como $\Delta\text{F508-CFTR}$ se activaron mediante la adición de 1 mM de Mg-ATP, 75 nM de la subunidad catalítica de la quinasa de proteína dependiente de AMPc (PKA; Promega Corp. Madison, WI) y 10 mM de NaF para inhibir fosfatasa de proteína, lo que impidió el agotamiento actual. El potencial de la pipeta se mantuvo a 80 mV. La actividad del canal se analizó a partir de parches de membrana que contienen ≤ 2 canales activos. El número máximo de aperturas simultáneas determinó la cantidad de canales activos durante el curso de un experimento. Para determinar la amplitud de corriente de un solo canal, los datos registrados a partir de 120 seg de actividad de $\Delta\text{F508-CFTR}$ se filtró "fuera de línea" a 100 Hz y luego se usó para construir histogramas de amplitud de todos los puntos que se ajustaron con funciones multigaussianas usando el software Bio-Patch Analysis (Bio-Logic Comp. Francia). La corriente microscópica total y la probabilidad abierta (P_o) se determinaron a partir de 120 s de actividad del canal. El P_o se determinó usando el software Bio-Patch o la relación $P_o = I/i(N)$, donde I = corriente media, i = amplitud de corriente de un solo canal y N

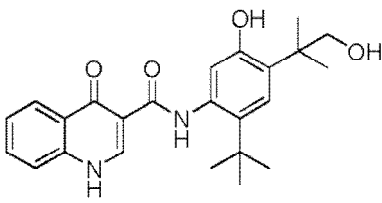
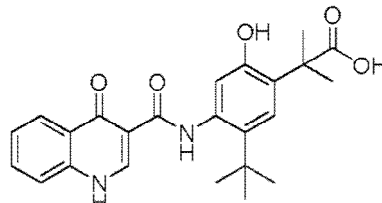
= número de canales activos en el parche.

Cultivo de células

[0238] Los fibroblastos de ratón de NIH3T3 que expresan de forma estable $\Delta F508$ -CFTR se usan para los registros de pinza de parche de membrana de membrana extirpada. Las células se mantuvieron a 37°C en 5% de CO₂ y 90% de humedad en medio de Eagle modificado por Dulbecco complementado con 2 mM de glutamina, suero bovino fetal al 10%, 1 X NEAA, β -Me, 1 X pen/strep, y 25 mM de HEPES en 175 cm² de frascos de cultivo. Para grabaciones de un solo canal, se sembraron de 2.500 a 5.000 células en cubreobjetos de vidrio recubiertos con poli-L-lisina y se cultivaron durante 24-48 horas a 27°C antes de su uso.

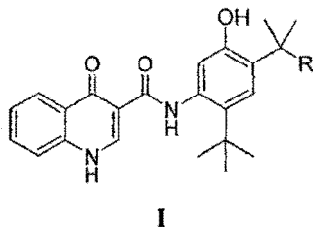
[0239] Se ensayaron los compuestos **27** y **28** para determinar la solubilidad usando el procedimiento dado en el Ejemplo 3 y para la actividad usando el procedimiento dado en los ensayos del Ejemplo 4. Los resultados se muestran en la Tabla 1. La actividad del compuesto se ilustra con "+++" si CE₅₀ (o CI₅₀) se midió a ser inferior a 2,0 μ M, "++" si se midió la actividad a ser de 2 μ M a 5,0 μ M, "+" si se midió la actividad que sea mayor que 5,0 μ M, y "-" si no hay datos disponibles. La eficacia se ilustra con "+++" si se calculó que la eficacia es mayor que 100%, "++" si se calculó que la eficacia es de 100% a 25%, "+" si se calculó que la eficacia es menor que 25 % y "-" si no hay datos disponibles.

Tabla 1: Ejemplos de actividades y eficacias de los compuestos de Fórmula I

Estructura		
	Compuesto 27	Compuesto 28
Solubilidad HTSF @ pH = 7,4	87 μ M	>200 μ M
CE ₅₀ óptica	+++	++
⊗508-HBE CE ₅₀	+++	+++
⊗508/G551D-HBE CE ₅₀	+++	++
HLM/RLM (% perm. @ 30 min)	++	+++
CaV 1.2 CI ₅₀	+	-

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de Fórmula I:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde R es COOH o CH₂OH.

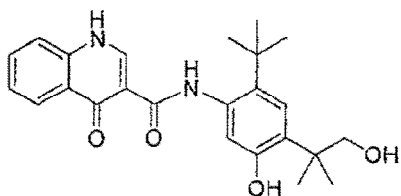
2. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que R es CH₂OH.

3. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que R es COOH.

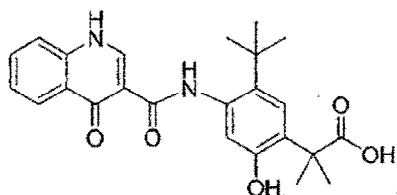
4. Una composición farmacéutica que comprende:

un compuesto de Fórmula I, según la reivindicación 1; y
un vehículo o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

5. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4, en la que el compuesto de Fórmula I tiene la estructura:



6. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4, en la que el compuesto de Fórmula I tiene la estructura:

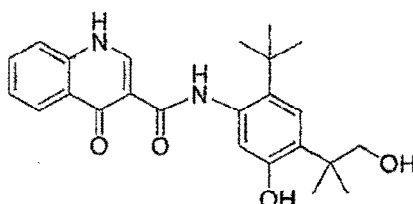


7. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, que comprende además un agente adicional seleccionado de un agente mucolítico, un broncodilatador, un antibiótico, un agente antiincrustante, un agente antiinflamatorio, un modulador de CFTR o un agente nutricional.

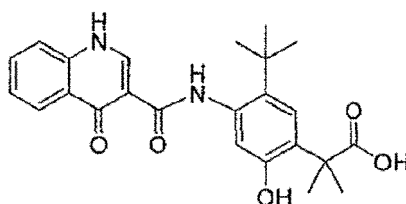
8. Un compuesto de fórmula I según la reivindicación 1 para uso en el tratamiento o disminución de la gravedad de una enfermedad en un paciente, en donde dicha enfermedad se selecciona de fibrosis quística, asma, EPOC inducida por humo, bronquitis crónica, rinosinusitis, estreñimiento, pancreatitis, insuficiencia pancreática, infertilidad masculina causada por ausencia bilateral congénita del conducto deferente (CBAVD), enfermedad pulmonar leve, pancreatitis idiopática, aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA), enfermedad hepática, enfisema hereditario, hemocromatosis hereditaria, deficiencias de coagulación y fibrinólisis, como deficiencia de proteína C, angioedema hereditario tipo 1, deficiencias de procesamiento de lípidos, como hipercolesterolemia familiar, quilomicronemia tipo 1, abetalipoproteinemia, enfermedades de almacenamiento lisosomal, como enfermedad de células I/pseudo-Hurler, mucopolisacaridosis, Sandhof/Tay-Sachs, Crigler-Najjar tipo II, poliendocrinopatía/hiperinsulinemia, diabetes mellitus, enanismo de Laron, deficiencia de mieloperoxidasa, hipoparatiroidismo primario, melanoma, glucanosis CDG tipo 1, hipertiroidismo congénito, osteogénesis imperfecta, hipofibrinogenemia hereditaria, deficiencia de ACT,

diabetes insípida (DI), DI neurohipofisaria, DI nefrógica, síndrome de Charcot-Marie Tooth, enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher, enfermedades neurodegenerativas como Enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, parálisis supranuclear progresiva, enfermedad de Pick, varios trastornos neurológicos de la poliglutamina como Huntington, ataxia espinocerebelosa tipo I, atrofia muscular espinal y bulbar, atrofia pallidoluisiana dentatorubral y distrofia miotónica, así como encefalopatías espongiformes, como la enfermedad hereditaria de Creutzfeldt-Jakob (debido a un defecto en el procesamiento de la proteína del prión), la enfermedad de Fabry, el síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, la EPOC, la enfermedad del ojo seco o la enfermedad de Sjogren.

9. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el compuesto de Fórmula I tiene la estructura:



10. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el compuesto de Fórmula I tiene la estructura:



11. El compuesto para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en el que dicha enfermedad es fibrosis quística.

12. Para mejorar la medición de la actividad de CFTR o el fragmento de la muestra biológica *in vitro* o *in vivo*, que comprende:

- i. una composición que comprende un compuesto de Fórmula I, según la reivindicación 1; e
- ii. instrucciones para:

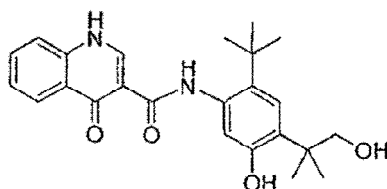
- a. poner en contacto la composición con la muestra biológica; y
- b. medir la actividad de dicho CFTR o un fragmento del mismo.

13. El kit de la reivindicación 12, que 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
- iii. comparar la actividad del CFTR o un fragmento del mismo en presencia del compuesto adicional con la actividad del CFTR o un fragmento del mismo en presencia de dicha composición que comprende un compuesto de Fórmula I, de acuerdo con la reivindicación 1.

14. El kit según la reivindicación 13, en el que la etapa de comparar la actividad de dicho CFTR o un fragmento del mismo proporciona una medida de la densidad de dicho CFTR o un fragmento del mismo.

15. El kit de cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en donde el compuesto de Fórmula I tiene la estructura:



16. El kit de las reivindicaciones 12 a 14, en el que el compuesto de Fórmula I tiene la estructura:

