



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2271621 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.
C07D 213/75 (2006.01)
A61K 31/44 (2006.01)
A61K 31/4427 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
C07D 405/12 (2006.01)
C07D 405/14 (2006.01)
C07D 413/14 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2014.03.17
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2013.11.20
(86)	Europeisk søknadsnr	09728176.0
(86)	Europeisk innleveringsdag	2009.03.25
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2011.01.12
(30)	Prioritet	2008.03.31, US, 40776 P
(84)	Utpekte stater	AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO PL PT RO SE SI SK TR
(73)	Innehaver	Vertex Pharmaceuticals Inc., 50 Northern Avenue, Boston, MA 02210, US-USA
(72)	Oppfinner	HADIDA-RUAH, Sara, 2356 Torrey Pine Road Apt 16, La JollaCA 92037, US-USA MILLER, Mark, 5075 La Jolla Blvd., Apt 9, San DiegoCA 92109, US-USA ZHOU, Jinglan, 4466 Shorepointe Way, San DiegoCA 92130, US-USA BEAR, Brian, 5108 Spencer Ct., OceansideCA 92057, US-USA GROOTENHUIS, Peter, 4801 Riding Ridge Road, San DiegoCA 92130, US-USA
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	Pyridylderivater som CFTR-modulatorer
(56)	Anførte publikasjoner	US-A1- 2008 286 204 WO-A-2005/075435 WO-A-2007/056341 WO-A-2008/141119 'RÖMPP CHEMIE LEXIKON, 9TH edition', page 97

PYRIDYLDERIVATER SOM CFTR-MODULATORER

OPPFINNELSENS TEKNISKE OMRÅDE

5 Den foreliggende oppfinnelsen vedrører modulatorer av ATP-bindingskassetten ("ABC") transportører eller fragmenter derav, inkludert cystisk fibrose-transmembrankonduktansregulator ("CFTR"), sammensetninger derav, og fremgangsmåter dermed. Den foreliggende oppfinnelsen vedrører også en
10 forbindelse for anvendelse i fremgangsmåter for å behandle ABC-transportørmedierte sykdommer ved hjelp av slike modulatorer.

BAKGRUNN FOR OPPFINNELSEN

15 ABC-transportører er en familie av membrantransportørproteiner som regulerer transporten av mange forskjellige farmakologiske middel, potensielt toksiske legemiddel, xenobiotika og anioner. ABC-transportører er homologe membranproteiner som binder og anvender cellulært adenosintrifosfat (ATP) i sine spesifikke aktiviteter. Noen av disse transportørene ble oppdaget som multilegemiddelresistente proteiner (som MDR1-P-glykoproteinet eller det
20 multilegemiddelresistente proteinet MRP1) som forsvaret ondartede cancerceller mot kjemoterapeutiske middel. Så langt er 48 slike ABC-transportører identifisert og gruppert i 7 familier basert på deres sekvensidentitet og funksjon.

25 ABC-transportører regulerer et mangfold av viktige fysiologiske roller i kroppen og tilveiebringer forsvar mot skadelige miljøbetingede forbindelser. Av denne grunn representerer de viktige potensielle legemiddelmål i behandlingen av sykdommer assosiert med defekter i transportørene, hindring av legemiddeltransport ut av målcellen og intervensjon ved andre sykdommer hvor modulasjon av ABC-transportøraktivitet kan være fordelaktig.

30 Et element i ABC-transportørfamilien som ofte assosieres med sykdom, er den cAMP/ATP-medierte anionekanal CFTR. CFTR uttrykkes i forskjellige celletyper, herunder absorptive og sekretoriske epitelceller, hvor den regulerer anionefluks

over membranen og aktiviteten av andre ionekanaler og proteiner. I epitelceller er normal CFTR-funksjon kritisk for opprettholdelse av elektrolytttransport i hele kroppen, herunder åndedretts- og fordøyelsesvev. CFTR er sammensatt av cirka 1480 aminosyrer som koder for et protein fremstilt av en tandemrepetisjon av transmembrane domener, hvor hver inneholder seks transmembrane helikser og et nukleotidbindingsdomene. De to transmembrane domenene er bundet av et stort, polart, regulerende (R)-domene med flere fosforyleringssteder som regulerer kanalaktivitet og cellulær trafikk.

Genet som koder for CFTR, er identifisert og sekvensert (se Gregory, R. J. et al. (1990) Nature 347:382–386, Rich, D. P. et al. (1990) Nature 347:358–362), (Riordan, J. R. et al. (1989) Science 245:1066–1073). En defekt i dette genet forårsaker mutasjoner i CFTR som resulterer i cystisk fibrose ("CF"), den mest vanlige fatale genetiske sykdommen hos mennesker. Cystisk fibrose rammer cirka ett av 2500 spedbarn i USA. Innenfor den generelle amerikanske populasjonen er opptil 10 millioner mennesker bærere av en enkelt kopi av det defekte genet uten merkbare sykdomstegn. Til sammenligning lider individer med to kopier av det CF-assosierte genet av de svekkende og dødelige effektene av CF, herunder kronisk lungesykdom.

Hos pasienter med cystisk fibrose fører mutasjoner i CFTR endogent uttrykt i respiratoriske epitler til redusert apikal anioneseokresjon, hvilket forårsaker en ubalanse i ione- og fluidtransporten. Den resulterende reduksjonen i anionetransport bidrar til økt slimakkumulering i lungen og de ledsagende mikrobielle infeksjonene som til slutt medfører døden hos CF-pasienter. I tillegg til lungesykdom lider CF-pasienter typisk av gastrointestinale problemer og pankreatisk insuffisiens som uten behandling medfører døden. Flertallet av menn med cystisk fibrose er i tillegg sterile, og fertiliteten er redusert blant kvinner med cystisk fibrose. I motsetning til de alvorlige effektene med to kopier av det CF-assosierte genet viser personer med en enkelt kopi av det CF-assosierte genet økt motstand mot kolera og dehydrering som skyldes diaré – hvilket kanskje forklarer CF-genets relativt høye frekvens i populasjonen.

Sekvensanalyse av CFTR-genet av CF-kromosomer har avdekket forskjellige sykdommer som forårsaker mutasjoner (Cutting, G. R. et al. (1990) Nature 346:366–369, Dean, M. et al. (1990) Cell 61:863:870; og Kerem, B-S. et al.

(1989) Science 245:1073–1080, Kerem, B-S et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:8447–8451). Foreløpig er det identifisert > 1000 sykdomsutløsende mutasjoner i CF-genet (<http://www.genet.sickkids.på.ca/cftr/>). Den mest utbredte mutasjonen er en delesjon av fenylalanin ved posisjon 508 i CFTR-aminosyresekvensen, hvilken ofte omtales som $\Delta F508$ -CFTR. Denne mutasjonen skjer i ca. 70 % av tilfellene av cystisk fibrose og er assosiert med en alvorlig sykdom.

Delesjonen av rest 508 i $\Delta F508$ -CFTR forhindrer det nascerende proteinet i å folde riktig. Dette resulterer i mutantproteinets manglende evne til å forlate det endoplasmatiske retikulum ("ER") og trafikkere til plasmamembranen. Antallet kanaler i membranen er følgelig langt mindre enn observert i celler som uttrykker villtype-CFTR. I tillegg til svekket trafikk resulterer mutasjonen i defekt kanal gating. Det reduserte antallet kanaler i membranen og den defekte gatingen fører til sammen til redusert anionetransport gjennom epitlene, hvilket fører til defekt ione- og fluidtransport. (Quinton, P. M. (1990), FASEB J. 4: 2709–2727). Studier har imidlertid vist at de reduserte antallene $\Delta F508$ -CFTR i membranen er funksjonelle, skjønt mindre enn villtype-CFTR. (Dalemans et al. (1991), Nature Lond. 354: 526–528; Denning et al., ovenfor; Pasyk and Foskett (1995), J. Cell. Biochem. 270: 12347–50). I tillegg til $\Delta F508$ -CFTR kan andre sykdomsutløsende mutasjoner i CFTR som resulterer i defekt trafikk, syntese og/eller kanal gating, opp- eller nedreguleres for å endre anionesekresjonen og modifisere sykdommens progresjon og/eller alvorlighetsgrad.

Selv om CFTR transporterer forskjellige molekyler i tillegg til anioner, er det klart at denne rollen (transporten av anioner) representerer ett element i en viktig mekanisme for transport av ioner og vann gjennom epitelet. De andre elementene inkluderer den epiteliale Na^+ -kanalen, ENaC, $\text{Na}^+/\text{2Cl}^-/\text{K}^+$ -kotransportør, Na^+/K^+ -ATPase-pumpe og den basolaterale membranens K^+ -kanaler, som er ansvarlige for opptaket av klorid i cellen.

Disse elementene samarbeider om å oppnå retningsavhengig transport over epitelet via deres selektive ekspresjon og lokalisering innenfor cellen. Kloridabsorpsjon skjer ved den samordnede aktiviteten av ENaC og CFTR som er til stede på den apikale membranen, og Na^+/K^+ -ATPase-pumpen og Cl-kanalene uttrykt på cellens basolaterale overflate. Sekundær aktiv transport av klorid fra

den lumenale siden fører til akkumulering av intracellulært klorid, som deretter passivt kan forlate cellen via Cl^- -kanaler, hvilket resulterer i en vektoriell transport. Anordningen av $\text{Na}^+/\text{2Cl}^-/\text{K}^+$ -kotransportør, Na^+/K^+ -ATPase-pumpe og den basolaterale membranens K^+ -kanaler på den basolaterale overflaten og CFTR på den lumenale siden, samordner sekresjonen av klorid via CFTR på den lumenale siden. Siden vann sannsynligvis aldri aktivt transporteres selv, avhenger dets strømming over epitler av små transepiteliale osmotiske gradienter generert av bulkstrømmingen av natrium og klorid.

I tillegg til cystisk fibrose kan modulasjon av CFTR-aktivitet være fordelaktig for andre sykdommer som ikke er direkte forårsaket av mutasjoner i CFTR, slik som sekretoriske sykdommer og andre proteinfoldingssykdommer mediert av CFTR. Disse inkluderer, men er ikke begrenset til kronisk obstruktiv lungesykdom (KOLS), keratoconjunctivitis sicca og Sjögrens syndrom.

KOLS er karakterisert ved en luftveisbegrensning som er progressiv og ikke fullt ut reversibel. Luftveisbegrensningen skyldes slimhypersekresjon, emfysem og bronkiolitt. Aktivatorer av mutant- eller villtype-CFTR tilbyr en potensiell behandling av slimhypersekresjon og svekket slim-clearance som er alminnelig ved KOLS. Økning i anionesekresjon over CFTR kan spesielt lette fluidtransport til luftveisoverflatevæsken for å fukte slimhinnen og optimalisere perisiliær fluidviskositet. Dette vil føre til forbedret slim-clearance og en reduksjon i symptomene assosiert med KOLS. Keratoconjunctivitis sicca karakteriseres ved en reduksjon i vandig tåreproduksjon og abnormale tårefilmlipid-, protein- og mucinprofiler. Det er mange årsaker til keratoconjunctivitis sicca, hvorav noen inkluderer alder, øyelaserkirurgi, artritt, medisiner, kjemiske/termiske forbrenninger, allergier og sykdommer slik som cystisk fibrose og Sjögrens syndrom. Økning i anionesekresjon via CFTR vil forbedre fluidtransport fra de korneale endotelcellene og sekretoriske kjertlene som omgir øyet for å øke korneal hydrering. Dette vil bidra til å forbedre symptomene assosiert med keratoconjunctivitis sicca. Sjögrens syndrom er en autoimmun sykdom hvor immunsystemet angriper fuktighetsproduserende kjertler i hele kroppen, herunder øyne, munn, hud, lungevev, lever, vagina og tarm. Symptomene inkluderer tørre øyne, tørr munn og tørr vagina samt lungesykdom. Sykdommen assosieres også med revmatoid artritt, systemisk lupus, systemisk sklerose og polymyositt/dermatomyositt. Defekt proteintrafikk antas å forårsake

sykdommen, og det finnes bare begrensede behandlingsalternativer. Modulatorer av CFTR-aktivitet kan hydrere de forskjellige organene som rammes av sykdommen, og kan bidra til å elevere de assosierte symptomene.

5 Som beskrevet ovenfor antas det at delesjonen av rest 508 i $\Delta F508$ -CFTR forhindrer at det nascerende proteinet folder riktig, og resulterer i dette mutantproteinets manglende evne til å forlate ER og trafikkere til plasmamembranen. Følgelig er ikke tilstrekkelige mengder av det modne proteinet til stede ved plasmamembranen, og kloridtransport innenfor epitelvev
 10 reduseres vesentlig. Dette cellulære fenomenet med defekt ER-prosessering av ABC-transportører med ER-mekanismen har vist seg å være det underliggende grunnlaget ikke bare for CF-sykdom, men for et bredt spekter av andre isolerte og arvede sykdommer. De to måtene ER-mekanismen kan svikte på, er enten ved tap av binding til ER-eksport av proteinene, hvilket fører til nedbrytning,
 15 eller ved ER-akkumulering av disse defekte/misfoldede proteinene [Aridor M, et al., *Nature Med.*, 5(7), s. 745–751 (1999), Shastri, B.S., et al., *Neurochem. International*, 43, s. 1–7 (2003); Rutishauser, J., et al., *Swiss Med Wkly*, 132, s. 211–222 (2002); Morello, JP et al., *TIPS*, 21, s. 466–469 (2000), Bross P., et al., *Human Mut.*, 14, s. 186–198 (1999)]. Sykdommene assosiert med den første klassen av ER-funksjonsfeil er cystisk fibrose (på grunn av misfoldet $\Delta F508$ -CFTR som drøftet ovenfor), arvelig emfysem (på grunn av α_1 -antitrypsin, ikke-PiZ-varianter), arvelig hemokromatose, koagulering-fibrinolyse-mangler slik som protein C-mangel, arvelig angioødem type 1, lipidprosesseringsmangler slik som familiær hyperkolesterolemi, kylomikronemi type 1, α -beta-lipoproteinemi, lysosomale lagringssykdommer slik som I-celle-sykdom/pseudo-Hurler, mukopolysakkaridoser (på grunn av lysosomale prosesseringsenzymmer), Sandhof/Tay-Sachs (på grunn av β -heksosaminidase), Crigler-Najjar type II (på grunn av UDP-glukuronyl-sialyl-transferase), polyendokrinopati/hyperinsulemi, diabetes mellitus (på grunn av insulinreseptor), Laron-dvergvekst (på grunn av veksthormonreseptor), myeloperoksidasemangel, primær hypoparatyreoidisme (på grunn av preproparatyroidhormon), melanom (på grunn av tyrosinase). Sykdommene assosiert med den siste klassen av ER-funksjonsfeil er glykanose CDG type 1, arvelig emfysem (på grunn av α_1 -antitrypsin (PiZ-variant), medfødt hypertyreoidisme, osteogenesis imperfecta (på grunn av prokollagen type I, II, IV), arvelig hypofibrinogenemi (på grunn av fibrinogen), ACT-mangel (på grunn av α_1 -antikymotrypsin), diabetes insipidus (DI), nevrofyseal DI (på grunn av

vasopressinhormon/V2-reseptor), neprogen DI (på grunn av akvaporin II), Charcot-Marie-Tooths syndrom (på grunn av perifert myelinprotein 22), Pelizaeus-Merzbachers sykdom, nevrodegenerative sykdommer, slik som Alzheimers sykdom (på grunn av β APP og preseniliner), Parkinsons sykdom, amyotrofisk lateralsklerose, progressiv supranukleær parese, Picks sykdom, flere nevrologiske polyglutaminlidelser slik som Huntingtons, spinocerebular ataksi type I, spinal og bulbær muskelatrofi, dentatorubal-pallidoluysian, og dystrophia myotonica og spongiforme encefalopatier slik som arvelig Creutzfeldt-Jakobs sykdom (på grunn av prionproteinprosesseringsdefekt), Fabrys sykdom (på grunn av lysosomal α -galactosidase A), Sträussler-Scheinker syndrom, kronisk obstruktiv lungesykdom (KOLS), keratoconjunctivitis sicca og Sjögrens syndrom.

I tillegg til oppregulering av CFTR-aktivitet kan reduksjon av anionesekresjon av CFTR-modulatorer være fordelaktig for behandling av sekretorisk diaré, hvor epitelial vanntransport øker dramatisk som resultat av sekretagogaktivert kloridtransport. Mekanismen involverer økning av cAMP og stimulering av CFTR.

Selv om det er en rekke årsaker til diaré, er de største konsekvensene av diaré sykdommer som er forårsaket av for stor kloridtransport, felles for alle og inkluderer dehydrering, acidose, svekket vekst og dødsfall.

Akutt og kronisk diaré representerer et stort medisinsk problem i mange områder av verden. Diaré er både en vesentlig faktor ved feilernæring og hovedårsaken til dødsfall (5 000 000 dødsfall/år) hos barn under fem år.

Sekretorisk diaré er også en farlig tilstand hos pasienter med ervervet immundefektsyndrom (AIDS) og kronisk inflammatorisk tarmsykdom (IBD). Hvert år får seksten millioner reisende til utviklingsland fra industrialiserte nasjoner diaré, med varierende alvorlighetsgrad og antall tilfeller av diaré avhengig av landet og området for reisen.

Diaré hos husdyr og kjæledyr, for eksempel kyr, griser og hester, sauer, geiter, katter og hunder, også kjent som magesyke, er en viktig årsak til død blant disse dyrene. Diaré kan oppstå som følge av enhver stor omstilling, slik som avvenning eller fysisk flytting, men også som reaksjon på et mangfold av

bakterielle eller virale infeksjoner, og oppstår generelt i løpet av de første timene i dyrets liv.

5 Den vanligste diaréfremkallende bakterien er enterotoksigen E-coli (ETEC), som har K99 pilus antigen. Vanlige virale årsaker til diaré inkluderer rotavirus og coronavirus. Andre infeksjose agenser inkluderer blant annet Cryptosporidium, Giardia lamblia og salmonella.

10 Symptomer på rotaviral infeksjon inkluderer ekskresjon av bløt avføring, dehydrering og svakhet. Coronavirus forårsaker en mer alvorlig sykdom hos nyfødte dyr og har en høyere dødsrate enn rotaviral infeksjon. Ofte kan imidlertid et ungdyr være smittet av mer enn ett virus eller med en kombinasjon av virale og bakterielle mikroorganismer samtidig. Dette øker alvorlighetsgraden av sykdommen drastisk.

15 Følgelig er det behov for modulatorer av ABC-transportøraktivitet og sammensetninger derav som kan anvendes til å modulere ABC-transportøraktiviteten i cellemembranen hos et pattedyr.

20 Det er behov for fremgangsmåter for å behandle ABC-transportørmedierte sykdommer ved hjelp av slike modulatorer av ABC transportøraktivitet.

Det er behov for fremgangsmåter for å modulere en ABC-transportøraktivitet i en *ex vivo* cellemembran hos et pattedyr.

25 Det er behov for modulatorer av CFTR-aktivitet som kan anvendes til å modulere CFTR-aktiviteten i cellemembranen hos et pattedyr.

30 Det er behov for fremgangsmåter for å behandle CFTR-medierte sykdommer ved hjelp av slike modulatorer av CFTR-aktivitet.

Det er behov for fremgangsmåter for å modulere CFTR-aktivitet i en *ex vivo* cellemembran hos et pattedyr.

35 WO 2007/056341 A1 beskriver heterosykliske modulatorer av ATP-bindingskasset-transportører, herunder cystisk fibrose-

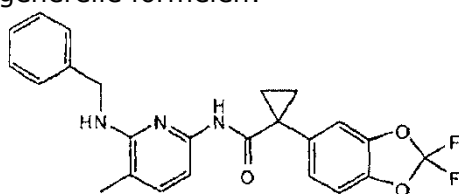
transmembrankonduktansregulator (CFTR). Pyridylringens 5- eller 6-posisjon i disse forbindelsene er substituert. WO 2005/075435 A1 beskriver modulatorer av ATP-bindingskassett-transportører, herunder cystisk fibrose-transmembrankonduktansregulator. Det samme gjelder WO 2008/141119 A2.

5

KORT BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN

Forbindelsen ifølge denne oppfinnelsen og farmasøytisk akseptable sammensetninger derav har nå vist seg å være nyttige som modulatorer av ABC-transportøraktivitet, spesielt CFTR-aktivitet. Forbindelsene har den generelle formelen:

10



I

eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, hvori R^N . Oppfinnelsen er ytterligere rettet mot en farmasøytisk sammensetning omfattende den ovennevnte forbindelsen og en farmasøytisk akseptabel bærer.

15

Forbindelsen og de farmasøytisk akseptable sammensetningene er nyttige for behandling eller begrensnig av alvorlighetsgraden av forskjellige sykdommer, lidelser eller tilstander, herunder, men ikke begrenset til cystisk fibrose, arvelig emfysem, arvelig hemokromatose, koagulerings-fibrinolyse-mangler slik som protein C-mangel, arvelig angioødem type 1, lipidprosesseringsmangler slik som familiær hyperkolesterolemi, kylomikronemi type 1, α -beta-lipoproteinemi, lysosomale lagringssykdommer slik som I-cellesykdom/pseudo-Hurler, mukopolysakkaridose, Sandhof/Tay-Sachs, Crigler-Najjar type II, polyendokrinopati/hyperinsulemi, diabetes mellitus, Laron-dvergvekst, myeloperoksidasemangel, primær hypoparatyreoidisme, melanom, glykanose CDG type 1, arvelig emfysem, medfødt hypertyreoidisme, osteogenesis imperfecta, arvelig hypofibrinogenemi, ACT-mangel, diabetes insipidus (DI), hyponevrofyseal DI, nefrogen DI, Charcot-Marie-Tooths syndrom, Perlizaeus-Merzbachers sykdom, nevrodegenerative sykdommer slik som Alzheimers sykdom, Parkinsons sykdom, amyotrofisk lateral sklerose, progressiv

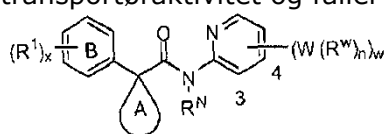
30

supranukleær parese, Picks sykdom, flere nevrologiske polyglutaminlidelser slik som Huntingtons, spinocerebular ataksi type I, spinal og bulbær muskelatrofi, dentatorubral-pallidoluysian atrofi og dystrophia myotonica og spongiforme encefalopater slik som arvelig Creutzfeldt-Jakobs sykdom, Fabrys sykdom, Geustmann-Sträussler-Scheinkers syndrom, KOLS, keratoconjunctivitis sicca og Sjögrens sykdom.

DETALJERT BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN

Generell beskrivelse av forbindelsene ifølge oppfinnelsen:

Forbindelsene som omfattes av kravene, er nyttige som modulatorer av ABC-transportøraktivitet og faller inn under den generelle formelen I:



I

eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, hvori:

R^N er H, alkyl, aryl, heteroaryl, aralkyl, sykloalkyl eller heterosykloalkyl;

A er en eventuelt substituert 3-7-leddet monosyklisk ring;

B er eventuelt fusjonert til en 5-7-leddet ring valgt fra gruppen bestående av sykloalifatisk, aryl, heterosyklisk og heteroaryl;

R^1 er halo, alkyl, OH, alkoksy, tioalkyl, trifluormetoksy; eller

to R^1 på tilgrensende atomer, tatt under ett, danner



;

hvor J er valgt fra gruppen bestående av CH_2 , CF_2 eller $C(CH_3)_2$;

W er uavhengig en binding eller en eventuelt substituert (C1-C6) alkylidenkjede hvori opptil to metylenenheter av W er uavhengig erstattet med -CO-, -O-, -S-, -SO₂- eller -NR'-;

5 R' er uavhengig H, alkyl, aryl, heteroaryl, aralkyl, sykloalkyl eller heterosykloalkyl;

10 R^w er uavhengig H, halo, CN, NO₂, N(R)₂, CF₃, OCF₃, OH, OR, C(O)N(R)₂, C(O)R, CO₂R, -O(C1-C6)alkyliden-OR, -O(C1-C6)alkyliden-N(R)₂, -O(C1-C6)alkyliden-heterosykloalkyl eller en eventuelt substituert alifatisk, sykloalifatisk, aryl, aryloksy, heterosyklisk eller heteroaryl, hvori, når substituert, R^w er substituert med opptil to R²;

15 R² er halo, CN, NO₂, CF₃, OCF₃, OR, OC(O)R, OC(O)N(R)₂, SR, S(O)R, SO₂R, SO₂N(R)₂, SO₃R, C(O)R, CO₂R, C(O)N(R)₂, N(R)₂, NRC(O)R, NRCO₂R, NRC(O)N(R)₂, NRSO₂R, B(OH)₂ eller NRSO₂N(R)₂;

R er uavhengig H, alkyl, sykloalkyl, heterosyklisk, aryl eller heteroaryl;

20 n er 1 eller 2;

w er et heltall fra 0 til og med 4; og

25 x er et heltall fra 0 til og med 5; forutsatt at når W er en binding og R^w er sykloalifatisk, heterosykloalifatisk, aryl eller heteroaryl, er -W-R^w festet til pyridylringens 3- eller 4-posisjon.

Forbindelser og definisjoner:

30 Som anvendt heri skal følgende definisjoner gjelde med mindre annet er angitt.

35 Betegnelsen "ABC-transportør" som anvendt heri betyr et ABC-transportørprotein eller et fragment derav omfattende minst ett bindingsdomene, hvor proteinet eller fragmentet derav er til stede *in vivo* eller *in vitro*. Betegnelsen "bindingsdomene" som anvendt heri betyr et domene på ABC-

transportøren som kan binde til en modulator. Se for eksempel Hwang, T. C. et al., J. Gen. Physiol. (1998): 111(3), 477–90.

5 Betegnelsen "CFTR" som anvendt heri betyr cystisk fibrose-transmembrankonduktansregulator eller en mutasjon derav i stand til regulatoraktivitet, herunder, men ikke begrenset til $\Delta F508$ CFTR og G551D CFTR (se f.eks. <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/> for CFTR-mutasjoner).

10 Betegnelsen "modulering" som anvendt heri betyr økning eller reduksjon med en målbar mengde.

15 For denne oppfinnelsens formål identifiseres kjemikalieelementene i henhold til det periodiske systemet, CAS-versjon, Handbook of Chemistry and Physics, 75th Ed. I tillegg beskrives generelle prinsipper ved organisk kjemi i "Organic Chemistry", Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito: 1999, og "March's Advanced Organic Chemistry", 5th Ed., Ed.: Smith, M.B. and March, J., John Wiley & Sons, New York: 2001, hvorav hele innholdet herved inkorporeres ved henvisning.

20 Som beskrevet heri kan forbindelser med formelen I eventuelt substitueres med ett eller flere substituent, som er illustrert generelt ovenfor, eller som eksemplifisert med bestemte klasser, underklasser og arter ifølge oppfinnelsen. Det skal forstås at uttrykkene "eventuelt substituert" og "substituert eller usubstituert" er anvendt om hverandre. Generelt henviser betegnelsen

25 "substituert", enten den innledes med betegnelsen "eventuelt" eller ei, til erstatning av hydrogenradikaler i en gitt struktur med radikalet til en angitt substituent. Med mindre annet er angitt kan en eventuelt substituert gruppe ha en substituent i hver substituerbare posisjon for gruppen, og når mer enn én posisjon i en gitt struktur kan substitueres med mer enn én substituent valgt fra

30 en angitt gruppe, kan substituenten være enten den samme eller forskjellig i hver posisjon. Kombinasjoner av substituent, som denne oppfinnelsen ser for seg, er foretrukket de som resulterer i formasjonen av stabile eller kjemisk mulige forbindelser. Betegnelsen "stabil" som anvendt heri henviser til forbindelser som i det vesentlige ikke endres når de utsettes for forhold som

35 muliggjør deres produksjon, detektering og foretrukket deres gjenvinning, rensing og anvendelse til ett eller flere av formålene som beskrives heri. I noen

utførelsesformer er en stabil forbindelse eller kjemisk mulig forbindelse en som ikke i det vesentlige endres når den holdes på en temperatur på 40 °C eller lavere, i fravær av fuktighet eller andre kjemiske reaktive forhold, i minst en uke.

5

Betegnelsen "alifatisk" eller "alifatisk gruppe" som anvendt heri betyr en rettkjedet (dvs. uforgrenet) eller forgrenet, substituert eller usubstituert hydrokarbonkjede som er fullstendig mettet, eller som inneholder én eller flere enheter av undermetning, eller et monosyklisk hydrokarbon eller bisyklisk hydrokarbon som er fullstendig mettet, eller som inneholder én eller flere enheter av undermetning, men som ikke er aromatisk (også henvist til heri som "karbocyklus", "sykloalifatisk"), som har ett enkelt festepunkt til resten av molekylet. Med mindre annet er angitt inneholder alifatiske grupper 1–20 alifatiske karbonatomer. I noen utførelsesformer inneholder alifatiske grupper 1–10 alifatiske karbonatomer. I andre utførelsesformer inneholder alifatiske grupper 1–8 alifatiske karbonatomer. I ytterligere andre utførelsesformer inneholder alifatiske grupper 1–6 alifatiske karbonatomer, og i enda ytterligere utførelsesformer inneholder alifatisk grupper 1–4 alifatiske karbonatomer. I noen utførelsesformer henviser "sykloalifatisk" (eller "karbocyklus") til et monosyklisk C₃–C₈ hydrokarbon eller bisyklisk C₈–C₁₂ hydrokarbon som er fullstendig mettet eller som inneholder ett eller flere enheter undermetning, men som ikke er aromatisk, som har ett festepunkt til resten av molekylet, hvori enhver enkeltstående ring i det bisykliske ringsystemet har 3–7 elementer. Egnede alifatiske grupper inkluderer, men er ikke begrenset til lineære eller forgrenede, substituerte eller usubstituerte alkyl-, alkenyl-, alkynylgrupper og hybrider derav, slik som (sykloalkyl)alkyl, (sykloalkenyl)alkyl eller (sykloalkyl)alkenyl.

10

15

20

25

30

Betegnelsen "heteroalifatisk" som anvendt heri betyr alifatiske grupper hvori ett eller to karbonatomer uavhengig er erstattet med én eller flere av oksygen, svovel, nitrogen, fosfor eller silisium. Heteroalifatiske grupper kan være substituerte eller usubstituerte, forgrenede eller uforgrenede, sykliske eller asykliske og inkluderer "heterosyklus", "heterosyklyl", "heterosykloalifatiske" eller "heterosykliske" grupper.

35

Betegnelsen "heterosyklus", "heterosyklyl", "heterosykloalifatisk" eller "heterosyklisk" som anvendt heri betyr ikke-aromatiske, monosykliske,

bisykliske eller trisykliske ringsystemer hvor én eller en flerhet av ringelementer er et uavhengig valgt heteroatom. I noen utførelsesformer er "heterosyklus"-, "heterosyklyl"-, "heterosykloalifatisk"- eller "heterosyklisk"-gruppen tre til fjorten ringelementer, hvor ett eller flere ringelementer er et heteroatom uavhengig valgt fra gruppen bestående av oksygen, svovel, nitrogen og fosfor, og hver ring i systemet inneholder 3 til 7 ringelementer.

Betegnelsen "heteroatom" betyr én eller flere av bor, oksygen, svovel, nitrogen, fosfor, eller silisium (inkludert enhver oksidert form av nitrogen, svovel, fosfor eller silisium; den kvaterniserte formen av ethvert basisk nitrogen eller et substituerbart nitrogen i en heterosyklisk ring, for eksempel N (som i 3,4-dihydro-2*H*-pyrrolyl), NH (som i pyrrolidinyll) eller NR⁺ (som i N-substituert pyrrolidinyll)).

Betegnelsen "umettet" som anvendt heri betyr at en del har én eller flere enheter med undermetning.

Betegnelsen "alkoksy" eller "tioalkyl" som anvendt heri henviser til en alkylgruppe, som definert ovenfor, festet til hovedkarbonkjeden gjennom et oksygen ("alkoksy") eller svovel ("tioalkyl")-atom.

Betegnelsene "haloalifatisk" og "haloalkoksy" betyr alifatisk eller alkoksy, som kan være tilfellet, substituert med ett eller flere halogenatomer. Betegnelsen "halogen" betyr F, Cl, Br eller I. Eksempler på haloalifatisk inkluderer -CHF₂, -CH₂F, -CF₃, -CF₂- eller perhaloalkyl slik som -CF₂CF₃.

Betegnelsen "aryl" anvendt alene eller som part av en større del som i "aralkyl", "aralkoksy" eller "aryloksyalkyl", henviser til monosykliske, bisykliske og trisykliske ringsystemer med totalt fem til fjorten ringelementer, hvori minst én ring i systemet er aromatisk, og hvori hver ring i systemet inneholder 3 til 7 ringelementer. Betegnelsene "aryl" og "arylring" kan være anvendt om hverandre. Betegnelsen "aryl" henviser også til heteroarylringsystemer som definert nedenfor heri.

Betegnelsen "heteroaryl" anvendt alene eller som part av en større del som i "heteroaralkyl" eller "heteroarylalkoksy", henviser til monosykliske, bisykliske og

trisykliske ringsystemer med totalt fem til fjorten ringelementer, hvori minst én ring i systemet er aromatisk, minst én ring i systemet inneholder ett eller flere heteroatomer, og hvori hver ring i systemet inneholder 3 til 7 ringelementer. Betegnelsene "heteroaryl", "heteroarylring" eller "heteroaromatisk" kan være anvendt om hverandre.

En gruppe av aryl (inkludert aralkyl, aralkoksy, aryloksyalkyl og lignende) eller heteroaryl (inkludert heteroaralkyl og heteroarylalkoksy og lignende) kan inneholde én eller flere substituenten. Egnede substituenten på det umettede karbonatomet av en aryl- eller heteroarylgruppe er valgt fra gruppen bestående av halogen; $-R^\circ$; $-OR^\circ$; $-SR^\circ$; 1,2-metylen-dioksy; 1,2-etylendioksy; fenyl (Ph) eventuelt substituert med R° ; $-O(Ph)$ eventuelt substituert med R° ; $-(CH_2)_{1-2}(Ph)$, eventuelt substituert med R° ; $-CH=CH(Ph)$, eventuelt substituert med R° ; $-NO_2$; $-CN$; $-N(R^\circ)_2$; $-NR^\circ C(O)R^\circ$; $-NR^\circ C(O)N(R^\circ)_2$; $-NR^\circ CO_2R^\circ$; $-NR^\circ NR^\circ C(O)R^\circ$; $-NR^\circ NR^\circ C(O)N(R^\circ)_2$; $-NR^\circ NR^\circ CO_2R^\circ$; $-C(O)C(O)R^\circ$; $-C(O)CH_2C(O)R^\circ$; $-CO_2R^\circ$; $-C(O)R^\circ$; $-C(O)N(R^\circ)_2$; $-OC(O)N(R^\circ)_2$; $-S(O)_2R^\circ$; $-SO_2N(R^\circ)_2$; $-S(O)R^\circ$; $-NR^\circ SO_2N(R^\circ)_2$; $-NR^\circ SO_2R^\circ$; $-C(=S)N(R^\circ)_2$; $-C(=NH)N(R^\circ)_2$; og $-(CH_2)_{0-2}NHC(O)R^\circ$, hvori hver uavhengige forekomst av R° er valgt fra gruppen bestående av hydrogen, eventuelt substituert C_{1-6} alifatisk, en usubstituert 5–6-leddet heteroarylring eller heterosyklisk ring, fenyl, $-O(Ph)$ og $-CH_2(Ph)$, eller, uten hinder av definisjonen ovenfor, danner to uavhengige forekomster av R° , på den samme substituenten eller forskjellige substituenten, tatt under ett med atom(ene) som hver R° -gruppe er bundet til, en 3–8-leddet sykloalkyl-, heterosyklisk-, aryl- eller heteroarylring med 0–3 heteroatomer uavhengig valgt fra gruppen bestående av nitrogen, oksygen og svovel. Eventuelle substituenten på den alifatiske gruppen av R° er valgt fra gruppen bestående av NH_2 , $NH(C_{1-4}alifatisk)$, $N(C_{1-4}alifatisk)_2$, halogen, $C_{1-4}alifatisk$, OH , $O(C_{1-4}alifatisk)$, NO_2 , CN , CO_2H , $CO_2(C_{1-4}alifatisk)$, $O(haloC_{1-4}alifatisk)$ og $haloC_{1-4}alifatisk$, hvori hver av de foregående $C_{1-4}alifatiske$ gruppene av R° er usubstituerte.

En alifatisk eller heteroalifatisk gruppe eller en ikke-aromatisk heterosyklisk ring kan inneholde ett eller flere substituenten. Egnede substituenten på det mettede karbonet i en alifatisk eller heteroalifatisk gruppe, eller i en ikke-aromatisk heterosyklisk ring, er valgt fra gruppen bestående av de som er opplistet ovenfor for det umettede karbonet i en aryl- eller heteroarylgruppe og inkluderer

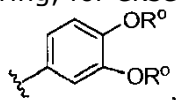
ytterligere følgende: $=O$, $=S$, $=NNHR^*$, $=NN(R^*)_2$, $=NNHC(O)R^*$, $=NNHCO_2(\text{alkyl})$, $=NNHSO_2(\text{alkyl})$ og $=NR^*$, der hver R^* er uavhengig valgt fra gruppen bestående av hydrogen og en eventuelt substituert C_{1-6} alifatisk. Eventuelle substituenten på den alifatiske gruppen av R^* er valgt fra gruppen

bestående av NH_2 , $NH(C_{1-4}\text{alifatisk})$, $N(C_{1-4}\text{alifatisk})_2$, halogen, C_{1-4} alifatisk, OH , $O(C_{1-4}\text{alifatisk})$, NO_2 , CN , CO_2H , $CO_2(C_{1-4}\text{alifatisk})$, $O(\text{halo}C_{1-4}\text{alifatisk})$ og $\text{halo}(C_{1-4}\text{alifatisk})$, hvori hver av de foregående C_{1-4} alifatiske gruppene av R^* er usubstituerte.

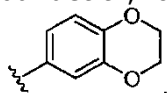
Eventuelle substituenten på nitrogenet i en ikke-aromatisk heterosyklisk ring er valgt fra gruppen bestående av $-R^+$, $-N(R^+)_2$, $-C(O)R^+$, $-CO_2R^+$, $-C(O)C(O)R^+$, $-C(O)CH_2C(O)R^+$, $-SO_2R^+$, $-SO_2N(R^+)_2$, $-C(=S)N(R^+)_2$, $-C(=NH)-N(R^+)_2$ og $-NR^+SO_2R^+$; hvori R^+ er hydrogen, et eventuelt substituert C_{1-6} alifatisk, eventuelt substituert fenyl, eventuelt substituert $-O(Ph)$, eventuelt substituert $-CH_2(Ph)$, eventuelt substituert $-(CH_2)_{1-2}(Ph)$; eventuelt substituert $-CH=CH(Ph)$; eller en usubstituert 5-6-leddet heteroarylring eller heterosyklisk ring med ett til fire heteroatomer uavhengig valgt fra gruppen bestående av oksygen, nitrogen og svovel, eller, uten hinder av definisjonen ovenfor, danner to uavhengige forekomster av R^+ , på den samme substituenten eller forskjellige substituenten, tatt under ett med atom(ene) som hver R^+ -gruppe er bundet til, en 3-8-leddet sykloalkyl-, heterosyklisk-, aryl- eller heteroarylring med 0-3 heteroatomer uavhengig valgt fra gruppen bestående av nitrogen, oksygen og svovel. Eventuelle substituenten på den alifatiske gruppen eller fenylingen av R^+ er valgt fra gruppen bestående av NH_2 , $NH(C_{1-4}\text{alifatisk})$, $N(C_{1-4}\text{alifatisk})_2$, halogen, C_{1-4} alifatisk, OH , $O(C_{1-4}\text{alifatisk})$, NO_2 , CN , CO_2H , $CO_2(C_{1-4}\text{alifatisk})$, $O(\text{halo}C_{1-4}\text{alifatisk})$ og $\text{halo}(C_{1-4}\text{alifatisk})$, hvori hver av de foregående C_{1-4} alifatiske gruppene av R^+ er usubstituerte.

Betegnelsen "alkylidenkjede" henviser til en rett eller forgrenet karbonkjede som kan være fullstendig mettet eller ha én eller flere enheter med undermetning, og har to festepunkt til resten av molekylet. Betegnelsen "spirosykloalkyliden" henviser til en karbosyklisk ring som kan være fullstendig mettet eller ha én eller flere enheter med undermetning, og har to festepunkt fra det samme ringkarbonatomet til resten av molekylet.

Som inngående beskrevet ovenfor tas i noen utførelsesformer to uavhengige forekomster av R° (eller R^{+} , eller enhver annen variabel som er definert på lignende måte heri), under ett med atom(ene) som hver variabel er bundet til, for å danne en 3–8-leddet sykloalkyl-, heterosykyl-, aryl- eller heteroarylring med 0–3 heteroatomer uavhengig valgt fra gruppen bestående av nitrogen, 5
 oksygen og svovel. Eksempler på ringer som dannes når to uavhengige forekomster av R° (eller R^{+} eller enhver annen variabel som er definert på lignende måte heri) tas under ett med atom(ene) som hver variabel er bundet til, inkluderer, men er ikke begrenset til følgende: a) to uavhengige forekomster av R° (eller R^{+} eller enhver annen variabel som er definert på samme måte heri) som er bundet til det samme atomet og tas under ett med det atomet for å danne en ring, for eksempel $N(R^{\circ})_2$, der begge forekomster av R° tas under ett med nitrogenatomet for å danne en piperidin-1-yl-, piperazin-1-yl- eller morfolin-4-yl-gruppe; og b) to uavhengige forekomster av R° (eller R^{+} eller 10
 enhver annen variabel som er definert på samme måte heri) som er bundet til forskjellige atomer og tas under ett med begge disse atomene for å danne en ring, for eksempel der en fenylgruppe er substituert med to forekomster av OR°



Disse to forekomstene av R° tas under ett med oksygenatomene som de er bundet til, for å danne en fusjonert 6-leddet oksygeninnholdende ring:



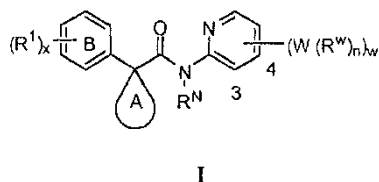
Det skal forstås at et mangfold av andre ringer kan dannes når to uavhengige forekomster av R° (eller R^{+} eller enhver annen variabel som er definert på lignende måte heri) tas under ett med atom(ene) som hver variabel er bundet til, og at eksemplene som er beskrevet inngående ovenfor, ikke er ment å være 25
 begrensende.

Med mindre annet er angitt er strukturer angitt heri også ment å inkludere alle isomere (f.eks. enantiomere, diastereomere og geometriske (eller konformasjonelle)) former av strukturen, f.eks. R- og S-konfigurasjonene for hvert asymmetriske senter, (Z) og (E) dobbeltbindingsisomerer og (Z) og (E) konformasjonelle isomerer. Enkle stereokjemiske isomerer og enantiomere, diastereomere og geometriske (eller konformasjonelle) blandinger av de foreliggende forbindelsene er derfor innenfor oppfinnelsens omfang. Med mindre 30

annet er angitt er alle tautomere former av forbindelsene ifølge oppfinnelsen innenfor oppfinnelsens omfang. Med mindre annet er angitt er strukturer angitt heri i tillegg også ment å inkludere forbindelser som er forskjellige bare i nærvær av én eller flere isotopisk anrikede atomer. For eksempel er forbindelser med de foreliggende strukturene, unntatt for erstatning av hydrogen med deuterium eller tritium, eller erstatning av et karbon med et ^{13}C - eller ^{14}C -anrikt karbon, innenfor denne oppfinnelsens omfang. Slike forbindelser er nyttige for eksempel som analytiske hjelpemiddel eller prober i biologiske assayer.

10 *Beskrivelse av eksempler på forbindelser:*

Et eksempel på forbindelse med formelen **I**:



15 eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, hvori:

R^N er H, alkyl, aryl, heteroaryl, aralkyl, sykloalkyl eller heterosykloalkyl;

A er en eventuelt substituert 3–7-leddet monosyklisk ring;

20

B er eventuelt fusjonert til en 5–7-leddet ring valgt fra gruppen bestående av sykloalifatisk, aryl, heterosyklisk og heteroaryl;

R^1 er halo, alkyl, OH, alkoksy, trifluormetoksy; eller

25

to R^1 på tilgrensende atomer, tatt under ett, danner



hvor J er valgt fra gruppen bestående av CH_2 , CF_2 eller $\text{C}(\text{CH}_3)_2$;

W er uavhengig en binding eller en (C1-C6) alkylidenkjede hvori opptil to metylenenheter av W er uavhengig erstattet med -CO-, -O-, -S-, -SO₂- eller -NR'-;

5

R' er uavhengig H, alkyl, aryl, heteroaryl, aralkyl, sykloalkyl eller heterosyklisk;

R^w er uavhengig H, halo, CN, NO₂, N(R)₂, CF₃, OCF₃, OH, OR, C(O)R, CO₂R, C(O)N(R)₂, -O(C1-C6)alkyliden-OR, -O(C1-C6)alkyliden-N(R)₂, -O(C1-C6)alkyliden-heterosyklisk eller en eventuelt substituert alifatisk, sykloalifatisk, aryl, aryloksy, heterosyklisk eller heteroaryl, hvori, når substituert, R^w er substituert med opptil to R²;

10

R² er halo, CN, NO₂, CF₃, OCF₃, OR, OC(O)R, OC(O)N(R)₂, SR, S(O)R, SO₂R, SO₂N(R)₂, SO₃R, C(O)R, CO₂R, C(O)N(R)₂, N(R)₂, NRC(O)R, NRCO₂R, NRC(O)N(R)₂, NRSO₂R, B(OR)₂ eller NRSO₂N(R)₂;

15

R er uavhengig H, alkyl, sykloalkyl, heterosyklisk, aryl eller heteroaryl;

20

n er 1 eller 2;

w er et heltall fra 0 til og med 4; og

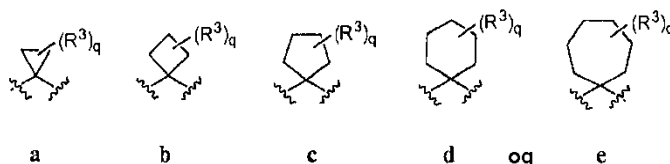
x er et heltall fra 0 til og med 5;

25

forutsatt at når W er en binding og R^w er sykloalifatisk, heterosykloalifatisk, aryl eller heteroaryl, er -W-R^w festet til pyridylringens 3- eller 4-posisjon.

I eksempler på forbindelser med formelen **I** og de tilhørende definisjonene, er A valgt fra gruppen bestående av:

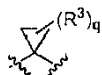
30



hvori

R^3 er alkyl, alkaryl, aryl eller heteroaryl; og

q er et heltall fra 0 til og med 4. I en ytterligere utførelsesform er A



5 I en ytterligere utførelsesform er A



Et annet eksempel på forbindelse vedrører en forbindelse med formelen **I** og de tilhørende definisjonene, hvori x er 2.

10

Et annet eksempel på forbindelse vedrører en forbindelse med formelen **I** og de tilhørende definisjonene, hvori R^1 er halo. I en annen utførelsesform er R^1 klor. I en annen utførelsesform er R^1 alkyl. I en annen utførelsesform er R^1 metyl. I en annen utførelsesform er R^1 OH. I en annen utførelsesform er R^1 alkoksy. I en ytterligere utførelsesform er R^1 metoksy. I en annen utførelsesform er R^1 tioalkyl. I et annet eksempel på forbindelse med formelen **I** er R^1 tiometyl. I et ytterligere eksempel på forbindelse med formelen **I** er R^1 trifluormetoksy.

15

Et annet eksempel på forbindelse med formelen **I** vedrører en forbindelse med formelen **I** og de tilhørende definisjonene, hvori to R^1 på tilgrensende atomer, tatt under ett, danner

20



hvori J er valgt fra gruppen bestående av CH_2 , CF_2 eller $C(CH_3)_2$. I et ytterligere eksempel på forbindelse med formelen **I** er J CH_2 . I et ytterligere eksempel på forbindelse med formelen **I** er J CF_2 ,

25

Et annet eksempel på forbindelse med formelen **I** vedrører en forbindelse med formelen **I** og de tilhørende definisjonene, hvori R^N er H eller alkyl. I en ytterligere utførelsesform er R^N H. I en ytterligere utførelsesform er R^N alkyl.

30

Et annet eksempel på forbindelse med formelen **I** vedrører en forbindelse med formelen **I** og de tilhørende definisjonene, hvori w er 0. I et ytterligere eksempel

på forbindelse med formelen **I** er w 1. I et ytterligere eksempel på forbindelse med formelen **I** er w 2.

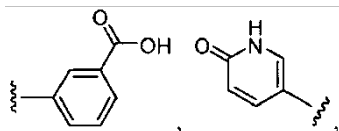
5 Et annet eksempel på forbindelse med formelen **I** vedrører en forbindelse med formelen **I** og de tilhørende definisjonene, hvori n er 1. I et ytterligere eksempel på forbindelse med formelen **I** er n 2.

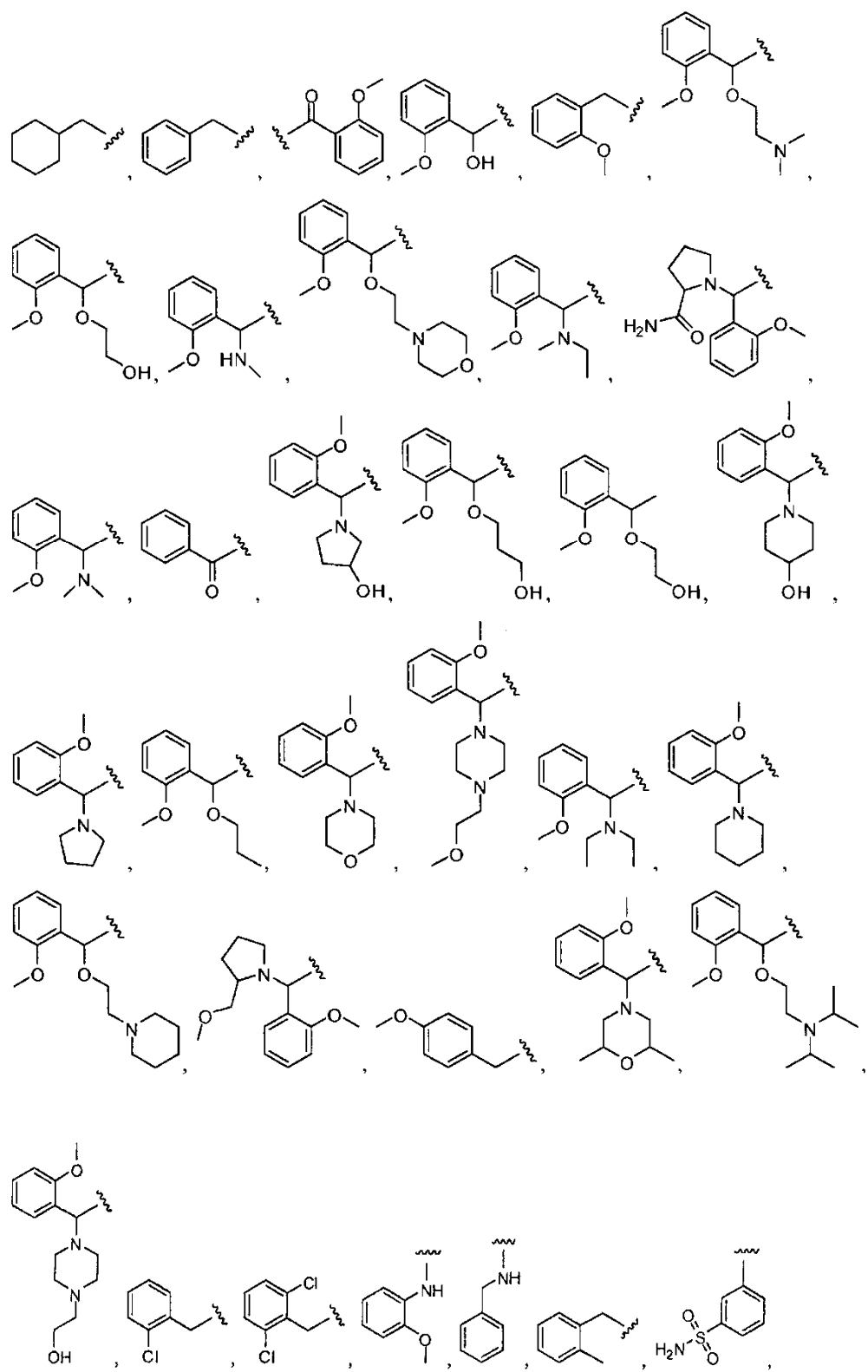
10 I en annen utførelsesform vedrører den foreliggende oppfinnelsen en forbindelse med formelen **I** og de tilhørende definisjonene, hvori W er en binding. I en ytterligere utførelsesform er W en eventuelt substituert (C1-C6) alkylidenkjede. I en ytterligere utførelsesform er W -CH₂-. I en ytterligere utførelsesform er W -NH-. I en ytterligere utførelsesform er W -O-. I en ytterligere utførelsesform er W -CO-. I en ytterligere utførelsesform er W -OCH₂-.

15 Et annet eksempel på forbindelse med formelen **I** vedrører en forbindelse med formelen **I** og de tilhørende definisjonene, hvori R^w er H. I en ytterligere utførelsesform er R^w OH. I en ytterligere utførelsesform er R^w heterosyklisk. I en ytterligere utførelsesform er R^w aryl. I en ytterligere utførelsesform er R^w fenyl. I en ytterligere utførelsesform er R^w heteroaryl. I en ytterligere utførelsesform er R^w pyridyl. I en ytterligere utførelsesform er R^w alkoksy. I en ytterligere utførelsesform er R^w sykloalkyl. I en ytterligere utførelsesform er R^w sykloheksyl.

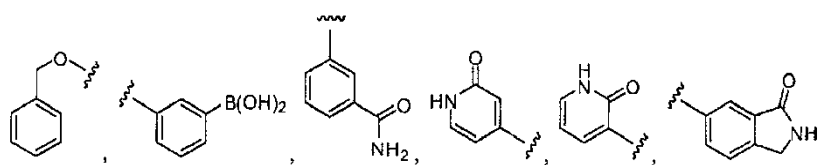
25 Et annet eksempel på forbindelse med formelen **I** vedrører en forbindelse med formelen **I** og de tilhørende definisjonene, hvori -W-R^w er asyklisk. I en annen utførelsesform er -W-R^w en arylring, heteroarylring, sykloalifatisk ring eller heterosykloalifatisk ring. I en ytterligere utførelsesform er -W(R^w)_n valgt fra følgende:

-F, -CH₃, -CH₂CH₃, -CN, -CF₃, -CONH₂, -CH₂CH(CH₃)₂,

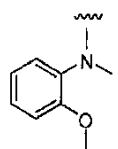




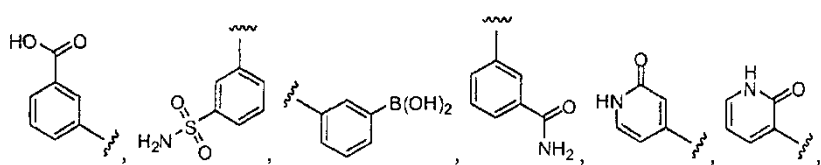
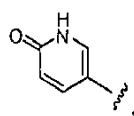
22



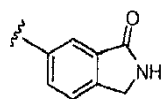
eller



5 I en ytterligere utførelsesform er $-W(R^w)_n$ valgt fra følgende:

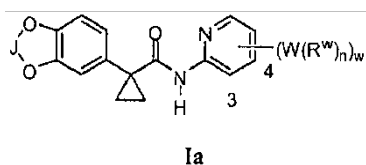


eller



10

Et annet eksempel på forbindelse med formelen **I** vedrører en forbindelse med formelen Ia:



15

eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, hvori:

J er CH_2 eller CF_2 ;

W er uavhengig en binding eller en (C1-C6) alkylidenkjede, hvori opptil to metylenheter av W er uavhengig erstattet med -CO-, -O- eller -NR'-;

5 R' er uavhengig H eller alkyl;

R^w er uavhengig H, halo, CN, N(R)₂, CF₃, OH, CO₂R, C(O)N(R)₂, -O(C1-C6)alkyliden-OR, -O(C1-C6)alkyliden-N(R)₂, -O(C1-C6)alkyliden-heterosyklisk eller eventuelt substituert alifatisk, sykloalifatisk, aryl, aryloksy, heterosyklisk eller heteroaryl, hvori, når substituert, R^w er substituert med opptil to R²;

10

R² er halo, OR, CO₂R, C(O)N(R)₂, SO₂N(R)₂, B(OR)₂ eller N(R)₂;

R er uavhengig H, alkyl, sykloalkyl, heterosyklisk, aryl eller heteroaryl;

15

n er 1 eller 2; og

w er et heltall fra 0 til og med 4;

20 forutsatt at når W er en binding og R^w er sykloalifatisk, heterosykloalifatisk, aryl eller heteroaryl, er -W-R^w festet til pyridylringens 3- eller 4-posisjon.

Et annet eksempel på forbindelse med formelen **I** vedrører en forbindelse med formelen **Ia** og de tilhørende definisjonene, hvori J er CH₂. I en ytterligere utførelsesform er J CF₂.

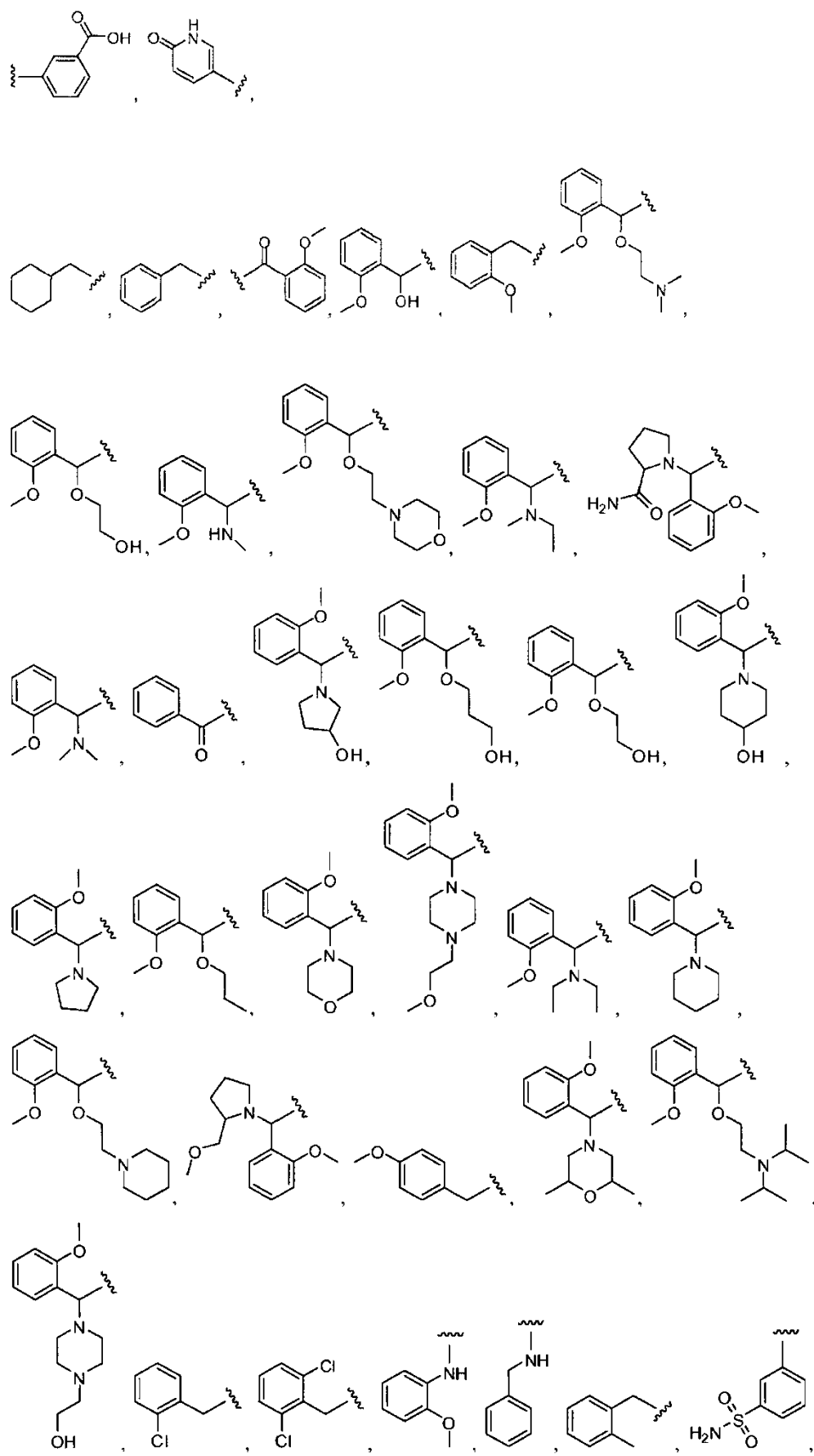
25

Et annet eksempel på forbindelse med formelen **I** vedrører en forbindelse med formelen **Ia** og de tilhørende definisjonene, hvori -W-R^w er asyklisk. I en annen utførelsesform vedrører den foreliggende oppfinnelsen en forbindelse med formelen **Ia** og de tilhørende definisjonene, hvori -W-R^w som er en arylring, heteroarylring, sykloalifatisk ring eller heterosykloalifatisk ring.

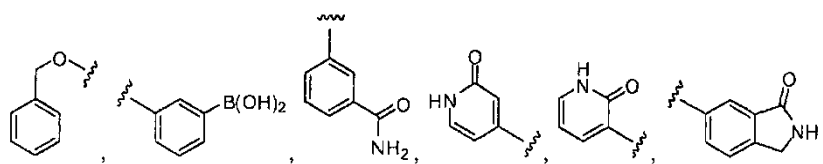
30

Et annet eksempel på forbindelse med formelen **I** vedrører en forbindelse med formelen **Ia** og de tilhørende definisjonene, hvori -W(R^w)_n er valgt fra følgende:

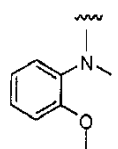
35 -F, -CH₃, -CH₂CH₃, -CN, -CF₃, -CONH₂, -CH₂CH(CH₃)₂,



25

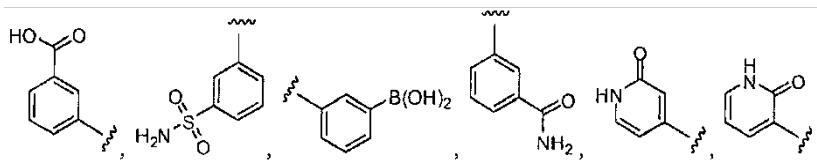
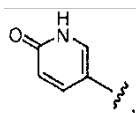


eller



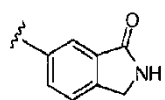
5

I en ytterligere utførelsesform er $-W(R^w)_n$ valgt fra følgende:

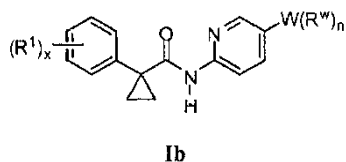


10

eller



Et annet eksempel vedrører en forbindelse med formelen **Ib**:



15

eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, hvori:

R^1 er halo, alkyl, OH, alkoksy, tioalkyl, trifluormetoksy; eller

to R^1 på tilgrensende atomer, tatt under ett, danner



5 hvori J er valgt fra gruppen bestående av CH_2 , CF_2 eller $C(CH_3)_2$;

W er $-NR'$, $-CO-$ eller $-CH_2-$;

R' er uavhengig H eller alkyl;

10

R^W er uavhengig H, halo, CN, $N(R)_2$, CF_3 , OH, CO_2R , $C(O)N(R)_2$, $-O(C1-C6)alkyliden-OR$, $-O(C1-C6)alkyliden-N(R)_2$, $-O(C1-C6)alkyliden-heterosyklisk$ eller eventuelt substituert alifatisk, sykloalifatisk, aryl, aryloksy, heterosyklisk eller heteroaryl, hvori, når substituert, R^W er substituert med opptil to R^2 ;

15

R^2 er halo, OR, CO_2R , $C(O)N(R)_2$, $SO_2N(R)_2$, $B(OR)_2$ eller $N(R)_2$;

R er uavhengig H, alkyl, sykloalkyl, heterosyklisk, aryl eller heteroaryl;

20

n er 1 eller 2; og

x er et heltall fra 0 til og med 5.

25

Et annet eksempel på forbindelse med formelen **I** vedrører en forbindelse med formelen Ib og de tilhørende definisjonene, hvori to R^1 på tilgrensende atomer, tatt under ett, danner

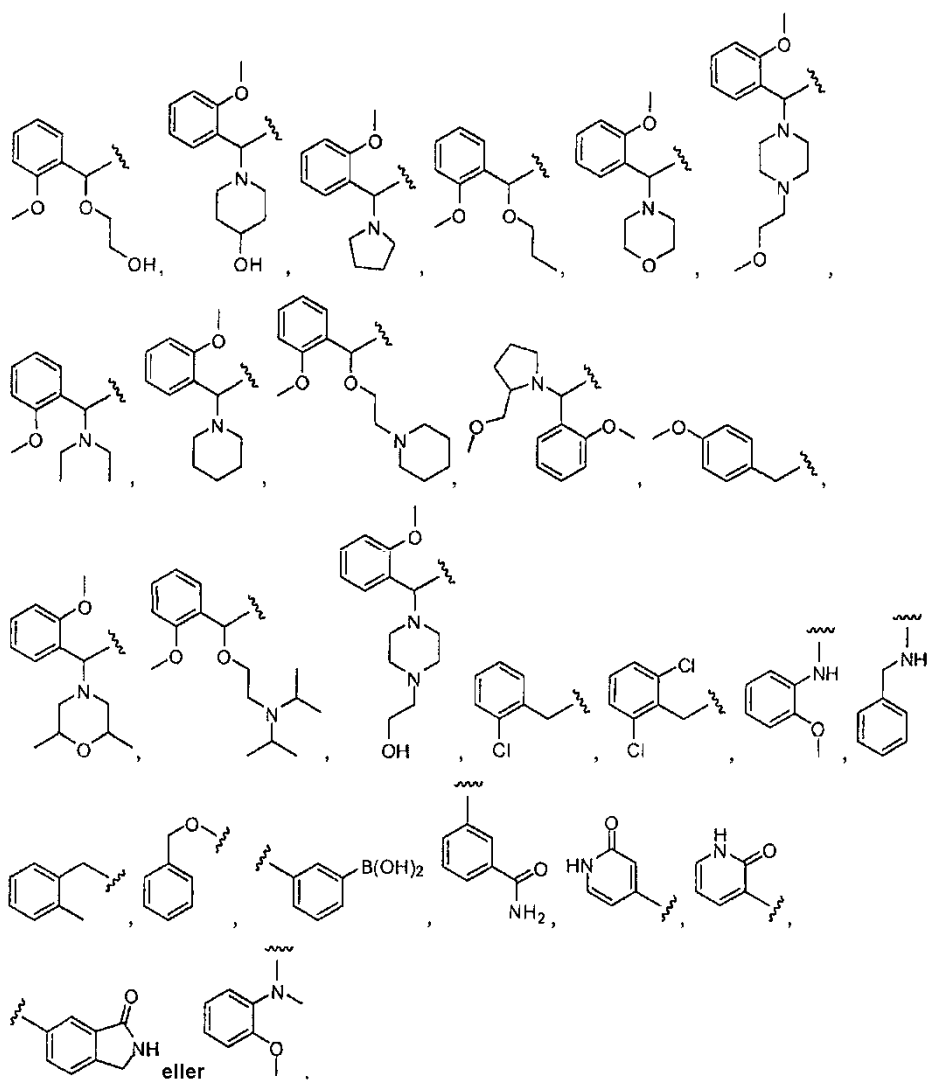


og J er CH_2 . I en annen utførelsesform er J CF_2 .

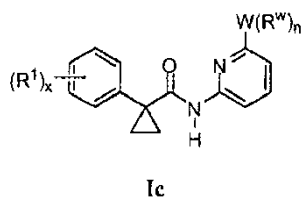
30

Et annet eksempel på forbindelse med formelen **I** vedrører en forbindelse med formelen Ib og de tilhørende definisjonene, hvori $-W(R^W)_n$ er valgt fra følgende:

$-CH_3$, $-CH_2CH_3$, $-CH_2CH(CH_3)_2$,



Et annet eksempel på forbindelse med formelen **I** vedrører en forbindelse med formelen **Ic**:



eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, hvori:

R¹ er halo, alkyl, OH, alkoksy, tioalkyl, trifluormetoksy; eller
to R¹ på tilgrensende atomer, tatt under ett, danner



;

hvor J er valgt fra gruppen bestående av CH_2 , CF_2 eller $\text{C}(\text{CH}_3)_2$;

5 W er $-\text{NR}'$, $-\text{CO}-$ eller $-\text{CH}_2-$;

R' er uavhengig H eller alkyl;

10 R^{W} er uavhengig H, halo, CN, $\text{N}(\text{R})_2$, CF_3 , OH, CO_2R , $\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R})_2$, $-\text{O}(\text{C}1-\text{C}6)\text{alkyliden}-\text{OR}$, $-\text{O}(\text{C}1-\text{C}6)\text{alkyliden}-\text{N}(\text{R})_2$, $-\text{O}(\text{C}1-\text{C}6)\text{alkyliden}-\text{heterosyklisk}$ eller eventuelt substituert alifatisk, sykloalifatisk, aryl, aryloksy, heterosyklisk eller heteroaryl, hvori, når substituert, R^{W} er substituert med opptil to R^2 ;

15 R^2 er halo, OR, CO_2R , $\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R})_2$, $\text{SO}_2\text{N}(\text{R})_2$, $\text{B}(\text{OR})_2$ eller $\text{N}(\text{R})_2$;

R er uavhengig H, alkyl, sykloalkyl, heterosyklisk, aryl eller heteroaryl;

n er 1 eller 2; og

20 x er et heltall fra 0 til og med 5.

Et annet eksempel på forbindelse med formelen **I** vedrører en forbindelse med formelen **Ic** og de tilhørende definisjonene, hvori to R^1 på tilgrensende atomer, tatt under ett, danner

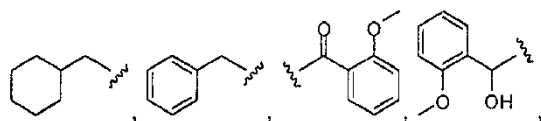


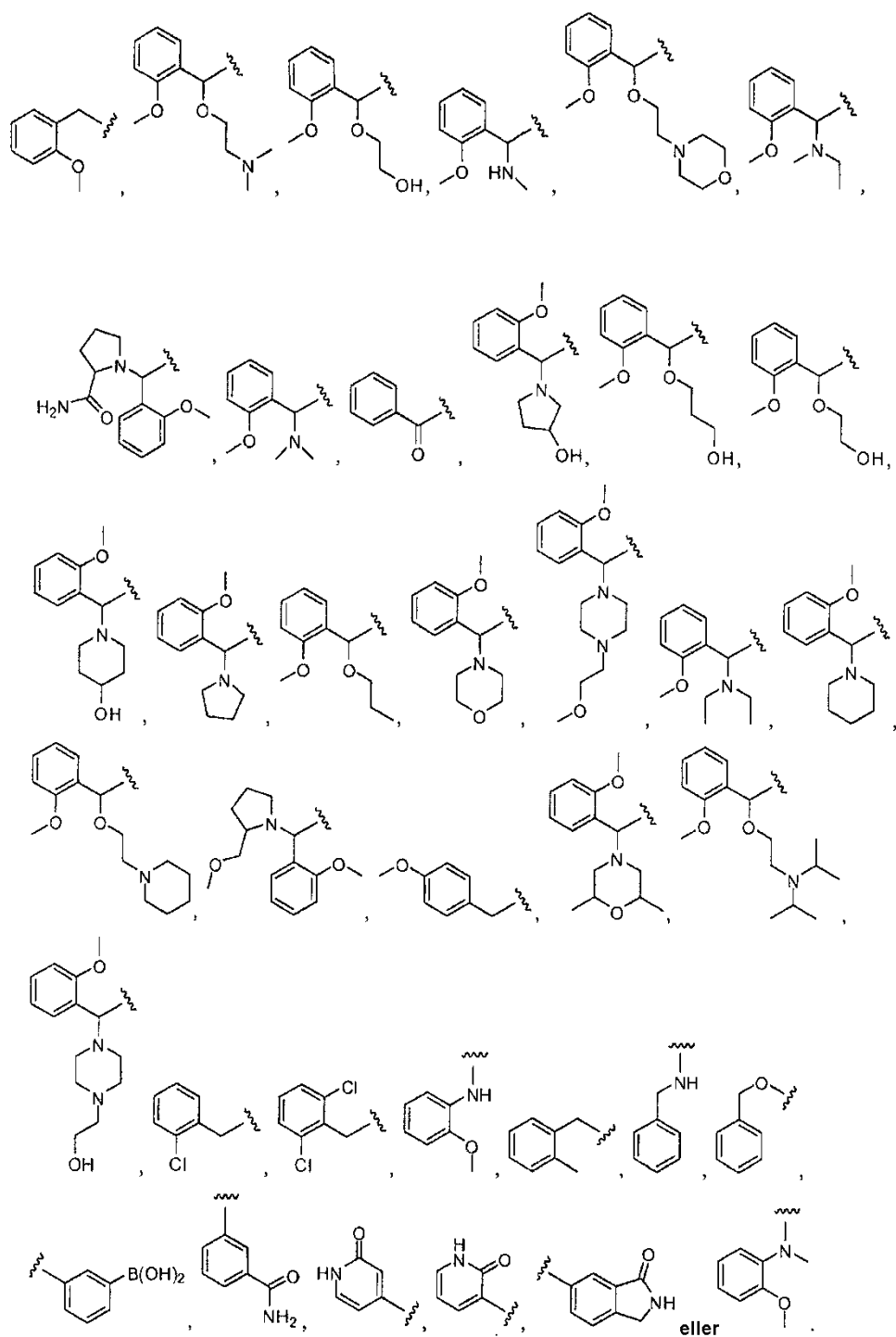
25

og J er CH_2 . I en annen utførelsesform er J CF_2 .

}Et annet eksempel på forbindelse med formelen **I** vedrører en forbindelse med formelen **Ic** og de tilhørende definisjonene, hvori $-\text{W}(\text{R}^{\text{W}})_n$ er valgt fra følgende:

30 $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$,

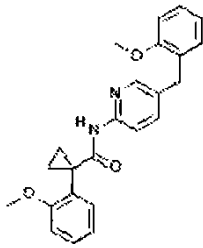
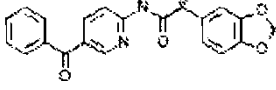
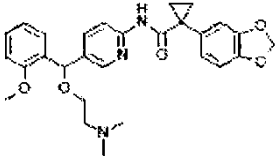
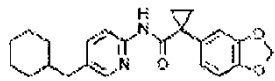
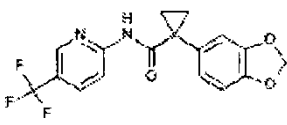
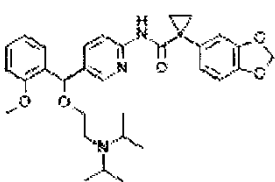
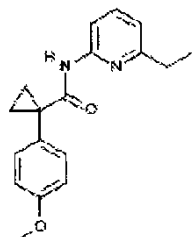
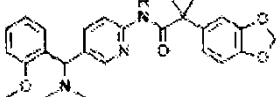
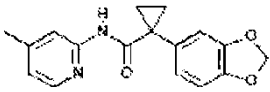
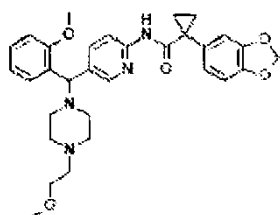
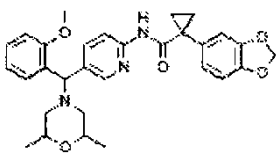
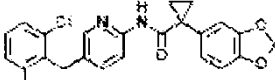
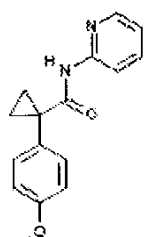
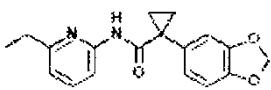
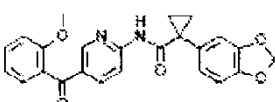


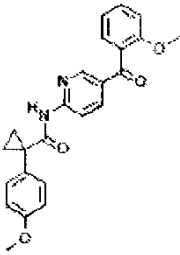
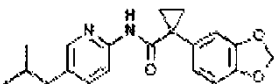
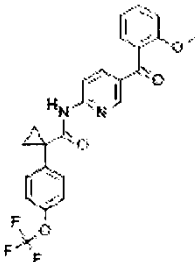
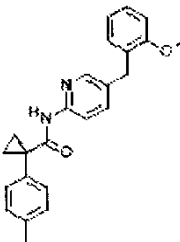
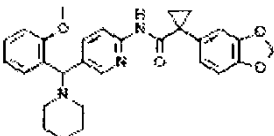
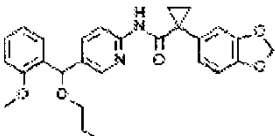
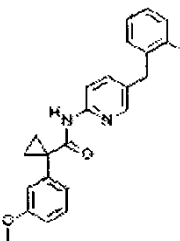
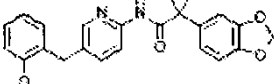
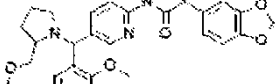
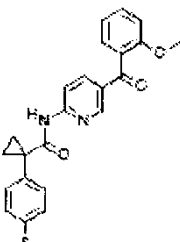
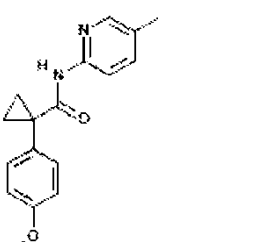
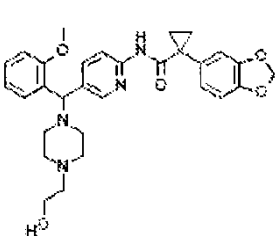
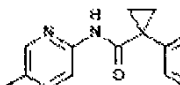
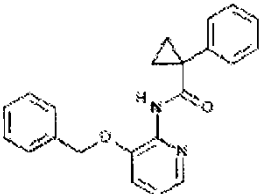
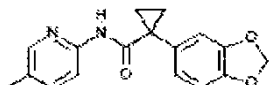


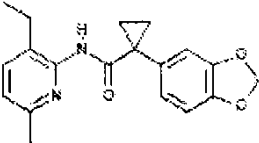
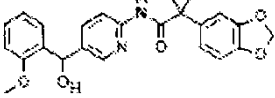
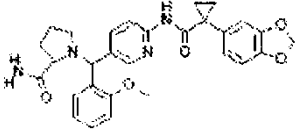
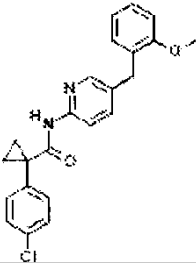
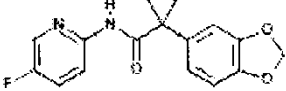
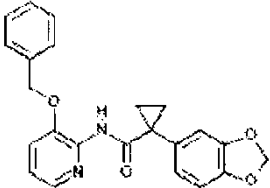
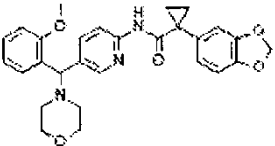
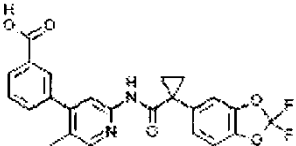
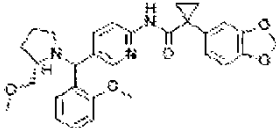
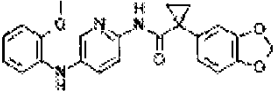
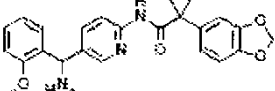
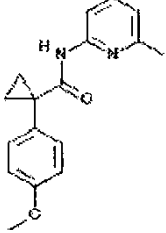
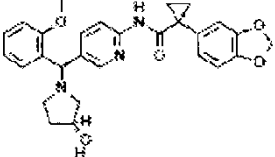
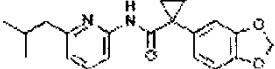
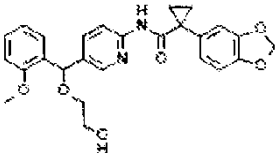
5 Et annet eksempel på forbindelse med formelen **I** vedrører en forbindelse i tabell 1.

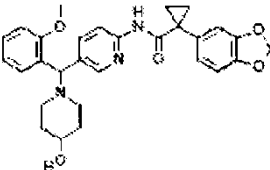
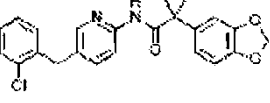
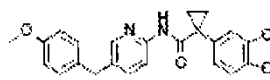
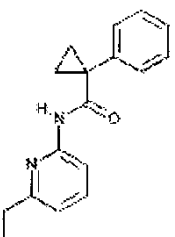
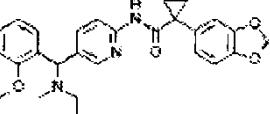
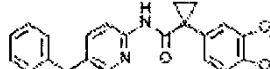
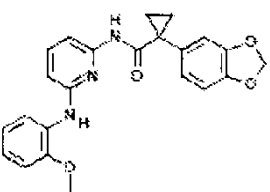
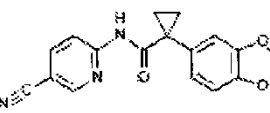
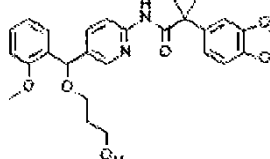
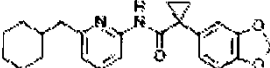
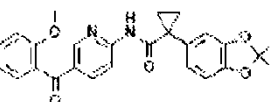
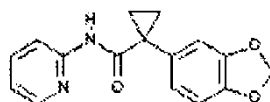
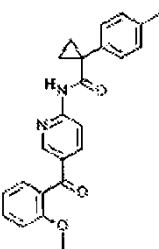
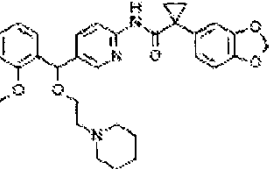
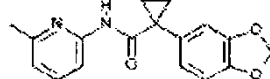
Tabell 1.

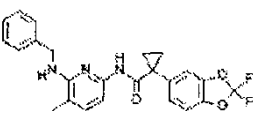
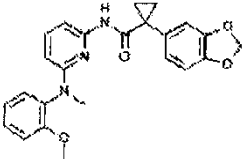
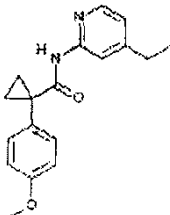
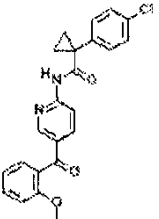
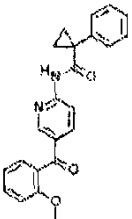
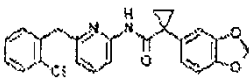
1	2	3
4	5	b
7	8	9
10	11	12
13	14	15

		
16	17	18
		
19	20	21
		
22	23	24
		
25	26	27
		
28	29	30

		
31	32	33
		
34	35	36
		
37	38	39
		
40	41	42
		

43	44	45
		
46	47	49
		
49	50	51
		
52	53	54
		
55	56	57
		
58	59	60

		
61	62	63
		
64	65	66
		
67	68	69
		
70	71	72
		
73	74	75

		
76	77	78
		

Den foreliggende oppfinnelsen vedrører en farmasøytisk sammensetning omfattende (i) en forbindelse ifølge den foreliggende oppfinnelsen; og (ii) en farmasøytisk akseptabel bærer. I en annen utførelsesform omfatter den farmasøytiske sammensetningen et ytterligere middel valgt fra gruppen bestående av et slimløsende middel, en bronkodilatator, et antibiotikum, et antiinfeksiøst middel, et antiinflammatorisk middel, en CFTR-korrektor og et næringsmiddel.

I en annen utførelsesform vedrører den foreliggende oppfinnelsen en fremgangsmåte for å modulere, in vitro, ABC-transportører i en membran av en celle, omfattende trinnet med å opprette kontakt mellom cellen og en forbindelse ifølge den foreliggende oppfinnelsen. I en annen utførelsesform er ABC-transportøren CFTR.

I en annen utførelsesform vedrører den foreliggende oppfinnelsen en forbindelse eller farmasøytisk sammensetning for anvendelse i en fremgangsmåte for å behandle en tilstand, sykdom eller lidelse hos en pasient implisert av ABC-transportøraktivitet, omfattende trinnet med å administrere til pasienten, en forbindelse ifølge den foreliggende oppfinnelsen. I en annen utførelsesform er ABC-transportøren CFTR. Tilstanden, sykdommen eller lidelsen er valgt fra cystisk fibrose, arvelig emfysem, arvelig hemokromatose, koagulerings-

fibrinolyse-mangler slik som protein C-mangel, arvelig angioødem type 1, lipidprosesseringsmangler slik som familiær hyperkolesterolemi, kylomikronemi type 1, α -beta-lipoproteinemi, lysosomale lagringssykdommer slik som I-cellesykdom/pseudo-Hurler, mukopolysakkaridoser, Sandhof/Tay-Sachs, Crigler-Najjar type II, polyendokrinopati/hyperinsulemi, diabetes mellitus, Laron-dvergvekst, myeloperoksidase-mangel, primær hypoparatyreoidisme, melanom, glykanose CDG type 1, arvelig emfysem, medfødt hypertyreoidisme, osteogenesis imperfecta, arvelig hypofibrinogenemi, ACT-mangel, diabetes insipidus (DI), nevrofyseal DI, nefrogen DI, Charcot-Marie-Tooths syndrom, Pelizaeus-Merzbachers sykdom, nevrodegenerative sykdommer slik som Alzheimers sykdom, Parkinsons sykdom, amyotrofisk lateralsklerose, progressiv supranukleær parese, Picks sykdom, flere nevrologiske polyglutaminlidelser slik som Huntingtons, spinocerebellar ataksi type I, spinal og bulbær muskelatrofi, dentatorubral-pallidoluysian atrofi og dystrophia myotonica, og spongiforme encefalopatier slik som arvelig Creutzfeldt-Jakobs sykdom, Fabrys sykdom, Gerstmann-Sträussler-Scheinkers syndrom, KOLS, keratoconjunctivitis sicca og Sjögrens sykdom.

I en annen utførelsesform vedrører den foreliggende oppfinnelsen et kit som anvendes til å måle aktiviteten av en ABC-transportør eller et fragment derav, i en biologisk prøve *in vitro* eller *in vivo*, omfattende: (i) en første sammensetning omfattende en forbindelse ifølge den foreliggende oppfinnelsen; og (ii) instruksjoner for å: a) opprette kontakt mellom sammensetningen og den biologiske prøven; og b) måle aktivitet av ABC-transportøren eller et fragment derav.

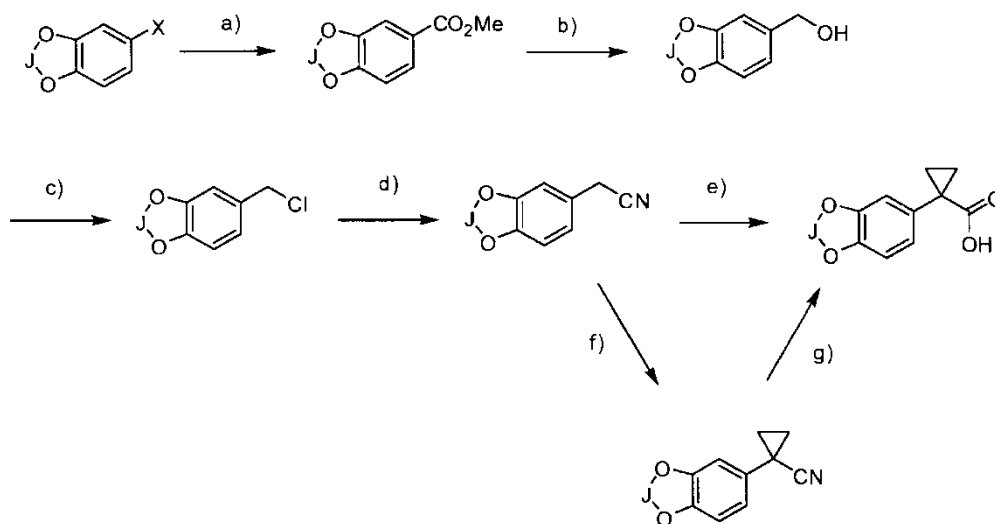
Generelle syntetiske skjemaer

Forbindelser med formelen **I** kan fremstilles med velkjente fremgangsmåter i teknikken. Illustrert nedenfor er eksempler på fremgangsmåter for fremstillingen av forbindelser med formelen **I**. Skjemaer I nedenfor illustrerer et eksempel på syntetisk fremgangsmåte for forbindelser med formelen **I**.

SYNTETISKE SKJEMAER

Eksempler på syntetiske veier for forbindelsene som omfattes av kravene, og eksempeforbindelsene, er illustrert i skjemaene I–IV.

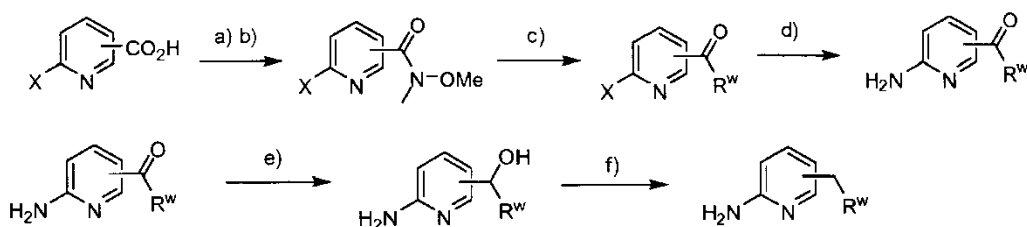
Skjema I. Fremstilling av syklopropylsyrer



5 X=Br or I;

a) $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, CO, MeOH; b) LiAlH_4 ; c) SOCl_2 ; d) NaCN; e) $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{Br}$, NaOH, Δ T; f) $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{Br}$, NaOH; g) NaOH, Δ T.

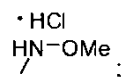
Skjema II: Fremstilling av aminopyridylbyggeklosser



10

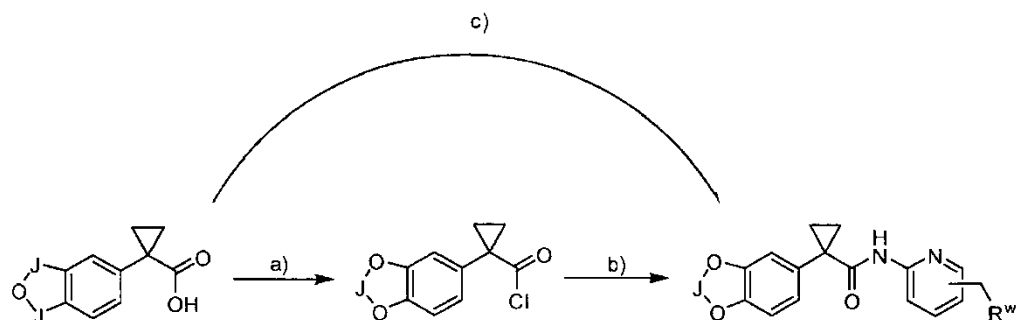
X = Cl, Br eller I;

a) ClCO_2iBu , Et_3N ; b)

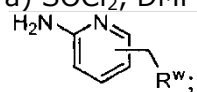


15

c) R^wM (M= Li, MgBr); d) NH_3 , EtOH; e) NaBH_4 , MeOH; f) Et_3SiH , TFA.

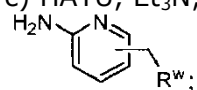
Skjema III. Amidbinding

a) SOCl_2 , DMF; b) Pyridin,

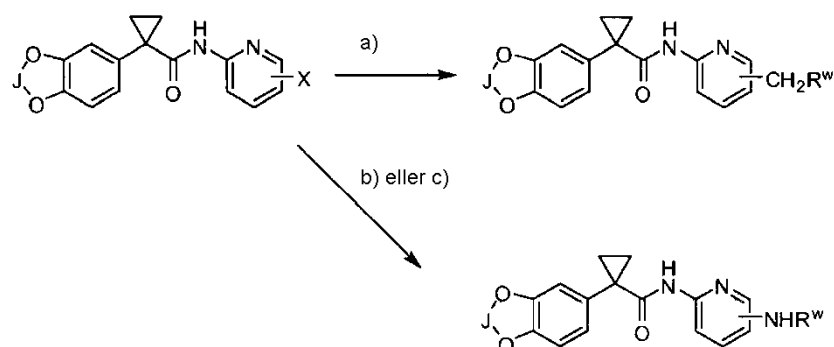


5

c) HATU, Et_3N , DMF,



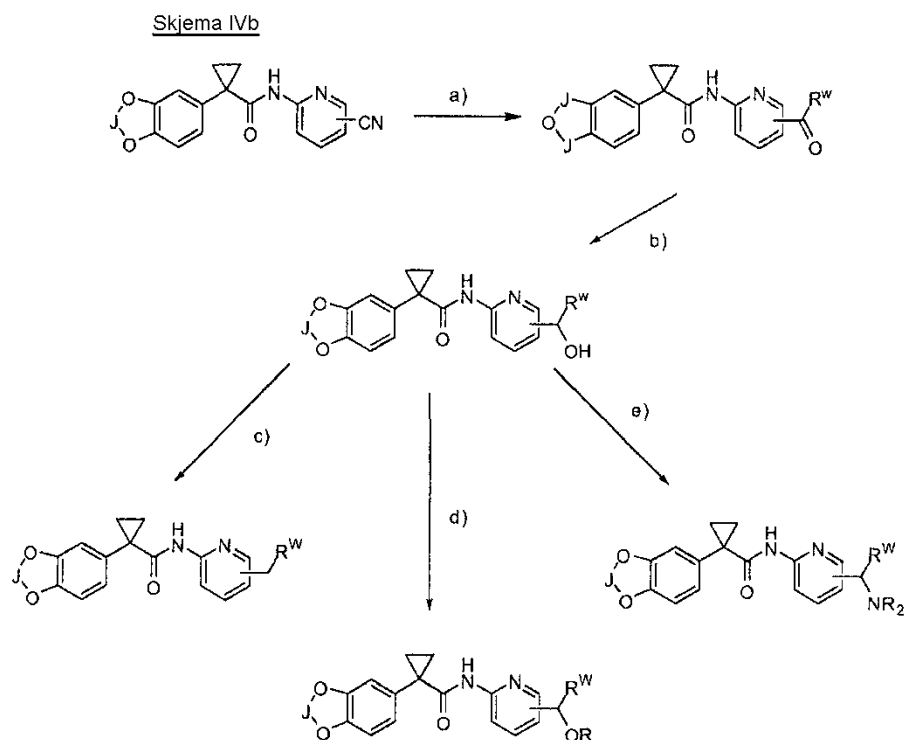
eller alternativt:

Skjema IV. Derivatisering av amiderSkjema IVa

10

$\text{X} = \text{Cl}, \text{Br}$ eller I ;

a) $\text{R}^w\text{CH}_2\text{ZnY}_n$, $(\text{dppf})_2\text{PdCl}_2$, THF ($\text{Y} = \text{Cl}$, $n=2$; $\text{Y} = \text{Br}$, $n=1$); b) R^wNH_2 , $(\text{dppf})_2\text{PdCl}_2$, Xantphos, K^tOBu , dioksan, Et_3N ; c) R^wNH_2 .



a) $R^W\text{MgBr}$; b) NaBH_4 , MeOH; c) Et_3SiH , TFA; d) ROH, p -TsOH, toluen; e) 1) MsCl, DIEA; 2) R_2NH , DIEA.

5

En fagmann vil enkelt forstå at syntetiske veier egnet for ulike substituenten ifølge den foreliggende oppfinnelsen, er slik at reaksjonsforholdene og -trinnene.

Anvendelser, formuleringer og administrering

10

Farmasøytisk akseptable sammensetninger

Som beskrevet ovenfor tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen forbindelsene som er nyttige som modulatorer av ABC-transportører og følgelig nyttige i behandling av sykdommer, lidelser eller tilstander, herunder cystisk fibrose, arvelig emfysem, arvelig hemokromatose, koagulerings-fibrinolyse-mangler slik som protein C-mangel, arvelig angioødem type 1, lipidprosesseringsmangler slik som familiær hyperkolesterolemi, kylomikronemi type 1, α -beta-lipoproteinemi, lysosomale lagringssykdommer slik som I-cellesykdom/pseudo-Hurler, mukopolysakkaridoser, Sandhof/Tay-Sachs, Crigler-Najjar type II, polyendokrinopati/hyperinsulemi, diabetes mellitus, Laron-

15

20

dvergvekst, myeloperoksidasemangel, primær hypoparatyreoidisme, melanom, glykanose CDG type 1, arvelig emfysem, medfødt hypertyreoidisme, osteogenesis imperfecta, arvelig hypofibrinogenemi, ACT-mangel, diabetes insipidus (DI), nevrohypofyseal DI, nefrogen DI, Charcot-Marie-Tooths syndrom, Perlizaeus-Merzbachers sykdom, nevrodegenerative sykdommer slik som Alzheimers sykdom, Parkinsons sykdom, amyotrofisk lateral sklerose, progressiv supranukleær parese, Picks sykdom, flere nevrologiske polyglutaminlidelser slik som Huntingtons, spinocerebular ataksi type I, spinal og bulbær muskelatrofi, dentatorubral-pallidoluysian atrofi og dystrophia myotonica og spongiforme encefalopatier slik som arvelig Creutzfeldt-Jakobs sykdom (på grunn av prionproteinprosesseringsdefekt), Fabrys sykdom, Gerstmann-Sträussler-Scheinkers syndrom, KOLS, keratoconjunctivitis sicca og Sjögrens sykdom.

Følgelig er det i et annet aspekt av den foreliggende oppfinnelsen tilveiebrakt farmasøytisk akseptable sammensetninger, hvori disse sammensetningene omfatter enhver av forbindelsene som beskrevet heri, og eventuelt omfatter en farmasøytisk akseptabel bærer, adjuvant eller vehikkel. I visse utførelsesformer omfatter disse sammensetningene eventuelt videre ett eller flere ytterligere terapeutiske middel.

Det skal også forstås at visse av forbindelsene ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan eksistere i fri form for behandling, eller der det er hensiktsmessig, som et farmasøytisk akseptabelt derivat derav. Ifølge den foreliggende oppfinnelsen inkluderer et farmasøytisk akseptabelt derivat, men er ikke begrenset til farmasøytisk akseptable salter, estere, salter av slike estere eller et hvilket som helst annet addukt eller derivat som ved administrering til en trengende pasient, er i stand til å tilveiebringe, direkte eller indirekte, en forbindelse som ellers beskrevet heri, eller en metabolitt eller rest derav.

Som anvendt heri henviser betegnelsen "farmasøytisk akseptabelt salt" til de saltene som innenfor omfanget av en grundig medisinsk vurdering, er egnet for anvendelse i kontakt med menneske- og dyrevæv, uten overdreven toksisitet, irritasjon, allergisk reaksjon og lignende, og har et akseptabelt fordel/risikoforhold. Et "farmasøytisk akseptabelt salt" betyr et hvilket som helst ikke-toksisk salt av en forbindelse ifølge denne oppfinnelsen, som ved administrering til en mottaker er i stand til å tilveiebringe, enten direkte eller indirekte, en forbindelse

ifølge denne oppfinnelsen eller en hemmende aktiv metabolitt eller rest derav. Som anvendt heri betyr betegnelsen "hemmende aktiv metabolitt eller rest derav" at en metabolitt eller rest derav også er en inhibitor av en ATP-bindingskassett-transportør.

5

Farmasøytisk akseptable salter er velkjente i teknikken. For eksempel beskriver S. M. Berge, et al. farmasøytisk akseptable salter inngående i J. Pharmaceutical Sciences, 1977, 66, 1-19. Farmasøytisk akseptable salter av forbindelsene ifølge denne oppfinnelsen inkluderer de som er avledet fra egnede uorganiske og organiske syrer og baser. Eksempler på farmasøytisk akseptable, ikke-toksiske syretilsetningssalter er salter av en aminogruppe som er dannet med uorganiske syrer slik som saltsyre, bromsyre, fosforsyre, svovelsyre og perklorsyre eller med organiske syrer slik som eddiksyre, oksalsyre, maleinsyre, vinsyre, sitronsyre, ravsyre eller malonsyre eller ved å anvende andre fremgangsmåter som anvendes i teknikken, slik som ionebytte. Andre farmasøytisk akseptable salter inkluderer adipat-, alginat-, askorbat-, aspartat-, benzensulfonat-, benzoat-, bisulfat-, borat-, butyrat-, kamforat-, kamforsulfonat-, sitrat-, syklopentanpropionat-, diglukonat-, dodecylsulfat-, etansulfonat-, format-, fumarat-, glukheptanoat-, glyserofosfat-, glukonat-, hemisulfat-, heptanoat-, heksanoat-, hydrojodid-, 2-hydroksyetansulfonat-, laktobionat-, laktat-, laurat-, laurylsulfat-, malat-, maleat-, malonat-, metansulfonat, 2-naftalensulfonat-, nikotinat-, nitrat-, oleat-, oksalat-, palmitat-, pamoat-, pektinat-, persulfat-, 3-fenylpropionat-, fosfat-, pikrat-, pivalat-, propionat-, stearat-, sukkinat-, sulfat-, tartrat-, tiocyanat-, p-toluensulfonat-, undekanoat-, valeratsalter og lignende. Salter som er avledet fra passende baser inkluderer alkalimetall, jordalkalimetall, ammonium og $N^+(C_{1-4}alkyl)_4$ -salter. Denne oppfinnelsen ser også for seg kvaternisering av hvilke som helst som grupper inneholdende basisk nitrogen, av forbindelsene som beskrives heri. Vann- eller oljeløselige eller dispergerbare produkter kan oppnås ved slik kvaternisering. Representative alkali- eller jordalkalimetallsalter inkluderer natrium, litium, kalium, kalsium, magnesium og lignende. Videre, der det er hensiktsmessig inkluderer farmasøytisk akseptable salter ikke-toksisk ammonium, kvaternær ammonium og aminkationer dannet ved hjelp av motioner slik som halid, hydroksid, karboksylat, sulfat, fosfat, nitrat, lavalkylsulfonat (eng.: loweralkyl sulfonate) og arylsulfonat.

35

Som beskrevet ovenfor omfatter de farmasøytisk akseptable sammensetningene ifølge den foreliggende oppfinnelsen videre en farmasøytisk akseptabelt bærer, adjuvant eller vehikkel, hvilket inkluderer, som anvendt heri, hvilke som helst løsemiddel, tynnere eller andre flytende vehikkel-, dispergerings- eller suspensjonshjelpemiddel, overflateaktive middel, isotone middel, fortyknings- eller emulgeringsmiddel, konserveringsmiddel, faste bindemiddel, smøremiddel og lignende, som egnet til den bestemte ønskede doseringsformen. Remington's Pharmaceutical Sciences, Sixteenth Edition, E. W. Martin (Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1980) beskriver forskjellige bærere anvendt i formuleringen av farmasøytisk akseptable sammensetninger og kjente teknikker for fremstillingen derav. Med mindre en konvensjonell bærer er uforenlig med forbindelsene ifølge oppfinnelsen, slik som ved produksjon av en hvilket som helst uønsket biologisk effekt eller annen skadelig interaksjon med hvilke som helst andre komponenter av den farmasøytisk akseptable sammensetningen, anses dets anvendelse å omfattes av denne oppfinnelsen. Noen eksempler på materialer som kan tjene som farmasøytisk akseptable bærere inkluderer, men er ikke begrenset til ionebyttere, alumina, aluminiumstearat, lecitin, serumproteiner slik som humant serumalbumin, bufferstoffer slik som fosfater, glycin, sorbinsyre eller kaliumsorbat, partielle glyseridblandinger av mettede vegetabiliske fettsyrer, vann, salter eller elektrolytter slik som protaminsulfat, dinatriumhydrogenfosfat, kaliumhydrogenfosfat, natriumklorid, sinksalter, kolloidalt silika, magnesiumtrisilikat, polyvinylpyrrolidon, polyakrylater, voksmiddel, polyetylen-polyoksypropylen-blokkpolymerer, ullfett, sukkere slik som laktose, glukose og sukrose; stivelser slik som maisstivelse og potetstivelse; cellulose og dets derivater slik som natriumkarboksymetylcellulose, etylcellulose og celluloseacetat; pulverisert tragakant; malt; gelatin; talkum; eksipienter slik som kakaosmør og stikkpillevoks; oljer slik som peanøttolje, bomullsolje; saflorolje; sesamolje; olivenolje; maisolje og soyaolje; glykoler slik som propylenglykol eller polyetylenglykol; estere slik som etyloleat og etyllaurat; agar; buffermiddel slik som magnesiumhydroksid og aluminiumhydroksid; alginsyre; pyrogenfritt vann; isotonisk saltløsning; Ringers løsning; etylalkohol og fosfatbufferløsninger og andre ikke-toksiske compatible smøremiddel slik som natriumlaurylsulfat og magnesiumstearat og fargemiddel, frissettingsmiddel, overtrekkingsmiddel, søtningsmiddel, smakstilsetningsmiddel og parfumeringsmiddel, konserveringsmiddel og antioksidanter kan også være til stede i sammensetningen etter den formuleringsansvarliges skjønn.

Anvendelser av forbindelser og farmasøytisk akseptable sammensetninger

5 I enda et annet aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en forbindelse til anvendelse i en fremgangsmåte for behandling av en tilstand, sykdom eller lidelse som er implisert ved ABC-transportøraktivitet. I visse utførelsesformer beskriver den foreliggende søknaden en fremgangsmåte for behandling av en tilstand, sykdom eller lidelse som er implisert ved en mangel på ABC-transportøraktivitet, der fremgangsmåten omfatter administrering av en sammensetning omfattende en forbindelse med formelen (I) til et individ, foretrukket et pattedyr med behov derav.

15 I visse foretrukne utførelsesformer beskriver den foreliggende søknaden en fremgangsmåte for å behandle cystisk fibrose, arvelig emfysem (på grunn av $\alpha 1$ -antitrypsin; ikke-Piz-varianter), arvelig hemokromatose, koagulering-fibrinolyse-mangler slik som protein C-mangel, arvelig angioødem type 1, lipidprosesseringsmangler slik som familiær hyperkolesterolemi, kylomikronemi type 1, α -beta-lipoproteinemi, lysosomale lagringssykdommer slik som I-celle-sykdom/pseudo-Hurler, mukopolysakkaridoser (på grunn av lysosomale prosesseringsenzymer), Sandhof/Tay-Sachs (på grunn av β -heksosaminidase), 20 Crigler-Najjar type II (på grunn av UDP-glukuronyl-sialyl-transferase), polyendokrinopati/hyperinsulemi, diabetes mellitus (på grunn av insulinreseptor), Laron-dvergvekst (på grunn av veksthormonreseptor), myeloperoksidasemangel, primær hypoparatyreoidisme (på grunn av preproparatyroidhormon), melanom (på grunn av tyrosinase). Sykdommene assosiert med den siste klassen av ER-funksjonsfeil er glykanose CDG type 1, arvelig emfysem (på grunn av $\alpha 1$ -antitrypsin (PiZ-variant), medfødt hypertyreoidisme, osteogenesis imperfecta (på grunn av prokollagen type I, II, IV), arvelig hypofibrinogenemi (på grunn av fibrinogen), ACT-mangel (på grunn av $\alpha 1$ -antikymotrypsin), diabetes insipidus (DI), nevrohypofyseal DI (på grunn av vasopressinhormon/V2-reseptor), neprogen DI (på grunn av akvaporin II), 30 Charcot-Marie-Tooths syndrom (på grunn av perifert myelinprotein 22), Pelizaeus-Merzbachers sykdom, nevrodegenerative sykdommer slik som Alzheimers sykdom (på grunn av β APP og preseniliner), Parkinsons sykdom, amyotrofisk lateralsklerose, progressiv supranukleær parese, Picks sykdom, flere nevrologiske polyglutaminlidelser slik som Huntingtons, spinocerebular ataksi

type I, spinal og bulbær muskelatrofi, dentatorubral-pallidoluysian atrofi og dystrophia myotonica og spongiforme encefalopatier slik som arvelig Creutzfeldt-Jakobs sykdom (på grunn av prionproteinprosesseringsdefekt), Fabrys sykdom (på grunn av lysosomal α -galactosidase A), Gerstmann-Sträussler-Scheinkers syndrom, kronisk obstruktiv lungesykdom (KOLS), keratoconjunctivitis sicca og Sjögrens syndrom, omfattende trinnet med å administrere en effektiv mengde av en sammensetning til pattedyret, omfattende en forbindelse med formelen (I) eller en foretrukket utførelsesform derav som angitt ovenfor.

Ifølge en alternativ foretrukket utførelsesform beskriver den foreliggende søknaden en fremgangsmåte for å behandle cystisk fibrose, omfattende trinnet med å administrere til pattedyret en sammensetning omfattende trinnet med å administrere til pattedyret en effektiv mengde av en sammensetning omfattende en forbindelse med formelen (I) eller en foretrukket utførelsesform derav som angitt ovenfor.

Ifølge oppfinnelsen er en "effektiv mengde" av forbindelsen eller den farmasøytisk akseptable sammensetningen i den mengde som er effektiv for å behandle eller redusere alvorlighetsgraden til én eller flere av cystisk fibrose, arvelig emfysem (på grunn av α 1-antitrypsin, ikke-PiZ-varianter), arvelig hemokromatose, koagulerings-fibrinolyse-mangler slik som protein C-mangel, arvelig angioødem type 1, lipidprosesseringsmangler slik som familiær hyperkolesterolemi, kylomikronemi type 1, α -beta-lipoproteinemi, lysosomale lagringssykdommer slik som I-celle-sykdom/pseudo-Hurler, mukopolysakkaridoser (på grunn av lysosomale prosesseringsenzym), Sandhof/Tay-Sachs (på grunn av β -heksosaminidase), Crigler-Najjar type II (på grunn av UDP-glukuronyl-sialyl-transferase), polyendokrinopati/hyperinsulemi, diabetes mellitus (på grunn av insulinreseptor), Laron-dvergvekst (på grunn av veksthormonreseptor), myeloperoksidasemangel, primær hypoparatyreoidisme (på grunn av preproparatyroidhormon), melanom (på grunn av tyrosinase). Sykdommene assosiert med den siste klassen av ER-funksjonsfeil er glykanose CDG type 1, arvelig emfysem (på grunn av α 1-antitrypsin (PiZ-variant), medfødt hypertyreoidisme, osteogenesis imperfecta (på grunn av prokollagen type I, II, IV), arvelig hypofibrinogenemi (på grunn av fibrinogen), ACT-mangel (på grunn av α 1-antikymotrypsin), diabetes insipidus (DI), nevrohypofyseal DI (på grunn av vasopressinhormon/V2-reseptor), nefrogen DI (på grunn av akvaporin II),

Charcot-Marie-Tooths syndrom (på grunn av perifert myelinprotein 22), Pelizaeus-Merzbachers sykdom, nevrodegenerative sykdommer slik som Alzheimers sykdom (på grunn av β APP og preseniliner), Parkinsons sykdom, amyotrofisk lateralsklerose, progressiv supranukleær parese, Picks sykdom, flere

5 nevrologiske polyglutaminlidelser slik som Huntingtons, spinocerebular ataksi type I, spinal og bulbær muskelatrofi, dentatorubral-pallidoluysian atrofi og dystrophia myotonica og spongiforme encefalopatier slik som arvelig Creutzfeldt-Jakobs sykdom (på grunn av prionproteinprosesseringsdefekt), Fabrys sykdom (på grunn av lysosomal α -galactosidase A), Gerstmann Sträussler-Scheinkers

10 syndrom, kronisk obstruktiv lungesykdom (KOLS), keratoconjunctivitis sicca og Sjögrens syndrom.

Forbindelsene og sammensetningene kan administreres ved hjelp av enhver mengde og enhver administreringsvei som er effektiv for behandling eller

15 reduksjon av alvorlighetsgraden til én eller flere av cystisk fibrose, arvelig emfysem (på grunn av α 1-antitrypsin, ikke-Piz-varianter), arvelig hemokromatose, koagulering-fibrinolyse-mangler slik som protein C-mangel, arvelig angioødem type 1, lipidprosesseringsmangler slik som familiær hyperkolesterolemi, kylomikronemi type 1, α -beta-lipoproteinemi, lysosomale lagringssykdommer slik som I-celle-sykdom/pseudo-Hurler, mukopolysakkaridoser (på grunn av lysosomale prosesseringsenzymmer), Sandhof/Tay-Sachs (på grunn av β -heksosaminidase), Crigler-Najjar type II (på grunn av UDP-glukuronyl-sialyl-transferase), polyendokrinopati/hyperinsulemi, diabetes mellitus (på grunn av insulinreseptor), Laron-dvergvekst (på grunn av veksthormonreseptor), myeloperoksidasemangel, primær hypoparatyreoidisme (på grunn av preproparatyroidhormon), melanom (på grunn av tyrosinase). Sykdommene assosiert med den siste klassen av ER-funksjonsfeil er glykanose CDG type 1, arvelig emfysem (på grunn av α 1-antitrypsin (PiZ-variant), medfødt hypertyreoidisme, osteogenesis imperfecta (på grunn av prokollagen type I, II, IV), arvelig hypofibrinogenemi (på grunn av fibrinogen), ACT-mangel (på grunn av α 1-antikymotrypsin), diabetes insipidus (DI), nevrohypofyseal DI (på grunn av vasopressinhormon/V2-reseptor), nefrogen DI (på grunn av akvaporin II), Charcot-Marie-Tooths syndrom (på grunn av perifert myelinprotein 22), Pelizaeus-Merzbachers sykdom, nevrodegenerative sykdommer slik som Alzheimers sykdom (på grunn av β APP og preseniliner), Parkinsons sykdom, amyotrofisk lateralsklerose, progressiv supranukleær parese, Picks sykdom, flere

20

25

30

35

nevrologiske polyglutaminlidelser slik som Huntingtons, spinocerebellar ataksi type I, spinal og bulbær muskelatrofi, dentatorubral-pallidoluysian atrofi og dystrophia myotonica og spongiforme encefalopatier slik som arvelig Creutzfeldt-Jakobs sykdom (på grunn av prionproteinprosesseringsdefekt), Fabrys sykdom (på grunn av lysosomal α -galactosidase A), Sträussler-Scheinkers syndrom, kronisk obstruktiv lungesykdom (KOLS), keratoconjunctivitis sicca og Sjögrens syndrom.

Den nøyaktige påkrevde mengden vil variere fra individ til individ, avhengig av individets art, alder og allmenntilstand, infeksjonens alvorlighetsgrad, det bestemte middelet, dets administreringsmåte og lignende. Forbindelsene ifølge oppfinnelsen formuleres foretrukket i doseringsenhetsformer for å lette doseringsadministrering og -homogenitet. Uttrykket "doseringsenhetsform" betyr som anvendt heri en fysisk diskret enhet med middel som er egnet for pasienten som skal behandles. Det er imidlertid underforstått at den totale daglige anvendelsen av forbindelsene og sammensetningene ifølge den foreliggende oppfinnelsen vil bli bestemt av behandlende lege etter en grundig medisinsk vurdering. Det spesifikke effektive dosenivået for enhver bestemt pasient eller organisme vil avhenge av en rekke faktorer, herunder lidelsen som behandles og lidelsens alvorlighetsgrad, aktiviteten av den spesifikke forbindelsen som benyttes, den spesifikke sammensetningen som benyttes, pasientens alder, kroppsvekt, allmennhelse, kjønn og kosthold, administreringstidspunkt, administreringsvei og ekskresjonsraten til den spesifikke forbindelsen som benyttes, behandlingens varighet, legemiddel anvendt i kombinasjon med eller i tillegg til den spesifikke forbindelsen som benyttes, og lignende faktorer som er godt kjent i teknikken. Betegnelsen "pasient" betyr som anvendt heri et dyr, foretrukket et pattedyr, og mest foretrukket et menneske.

De farmasøytisk akseptable sammensetningene ifølge denne oppfinnelsen kan administreres til mennesker og andre dyr oralt, rektalt, parenteralt, intracisternalt, intravaginalt, intraperitonealt, lokalt (som ved pulvere, salver eller dråper), bukkalt som en oral eller nasal spray eller lignende, avhengig av alvorlighetsgrad til infeksjonen som behandles. I visse utførelsesformer kan forbindelsene ifølge oppfinnelsen administreres oralt eller parenteralt ved doseringsnivåer på cirka 0,01 mg/kg til cirka 50 mg/kg og foretrukket fra cirka

1 mg/kg til cirka 25 mg/kg, av individets kroppsvekt per dag, én eller flere ganger per dag, for å oppnå ønsket terapeutisk effekt.

5 Flytende doseringsformer for oral administrering inkluderer, men er ikke begrenset til farmasøytisk akseptable emulsjoner, mikroemulsjoner, løsninger, suspensjoner, siruper og eliksirer. I tillegg til de aktive forbindelsene kan de flytende doseringsformene inneholde inerte tynnere som er vanlig anvendt i teknikken slik som for eksempel vann eller andre løsemiddel, løsningshjelpemiddel og emulgatorer slik som etylalkohol, isopropylalkohol, 10 etylkarbonat, etylacetat, benzylalkohol, benzylbenzoat, propylenglykol, 1,3-butylenglykol, dimetylformamid, oljer (særlig bomull-, jordnøtt-, mais-, kim-, oliven-, ricinus- og sesamoljer), glyserol, tetrahydrofurfurylalkohol, polyetylen glykoler og fettsyreestere av sorbitan og blandinger derav. Foruten inerte tynnere kan de orale sammensetningene også inkludere adjuvanter slik 15 som fuktemiddel, emulsjons- og suspensjonsmiddel, søtningsmiddel, smakstilsetningsmiddel og parfumeringsmiddel.

Injiserbare fremstillinger, for eksempel sterile injiserbare vandige eller oljeholdige suspensjoner, kan formuleres ifølge den kjente teknikken ved hjelp 20 av egnede dispergerings- eller fuktemiddel og suspensjonsmiddel. Den sterile injiserbare fremstillingen kan også være en steril injiserbar løsning, suspensjon eller emulsjon i en ikke-toksisk parenteralt akseptabelt tynner eller løsemiddel, for eksempel som en løsning i 1,3-butandiol. Blant de akseptable vehiklene og løsemidlene som kan benyttes, er vann, Ringers løsning, U.S.P. og isotonisk 25 natriumkloridløsning. I tillegg benyttes sterile, ikke-flyktige oljer konvensjonelt som løsemiddel eller suspensjonsmedium. En hvilken som helst blandet ikke-flyktig olje kan benyttes til dette formålet, herunder syntetiske mono- eller diglyserider. Fettsyrer slik som oleinsyre anvendes dessuten til fremstilling av injiserbare middel.

30 De injiserbare formuleringene kan steriliseres for eksempel ved filtrering gjennom et bakterieretensjonsfilter, eller ved inkorporering av steriliseringsmiddel i den formen av sterile faste sammensetninger som kan oppløses eller dispergeres i sterilt vann eller et annet sterilt injiserbart medium 35 før anvendelse.

For å forlenge effekten av en forbindelse ifølge den foreliggende oppfinnelsen er det ofte ønskelig å bremse absorpsjonen av forbindelsen fra subkutan eller intramuskulær injeksjon. Dette kan oppnås ved anvendelse av en flytende suspensjon av krystallinsk eller amorft materiale med svak vannløselighet.

5 Forbindelsens absorpsjonshastighet avhenger da av oppløsningshastigheten, som på sin side kan avhenge av krystallstørrelse og krystallinsk form. Forsinket absorpsjon av en parenteralt administrert forbindelsesform oppnås alternativt ved oppløsning eller suspensjon av forbindelsen i en oljevehikkel. Injiserbare depotformer fremstilles ved dannelsen av mikroinnkapslede matriser av
10 forbindelsen i biologisk nedbrytbare polymerer slik som polylaktid-polyglykolid. Avhengig av forholdet mellom forbindelse og polymer og egenskapen til den bestemte polymeren som benyttes, kan forbindelsens frisettingshastighet reguleres. Eksempler på andre biologisk nedbrytbare polymerer inkluderer poly(ortoestere) og poly(anhydrider). Depotinjiserbare formuleringer fremstilles
15 også ved innkapsling av forbindelsen i liposomer eller mikroemulsjoner som er kompatible med kroppsvev.

Sammensetninger for rektal eller vaginal administrering er foretrukket stikkpiller som kan fremstilles ved blanding av forbindelsene ifølge denne oppfinnelsen med
20 egnede ikke-irriterende eksipienter eller bærere slik som kakaosmør, polyetylenglykol eller en stikkpille voks som er fast ved omgivelsestemperatur, men flytende ved kroppstemperatur, og som derfor smelter i rektum eller skjeden og frisetter den aktive forbindelsen.

25 Faste doseringsformer for oral administrering omfatter kapsler, tabletter, piller, pulvere og granulater. I slike faste doseringsformer er den aktive forbindelsen blandet med minst én inert, farmasøytisk akseptabel eksipient eller bærer slik som natriumcitrat eller dikalsiumfosfat og/eller a) fyllstoff eller ekstendere slik som stivelse, laktose, sukrose, glukose, mannitol og kiseltsyre, b) bindemiddel
30 slik som for eksempel karboksymetylcellulose, alginater, gelatin, polyvinylpyrrolidinon, sukrose og akasie, c) fuktighetsbevarere slik som glyserol, d) sprengmiddel slik som agar-agar, kalsiumkarbonat, potet- eller tapiokastivelser, alginsyre, visse silikater og natriumkarbonat, e) løsningsinhiberende middel slik som parafin, f) absorpsjonsakseleratorer slik som
35 kvaternære ammoniumforbindelser, g) fuktemiddel slik som for eksempel cetylalkohol og glyserolmonostearat, h) absorbenter slik som kaolin- og

bentonittleire og i) smøremiddel slik som talkum, kalsiumstearat, magnesiumstearat, faste polyetylenglykoler, natriumlaurylsulfat og blandinger derav. Ved kapsler, tabletter og piller kan doseringsformen også omfatte buffermiddel.

5

Faste sammensetninger av en lignende type kan også anvendes som fyllstoff i myk- og hardfylte gelatinkapsler ved hjelp av slike eksipienter som laktose eller melkesukker samt polyetylenglykoler med høy molekylvekt, og lignende. De faste doseringsformene med tabletter, drasjerte tabletter, kapsler, piller og granulater kan fremstilles med overtrekk og skall slik som enteriske overtrekk og andre overtrekk som er velkjent i den farmasøytiske formuleringsteknikken. De kan eventuelt inneholde opakiseringsmiddel og kan også være av en slik sammensetning at de frisetter de(n) aktive ingrediensen(e) bare, eller foretrukket, i en viss del av fordøyelseskanalen, eventuelt på en forsinket måte. Eksempler på innkapslingssammensetninger som kan anvendes, inkluderer polymere stoffer og voksmiddel. Faste sammensetninger av en lignende type kan også anvendes som fyllstoff i myk- og hardfylte gelatinkapsler ved hjelp av slike eksipienter som laktose eller melkesukker samt polyetylenglykoler med høy molekylvekt og lignende.

10

15

20

De aktive forbindelsene kan også være i mikroinnkapslet form med én eller flere eksipienter som nevnt ovenfor. De faste doseringsformene med tabletter, drasjerte tabletter, kapsler, piller og granulater kan fremstilles med overtrekk og skall slik som enteriske overtrekk, frisettingsregulerende overtrekk og andre overtrekk som er velkjent i den farmasøytiske formuleringsteknikken. I slike faste doseringsformer kan den aktive forbindelsen iblandes med minst én inert tynner, slik som sukrose, laktose eller stivelse. Slike doseringsformer kan også omfatte, hvilket er normal praksis, ytterligere andre stoffer enn inerte tynnere, f.eks. tableetteringssmøremiddel og andre tableetteringshjelpemiddel, slik som en magnesiumstearat og mikrokrySTALLinsk cellulose. Ved kapsler, tabletter og piller kan doseringsformene også omfatte buffermiddel. De kan eventuelt inneholde opakiseringsmiddel og kan også være av en slik sammensetning at de frisetter de aktive ingrediensene bare, eller foretrukket, i en viss del av fordøyelseskanalen, eventuelt på en forsinket måte. Eksempler på innkapslingssammensetninger som kan anvendes, inkluderer polymere stoffer og voksmiddel.

25

30

35

Doseringsformer for lokal eller transdermal administrering av en forbindelse ifølge denne oppfinnelsen inkluderer salver, pastaer, kremer, lotioner, geler, pulvere, løsninger, sprayer, inhaleringsmiddel eller plaster. Den aktive komponenten iblandes under sterile forhold med en farmasøytisk akseptabel bærer og eventuelle nødvendige konserveringsmiddel eller buffere etter behov. Oftalmisk formulering, øredråper og øyedråper omfattes også av denne oppfinnelsen. Den foreliggende oppfinnelsen omfatter dessuten anvendelse av transdermale plaster, som har den ekstra fordel at de tilveiebringer kontrollert tilførsel av en forbindelse til kroppen. Slike doseringsformer fremstilles ved oppløsning eller dispensering av forbindelsen i riktig medium. Absorpsjonsforsterkere kan også anvendes til å øke fluksen av forbindelsen på huden. Hastigheten kan reguleres enten ved å tilveiebringe en hastighetsregulerende membran eller ved å dispergere forbindelsen i en polymermatrise eller -gel.

Som beskrevet generelt ovenfor er forbindelsene ifølge oppfinnelsen nyttige som modulatorer av ABC-transportører. Uten å binde seg til bestemt teori er følgelig forbindelsene og sammensetningene spesielt nyttige for å behandle eller redusere alvorlighetsgraden av en sykdom, tilstand eller lidelse der hyperaktivitet eller inaktivitet av ABC-transportører er implisert i sykdommen, tilstanden eller lidelsen. Når hyperaktivitet eller inaktivitet av en ABC-transportør er implisert i en bestemt sykdom, tilstand eller lidelse, kan sykdommen, tilstanden eller lidelsen også henvises til som en "ABC-transportørmediert sykdom, tilstand eller lidelse". Følgelig, i et annet aspekt beskriver den foreliggende søknaden en fremgangsmåte for å behandle eller redusere alvorlighetsgraden av en sykdom, tilstand eller lidelse, der hyperaktivitet eller inaktivitet av en ABC-transportør er implisert i sykdomstilstanden.

Aktiviteten av en forbindelse som benyttes i denne oppfinnelsen som en modulator av en ABC-transportør, kan analyseres i henhold til fremgangsmåtene som er beskrevet generelt i teknikken og eksemplene heri.

Det skal også være underforstått at forbindelsene og de farmasøytisk akseptable sammensetningene ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan benyttes til kombinasjonsterapier, det vil si at forbindelsene og de farmasøytisk akseptable

sammensetningene kan administreres samtidig med, før eller etter én eller flere andre ønskede terapier eller medisinske prosedyrer. Den bestemte kombinasjonen av terapier (behandlinger eller prosedyrer) som skal benyttes i et kombinasjonsregime, vil ta hensyn til de ønskede terapiene og/eller prosedyrenes kompatibilitet og den ønskede terapeutiske effekten som skal oppnås. Det er også underforstått at de benyttede terapiene kan oppnå en ønsket effekt for samme lidelse (for eksempel kan en forbindelse ifølge oppfinnelsen administreres samtidig med et annet middel som anvendes til å behandle samme lidelse), eller de kan oppnå forskjellige effekter (f.eks. kontroll av enhver negativ effekt). Som anvendt heri er ytterligere terapeutiske middel som normalt administreres for å behandle eller forebygge en bestemt sykdom eller tilstand, kjent som "egnet for sykdommen eller tilstanden som behandles".

I en utførelsesform er det ytterligere middelet valgt fra et slimløsende middel, en bronkodilatator, et antibiotikum, et antiinfeksiøst middel, et antiinflammatorisk middel, en annen CFTR-modulator enn en forbindelse ifølge den foreliggende oppfinnelsen, eller et næringsmiddel.

I en annen utførelsesform er det ytterligere middelet en forbindelse valgt fra gentamicin, kurkumin, syklofosamid, 4-fenylbutyrat, miglustat, felodipin, nimodipin, Philoxin B, geniestein, apigenin, cAMP/cGMP-modulatorer slik som rolipram, sildenafil, milrinon, tadalafil, amrinon, isoproterenol, albuterol og almeterol, deoxyspergualin, HSP 90-inhibitorer, HSP 70-inhibitorer, proteosominhibitorer slik som epoksomicin, lactacystin etc.

I en annen utførelsesform er det ytterligere middelet en forbindelse som beskrives i WO 2004028480, WO 2004110352, WO 2005094374, WO 2005120497 eller WO 2006101740.

I en annen utførelsesform er det ytterligere middelet et benzo(c)quinoliziniumderivat som fremviser CFTR-modulasjonsaktivitet, eller et benzopyranderivat som fremviser CFTR-modulasjonsaktivitet.

I en annen utførelsesform er det ytterligere middelet en forbindelse som beskrives i US7202262, US6992096, US20060148864, US20060148863, US20060035943, US20050164973, WO2006110483, WO2006044456,

WO2006044682, WO2006044505, WO2006044503, WO2006044502 eller WO2004091502.

5 I en annen utførelsesform er det ytterligere middelet en forbindelse som beskrives i WO2004080972, WO2004111014, WO2005035514, WO2005049018, WO2006002421, WO2006099256, WO2006127588 eller WO2007044560.

10 I en annen utførelsesform blir et ytterligere middel som er valgt fra forbindelser, beskrevet i US-patentsøknad med serienr. 11/165,818, publisert som U.S. Published Patent Application No. 2006/0074075, inngitt 24. juni 2005. I en annen utførelsesform er det ytterligere middelet N-(5-hydroksy-2,4-ditert-butyl-fenyl)-4-okso-1H-kinolin-3-karboksamid. Disse kombinasjonene anvendes for behandling av sykdommene som beskrives heri, inkludert cystisk fibrose. Disse kombinasjonene anvendes også i kitene beskrevet heri.

15 Mengden av ytterligere terapeutisk middel til stede i sammensetningene ifølge denne oppfinnelsen vil ikke være mer enn mengden som normalt ville blitt administrert i en sammensetning omfattende det terapeutiske middelet som det eneste aktive middelet. Foretrukket vil mengden av ytterligere terapeutisk middel i de foreliggende sammensetningene som beskrives, være i området fra 20 cirka 50 % til 100 % av mengden som normalt er til stede i en sammensetning omfattende det aktuelle middelet som det eneste terapeutiske aktive middelet.

25 Forbindelsene ifølge denne oppfinnelsen eller farmasøytisk akseptable sammensetninger derav kan også inkorporeres i sammensetninger for overtrekking av en implanterbar medisinsk innretning, slik som proteser, kunstige klaffer, vaskulære transplantater, stenter og katetere. Den foreliggende oppfinnelsen inkluderer således i et annet aspekt en sammensetning for overtrekking av en implanterbar innretning omfattende en forbindelse ifølge den 30 foreliggende oppfinnelsen som generelt beskrevet ovenfor, og i klasser og underklasser heri, og en bærer som er egnet til overtrekking av den implanterbare innretningen. I enda et annet aspekt inkluderer den foreliggende oppfinnelsen en implanterbar innretning overtrukket med en sammensetning omfattende en forbindelse ifølge den foreliggende oppfinnelsen som generelt 35 beskrevet ovenfor, og i klasser og underklasser heri, og en bærer som er egnet til overtrekking av den implanterbare innretningen. Egnede overtrekk og den

generelle fremstillingen av overtrukne implanterbare innretninger er beskrevet i US-patent 6,099,562, 5,886,026 og 5,304,121. Overtrekkene er typisk biokompatible polymere materialer slik som en hydrogelpolymer, polymetyldisiloksan, polykaprolakton, polyetylglykol, polylaktinsyre, etylenvinylacetat og blandinger derav. Overtrekkene kan eventuelt dekkes ytterligere med et egnet toppovertrekk av fluorsilikon, polysakkarider, polyetylglykol, fosfolipider eller kombinasjoner derav for å gi sammensetningen kjennetegnene på kontrollert frisetting.

Et annet aspekt ved oppfinnelsen vedrører *in vitro* modulering av ABC-transportøraktivitet i en biologisk prøve eller hos en pasient (f.eks. *in vitro* eller *in vivo*), idet fremgangsmåten omfatter administrering til pasienten, eller opprettelse av kontakt mellom den biologiske prøven og en forbindelse med formelen I eller en sammensetning omfattende forbindelsen. Betegnelsen "biologisk prøve" som anvendt heri inkluderer, uten begrensning, cellekulturer eller ekstrakter derav; materialer oppnådd ved biopsi fra et pattedyr eller ekstrakter derav; og blod, saliva, urin, avføring, sædvæske, tårer eller andre kroppsvæsker eller ekstrakter derav.

Modulasjon av ABC-transportøraktivitet i en biologisk prøve *in vitro* er nyttig til forskjellige formål som er kjent for fagmannen. Eksempler på slike formål inkluderer, men er ikke begrenset til studien av ABC-transportører i biologiske og patologiske fenomener og den komparative evalueringen av nye modulatorer av ABC-transportører.

I enda en annen utførelsesform er det tilveiebrakt en fremgangsmåte *in vitro* for å modulere aktiviteten av en anionkanal *in vitro* eller *in vivo*, omfattende trinnet med å opprette kontakt mellom kanalen og en forbindelse med formelen (I). I foretrukne utførelsesformer er anionkanalen en kloridkanal eller en bikarbonatkanal. I andre foretrukne utførelsesformer er anionkanalen en kloridkanal.

Ifølge en alternativ utførelsesform tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en *in vitro* fremgangsmåte for å øke antallet funksjonelle ABC-transportører i en cellemembran, omfattende trinnet med å opprette kontakt mellom cellen og en forbindelse med formelen (I). Betegnelsen "funksjonell ABC-transportør" som

anvendt heri betyr en ABC-transportør som er i stand til transportaktivitet. I foretrukne utførelsesformer er den funksjonelle ABC-transportøren CFTR.

5 Ifølge en annen foretrukket utførelsesform måles aktiviteten av ABC-transportøren ved måling av det transmembrane spenningspotensialet. Middelet til måling av spenningspotensialet over en membran i den biologiske prøven kan benytte hvilke som helst kjente fremgangsmåter i teknikken, slik som optisk membranpotensialassay eller andre elektrofysiologiske fremgangsmåter.

10 Det optiske membranpotensialassayet benytter spenningssensitive FRET-sensorer beskrevet av Gonzalez og Tsien (se Gonzalez, J. E. and R. Y. Tsien (1995) "Voltage sensing by fluorescence resonance energy transfer in single cells" Biophys J 69(4): 1272–80 og Gonzalez, J. E. and R. Y. Tsien (1997), "Improved indicators of cell membrane potential that use fluorescence resonance
15 energy transfer" Chem Biol 4(4): 269–77) i kombinasjon med instrumentering for måling av fluorescendringer slik som spennings-/ioneprobeleseren (VIPR) (se Gonzalez, J. E., K. Oades, et al. (1999) "Cell-based assays and instrumentation for screening ion-channel targets" Drug Discov Today 4(9): 431–439).

20 Disse spenningssensitive assayene er basert på endringen i fluorescensresonant energioverføring (Fluorescence Resonant Energy Transfer, FRET) mellom det membranløselige, spenningssensitive fargemiddelet, DiSBAC₂(3), og et fluorescerende fosfolipid, CC2-DMPE, som er festet til det ytre bladet av
25 plasmamembranen og fungerer som FRET-donor. Endringer i membranpotensial (V_m) forårsaker at den negativt ladde DiSBAC₂(3) redistribueres over plasmamembranen, og mengden av energioverføring fra CC2-DMPE endres deretter. Endringene i fluorescensemisjon kan overvåkes ved hjelp av VIPR™ II, som er en integrert væskehåndteringsanordning og fluorescensdetektor
30 konstruert til å gjennomføre cellebaserte screeninger i 96- eller 384-brønners mikrotiterplater.

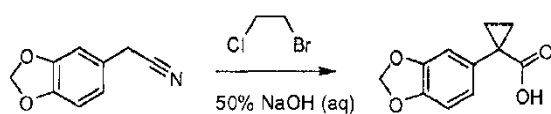
I et annet aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen et kit til
35 anvendelse i målingen av ABC-transportøraktivitet eller et fragment derav i en biologisk prøve, *in vitro* eller *in vivo* omfattende (i) en sammensetning omfattende en forbindelse med formelen (I) eller en hvilken som helst av

utførelsesformene ovenfor; og (ii) instruksjoner for å a) opprette kontakt mellom sammensetningen og den biologiske prøven og b) måle ABC-transportøraktiviteten eller et fragment derav. I en utførelsesform omfatter kitet videre instruksjoner for å a) opprette kontakt mellom en ytterligere sammensetning og den biologiske prøven; b) måle ABC-transportøraktiviteten eller et fragment derav i nærvær av den ytterligere forbindelsen og c) sammenligne ABC-transportøraktiviteten i nærvær av den ytterligere forbindelsen med ABC-transportørdensiteten i nærvær av en sammensetning med formelen (I). I foretrukne utførelsesformer anvendes kitet til å måle densiteten av CFTR.

For at oppfinnelsen beskrevet heri skal forstås fullt ut, gis følgende eksempler. Det bør være underforstått at disse eksemplene bare belyser oppfinnelsen og ikke begrenser den på noen som helst måte. Eksempler på syntetiske veier for forbindelsene som omfattes av kravene, og eksempelforbindelser, vises nedenfor.

EKSEMPLER

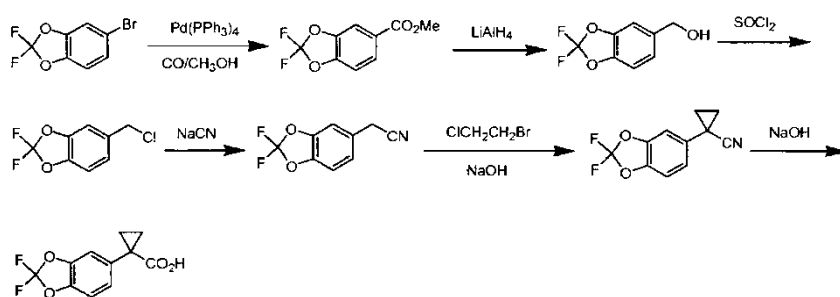
Fremstilling av 1-benzo[1,3]dioksol-5-yl-syklopropankarboksylsyre



En blanding av 2-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)acetonitril (5,10 g 31,7 mmol), 1-brom-2-klor-etan (9,00 ml 109 mmol) og benzyltrietylammoniumklorid (0,181 g, 0,795 mmol) ble varmet opp ved 70 °C, og deretter ble 50 % (vekt/vekt) vandig natriumhydroksid (26 ml) sakte tilsatt i blandingen. Reaksjonen ble omrørt ved 70 °C i 24 timer og deretter varmet opp ved 130 °C i 48 timer. Den mørkebrune reaksjonsblanding ble fortynnet med vann (400 ml) og ekstrahert én gang med et likt volum av etylacetat og én gang med et likt volum av diklormetan. Den basiske vandige løsningen ble surgjort med konsentrert saltsyre med pH

mindre enn én, og utfellingen filtrert og vasket med 1 M saltsyre. Faststoffmaterialet ble oppløst i diklormetan (400 ml) og ekstrahert to ganger med like volumer av 1 M saltsyre og én gang med en mettet vandig løsning av natriumklorid. Den organiske løsningen ble tørket over natriumsulfat og avdampet til tørr tilstand for å gi et hvitt til svakt offwhite faststoff (5,23 g, 80 %) ESI-MS m/z beregn. 206,1, fant 207,1 ($M+1$)⁺. Retensjonstid 2,37 minutter. ¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 1,07-1,11 (m, 2H), 1,38-1,42 (m, 2H), 5,98 (s, 2H), 6,79 (m, 2H), 6,88 (m, 1H), 12,26 (s, 1H).

10 Fremstilling av 1-(2,2-difluor-benzo[1,3]dioksol-5-yl)-syklopropankarboksylsyre



Trinn a: 2,2-difluor-benzo[1,3]dioksol-5-karboksylsyremetyylester

En løsning av 5-brom-2,2-difluor-benzo[1,3]dioksol (11,8 g, 50,0 mmol) og tetrakis(trifenylfosfin)palladium (0) [$Pd(PPh_3)_4$, 5,78 g, 5,00 mmol] i metanol (20 ml) inneholdende acetonitril (30 ml) og trietylamin (10 ml), ble omrørt under en karbonmonoksidatmosfære (55 PSI) ved 75 °C (oljebadtemperatur) i 15 timer. Den avkjølte reaksjonsblandingen ble filtrert og filtratet avdampet til tørr tilstand. Resten ble renset ved kolonnekromatografi på silikagel for å gi ubearbeidet 2,2-difluor-benzo [1,3] dioksol-5-karboksylsyremetyylester (11,5 g), som ble anvendt direkte i det neste trinnet.

Trinn b: (2,2-difluor-benzo[1,3]dioksol-5-yl)-metanol

Ubearbeidet 2,2-difluor-benzo[1,3]dioksol-5-karboksylsyremetyylester (11,5 g) oppløst i 20 ml vannfritt tetrahydrofuran (THF) ble sakte tilsatt i en suspensjon av litiumaluminiumhydrid (4,10 g, 106 mmol) i vannfritt THF (100 ml) ved 0 °C.

Blandingen ble så varmet opp til romtemperatur. Etter omrøring ved romtemperatur i 1 time ble reaksjonsblandingen avkjølt til 0 °C og behandlet med vann (4,1 g), etterfulgt av natriumhydroksid (10 % vandig løsning, 4,1 ml). Den resulterende slurryen ble filtrert og vasket med THF. Det kombinerte filtratet ble avdampet til tørr tilstand, og resten ble rensset ved kolonnekromatografi på silikagel for å gi (2,2-difluor-benzo[1,3]dioksol-5-yl)-metanol (7,2 g, 38 mmol, 76 % over to trinn) som en fargeløs olje.

Trinn c: 5-klormetyl-2,2-difluor-benzo[1,3]dioksol

Tionylklorid (45 g, 38 mmol) ble sakte tilsatt i en løsning av (2,2-difluor-benzo[1,3]dioksol-5-yl)-metanol (7,2 g, 38 mmol) i diklormetan (200 ml) ved 0 °C. Den resulterende blandingen ble omrørt over natten ved romtemperatur og deretter avdampet til tørr tilstand. Resten ble fordelt mellom en vandig løsning av mettet natriumbikarbonat (100 ml) og diklormetan (100 ml). Det separerte vandige sjiktet ble ekstrahert med diklormetan (150 ml), og det organiske sjiktet ble tørket over natriumsulfat, filtrert og avdampet til tørr tilstand for å gi ubearbeidet 5-klormetyl-2,2-difluor-benzo[1,3]dioksol (4,4 g), som ble anvendt direkte i det neste trinnet.

Trinn d: (2,2-difluor-benzo[1,3]dioksol-5-yl)-acetonitril

En blanding av ubearbeidet 5-klormetyl-2,2-difluor-benzo[1,3]dioksol (4,4 g) og natriumcyanid (1,36 g, 27,8 mmol) i dimetylsulfoksid (50 ml) ble omrørt ved romtemperatur over natten. Reaksjonsblandingen ble helt i is og ekstrahert med etylacetat (300 ml). Det organiske sjiktet ble tørket over natriumsulfat og avdampet til tørr tilstand for å gi ubearbeidet (2,2-difluor-benzo[1,3]dioksol-5-yl)-acetonitril (3,3 g), som ble anvendt direkte i det neste trinnet.

Trinn e: 1-(2,2-difluor-benzo[1,3]dioksol-5-yl)-syklopropankarbonitril

Natriumhydroksid (50 % vandig løsning, 10 ml) ble sakte tilsatt i en blanding av ubearbeidet (2,2-difluor-benzo[1,3]dioksol-5-yl)-acetonitril, benzyltrietylammoniumklorid (3,00 g, 15,3 mmol) og 1-brom-2-kloretan (4,9 g, 38 mmol) ved 70 °C. Blandingen ble omrørt over natten ved 70 °C før reaksjonsblandingen ble fortynnet med vann (30 ml) og ekstrahert med

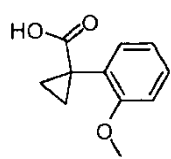
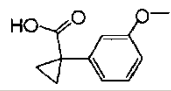
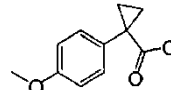
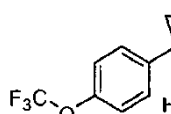
etylacetat. De kombinerte organiske sjiktene ble tørket over natriumsulfat og avdampet til tørr tilstand for å gi ubearbeidet 1-(2,2-difluor-benzo[1,3]dioksol-5-yl)-syklopropankarbonitril, som ble anvendt direkte i det neste trinnet.

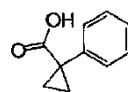
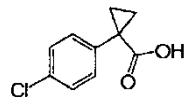
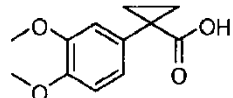
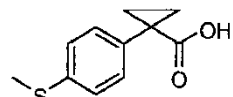
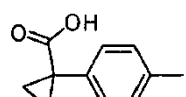
Trinn f: 1-(2,2-difluor-benzo[1,3]dioksol-5-yl)-syklopropankarboksylsyre

1-(2,2-difluor-benzo[1,3]dioksol-5-yl)-syklopropankarbonitril (ubearbeidet fra det siste trinnet) ble refluxet i 10 % vandig natriumhydroksid (50 ml) i 2,5 timer. Den avkjølte reaksjonsblandingen ble vasket med eter (100 ml), og den vandige fasen ble surgjort til pH 2 med 2M saltsyre. Det utfelte faststoffet ble filtrert til å gi 1-(2,2-difluor-benzo[1,3]dioksol-5-yl)-syklopropankarboksylsyre som et hvitt faststoff (0,15 g, 1,6 % i fire trinn). ESI-MS m/z beregn. 242,04, fant 241,58 ($M+1$)⁺; ¹H NMR (CDCl₃) δ 7,14–7,04 (m, 2H), 6,98–6,96 (m, 1H), 1,74–1,64 (m, 2H), 1,26–1,08 (m, 2H).

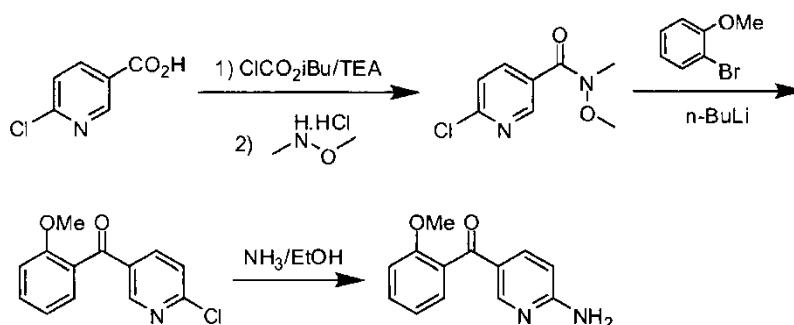
Følgende tabell 2 inneholder en liste over karboksylsyrebyggeklosser som var kommersielt tilgjengelige, eller fremstilt med fremgangsmåtene beskrevet ovenfor.

Tabell 2: Karboksylsyrebyggeklosser.

Navn	Struktur
1-(2-metoksyfenyl)syklopropan-1-karboksylsyre	
1-(3-metoksyfenyl)syklopropan-1-karboksylsyre	
1-(4-metoksyfenyl)syklopropan-1-karboksylsyre	
1-[4-(trifluormetoksy)fenyl]syklopropan-1-karboksylsyre	

Navn	Struktur
1-fenylsyklopropan-1-karboksylysyre	
1-(4-klorfenyl)syklopropan-1-karboksylysyre	
1-(3,4-dimetoksyfenyl)syklopropankarboksylysyre	
1-(4-(metyltio)fenyl)syklopropankarboksylysyre	
1-p-tolylsyklopropankarboksylysyre	

Fremstilling av (6-aminopyridin-3-yl)(2-metoksyfenyl)metanon



5

Trinn a: 6-klor-N-metoksy-N-metyl-nikotinamid

10

En løsning av 6-klor-nikotinsyre (94,5 g, 0,6 mol) i diklormetan (1000 ml) ble tilsatt N-metylmorfolin (181,8 g, 1,8 mol), etterfulgt av iso-butykloroformat (81,9 g, 0,6 mol) ved -25 °C under N₂-atmosfære. Blandingen ble omrørt i 15 minutter, og deretter ble O,N-dimetylhydroksylaminhydroklorid (64,35 g,

0,66 mol) tilsatt. Blandingen ble omrørt i 30 minutter ved -25 °C og sakte varmet opp til romtemperatur. Blandingen ble omrørt i ytterligere en time ved romtemperatur, og en mettet løsning av NaHCO₃ (800 ml) ble tilsatt. Det separerte vandige sjiktet ble ekstrahert med diklormetan (500 ml x 3). De kombinerte organiske sjiktene ble vasket med vann og saltlake. Løsemiddelet ble avdampet til å gi det ubearbeidede produktet, som ble renset ved kolonnekromatografi for å gi det rene produktet 6-klor-N-metoksy-N-metyl-nikotinamid som et hvitt faststoff (56 g, 46,6 %).

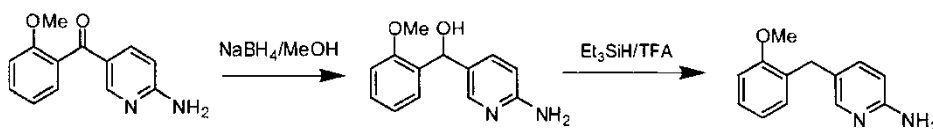
Trinn b: (6-kloropyridin-3-yl)-(2-metoksyfenyl)-metanon

En løsning av 1-brom-2-metoksy-benzen (49,2 g, 0,263 mol) i tørr THF (500 ml) ble dråpevis tilsatt n-BuLi (2,5 M i heksan, 105 ml, 0,263 mol) ved -78 °C under N₂-atmosfære. Blandingen ble omrørt ved denne temperaturen i 1 time, og deretter ble en løsning av 6-klor-N-metoksy-N-metyl-nikotinamid (50 g, 0,25 mol) i THF (100 ml) tilsatt dråpevis. Reaksjonsblandingen ble varmet opp til romtemperatur, omrørt over natten, og ble så bråkjølt med en mettet løsning av NH₄Cl (300 ml). Det separerte vandige sjiktet ble ekstrahert med etylacetat (3 x 300 ml). De kombinerte organiske sjiktene ble vasket med saltlake, tørket over Na₂SO₄, avdampet *in vacuo* for å gi det ubearbeidede produktet som ble renset ved kolonnekromatografi, for å gi (6-klorpyridin-3-yl)-(2-metoksyfenyl)-metanon som et hvitt faststoff (31 g, 47,6 %).

Trinn c: (6-amino-pyridin-3-yl)-(2-metoksyfenyl)-metanon

En løsning av 6-klor-pyridin-3-yl)-(2-metoksy-fenyl)-metanon (30 g, 0,121 mol) i etanol (150 ml) og vannfri ammoniakk (100 ml) ble plassert i en bombe (eng.: bomb) og varmet opp ved 145 °C i 16 timer. Løsemidlene ble fjernet *in vacuo*, og resten ble renset ved kolonnekromatografi for å gi (6-amino-pyridin-3-yl)-(2-metoksyfenyl)-metanon (18 g, 65,2 %). ¹H NMR (DMSO-d₆): δ: 8,12 (s, 1 H), 7,68 (d, *J* = 8,8 Hz, 1 H), 7,47 (t, *J* = 7,2, 1 H), 7,21 (d, *J* = 7,2, 1 H), 7,13 (d, *J* = 7,2, 1 H), 7,03 (d, 1 H), 6,96 (br, 2 H), 6,44 (d, *J* = 8,8, 1 H), 3,69 (s, 3 H). MS (ESI) *m/e* (M+H⁺) 229,27.

Fremstilling av 5-(2-metoksybenzyl)pyridin-2-amin



Trinn a: (6-aminopyridin-3-yl)-(2-metoksyfenyl)-metanol

5 En løsning av (6-amino-pyridin-3-yl)-(2-metoksy-fenyl)-metanon (14 g, 61,4 mol) i CH₃OH (150 ml) ble porsjonsvis tilsatt NaBH₄ (3,48 g, 92,1 mmol) ved 0 °C. Etter at tilsetningen var fullført, ble reaksjonen varmet opp til romtemperatur og omrørt ved romtemperatur i 1 time. Løsemiddelet ble fjernet *in vacuo*, og resten ble tilsatt vann (100 ml). Blandingen ble ekstrahert med

10 diklormetan (100 ml x 3). De kombinerte organiske sjiktene ble vasket med mettet løsning av NaHCO₃ og saltlake, tørket over Na₂SO₄, filtrert og konsentrert *in vacuo* for å gi et ubearbeidet produkt som ble anvendt direkte i det neste trinnet uten ytterligere rensing.

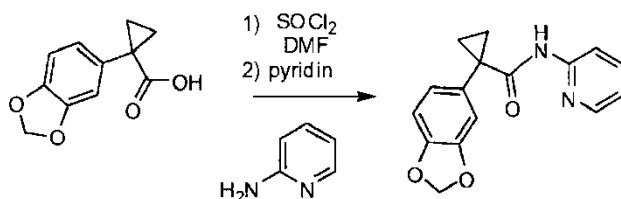
Trinn b: 5-(2-metoksy-benzyl)-pyridin-2-ylamin

En blanding av den ubearbeidede forbindelsen fra forrige trinn, Et₃SiH (57 g, 491 mmol) og TFA (112 g, 982 mmol) i CH₂Cl₂ (150 ml) ble omrørt ved romtemperatur over natten. Overskytende Et₃SiH, TFA og CH₂Cl₂ ble fjernet

20 under redusert trykk. Resten ble omrørt i vann; faststoffutfellingen ble filtrert, vasket med dietyleter og petroleter for å gi 5-(2-metoksy-benzyl)-pyridin-2-ylamin som TFA-salt. (5 g, 24,8 % i 2 trinn). ¹H NMR (DMSO-d₆): δ 13,5 (br, 1 H), 7,93 (brs, 2 H), 7,75–7,73 (m, 2 H), 7,22 (t, *J* = 8,0 Hz, 1 H), 7,19 (d, *J* = 7,2 Hz, 1 H), 6,98 (d, *J* = 8,0 Hz, 1 H), 6,90–6,86 (m, 2 H), 3,77 (s, 2 H), 3,76

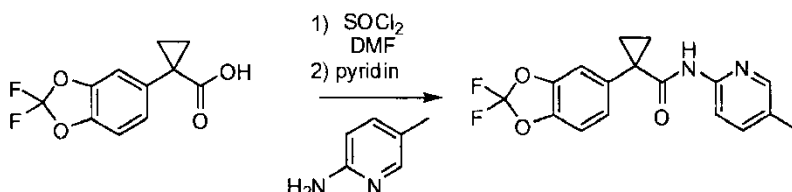
25 (s, 3 H). MS (ESI) *m/e* (M+H⁺) 215,27.

Fremstilling av 1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid



1-benzo[1,3]dioksol-5-yl-syklopropankarboksylysyre (41 mg, 0,20 mmol) ble plassert i en ovnstørket kolbe under nitrogen. Tionylklorid (0,3 ml) og *N,N*-dimetylformamid (0,03 ml) ble tilsatt, og løsningen ble omrørt i 10 minutter ved romtemperatur. Overskytende tionylklorid ble fjernet under vakuum, og det resulterende faststoffet ble suspendert i vannfritt pyridin (1 ml). Denne løsningen ble sakte tilsatt i en løsning av pyridin-2-amin (19 mg, 0,20 mmol) i vannfritt pyridin (1 ml). Den resulterende blandingen ble omrørt i 15 timer ved 110 °C. Det ubearbeidede produktet ble så filtrert, avdampet til tørr tilstand, oppløst i *N,N*-dimetylformamid (1 ml) og renses ved preparativ væskechromatografi med omvendt fase, med en gradient på 0–99 % acetonitril i vann inneholdende 0,05 % trifluoreddiksyre, for å gi det rene produktet (5,9 mg, 0,021 mmol, 10 %). ESI-MS *m/z* beregn. 282,1, fant 283,1 (*M*+1)⁺. Retensjonstid 2,13 minutter.

Fremstilling av 1-(2,2-difluorbenzo[*d*][1,3]dioksol-5-yl)-*N*-(5-metylpyridin-2-yl)syklopropankarboksamid



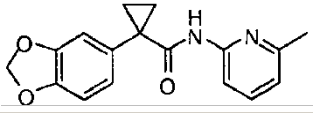
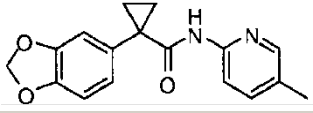
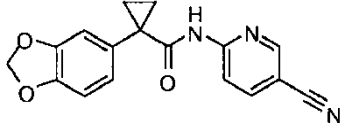
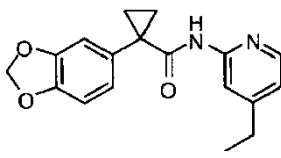
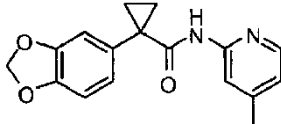
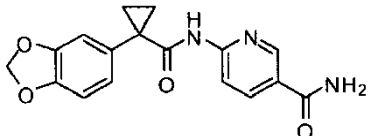
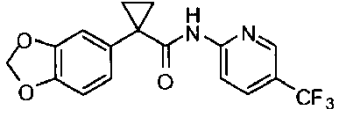
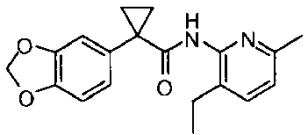
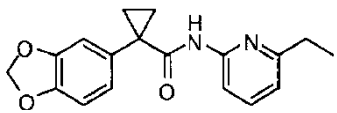
1-(2,2-difluorbenzo[*d*][1,3]dioksol-5-yl)syklopropankarboksylysyre (2,32 g, 9,58 mmol) ble plassert i en ovnstørket kolbe under nitrogen. Tionylklorid (3 ml) og *N,N*-dimetylformamid (0,3 ml) ble tilsatt, og løsningen ble omrørt i 30 minutter ved romtemperatur. Overskytende tionylklorid ble fjernet under vakuum, og det resulterende faststoffet ble suspendert i vannfritt diklormetan (10 ml). Denne løsningen ble så sakte tilsatt i en løsning av 5-metylpyridin-2-amin (0,798 g, 7,38 mmol) i vannfritt diklormetan (10 ml) inneholdende trietylamin (4,11 ml, 29,5 mmol). Den resulterende blandingen ble omrørt i 15 timer ved romtemperatur. Det ubearbeidede produktet ble så vasket to ganger med en 1M vandig løsning av saltsyre, to ganger med en mettet vandig løsning av natriumbikarbonat, og endelig to ganger med en mettet vandig løsning av natriumklorid. Det organiske sjiktet ble tørket over natriumsulfat, avdampet til

nær tørr tilstand og deretter renses på 120 g silikagel med en gradient på 0–30 % etylacetat i heksaner, for å gi det rene produktet (1,20 g, 3,60 mmol, 48,7 %). ESI-MS m/z beregn. 332,1, fant 333,1 ($M+1$)⁺. Retensjonstid 1,48 minutter.

5

Forbindelsene som er oppført i tabell 3 nedenfor, ble fremstilt på en måte som er analog med den som beskrives ovenfor fra de egnede reaktantene:

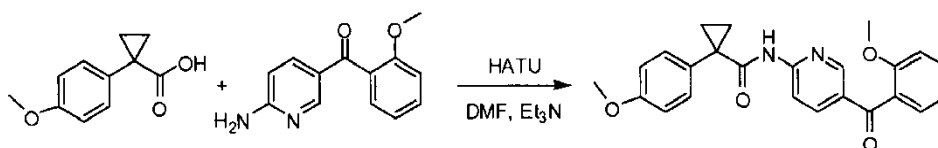
Tabell 3.

Navn	Struktur
1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(6-metylpyridin-2-yl)syklopropankarboksamid	
1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(5-metylpyridin-2-yl)syklopropankarboksamid	
1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(5-cyanopyridin-2-yl)syklopropankarboksamid	
1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(4-etylpyridin-2-yl)syklopropankarboksamid	
1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(4-metylpyridin-2-yl)syklopropankarboksamid	
6-(1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)syklopropankarboksamido)nikotinamid	
1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(5-(trifluormetyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid	
1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(3-etyl-6-metylpyridin-2-yl)syklopropankarboksamid	
1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(6-etylpyridin-2-yl)syklopropankarboksamid	

Navn	Struktur
1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(5-fluorpyridin-2-yl)syklopropankarboksamid	
N-(5-(2-metoksybenzyl)pyridin-2-yl)-1-(2-metoksyfenyl)syklopropankarboksamid	
N-(5-(3-metoksybenzyl)pyridin-2-yl)-1-(2-metoksyfenyl)syklopropankarboksamid	
N-(3-(benzyloksy)pyridin-2-yl)-1-fenylsyklopropankarboksamid	
1-(4-metoksyfenyl)-N-(5-metylpyridin-2-yl)syklopropankarboksamid	
N-(6-etylpyridin-2-yl)-1-fenylsyklopropankarboksamid	
1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(3-(benzyloksy)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid	
N-(4-etylpyridin-2-yl)-1-(4-metoksyfenyl)syklopropankarboksamid	

Navn	Struktur
1-(4-metoksyfenyl)-N-(6-metylpyridin-2-yl)syklopropankarboksamid	
N-(6-etylpyridin-2-yl)-1-(4-metoksyfenyl)syklopropankarboksamid	
1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(3-etyl-6-metylpyridin-2-yl)syklopropankarboksamid	
1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(5-fluorpyridin-2-yl)syklopropankarboksamid	
1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(5-metylpyridin-2-yl)syklopropankarboksamid	

Fremstilling av N-(5-(2-metoksybenzoyl)pyridin-2-yl)-1-(4-metoksyfenyl)syklopropankarboksamid



5

1-(4-metoksyfenyl)syklopropankarboksylsyre (19,2 mg, 0,100 mmol) og (6-aminopyridin-3-yl)(2-metoksyfenyl)metanon (22,8 g, 0,100 mmol) ble oppløst i *N,N*-dimetylformamid (DMF, 0,7 ml) inneholdende trietylamin (0,042 ml, 0,300 mmol). *O*-(7-azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetrametyluroniumheksafluorofosfat (HATU, 38,0 mg, 0,100 mmol) ble tilsatt, og løsningen ble omrørt i 72 timer ved 70 °C. Blandingen ble så rensert ved preparativ væskechromatografi med omvendt fase, med en gradient på 0–99 %

10

acetonitril i vann inneholdende 0,05 % trifluoreddiksyre, for å gi det rene produktet (4,2 mg, 0,010 mmol, 10 %). ESI-MS m/z beregn. 402,2, fant 403,5 ($M+1$)⁺. Retensjonstid 3,50 minutter.

- 5 Forbindelsene oppført i tabell 4 nedenfor ble fremstilt på en måte som er analog med den til *N*-(5-(2-metoksybenzoyl)pyridin-2-yl)-1-(4-metoksyfenyl)syklopropankarboksamid fra de egnede reaktantene:

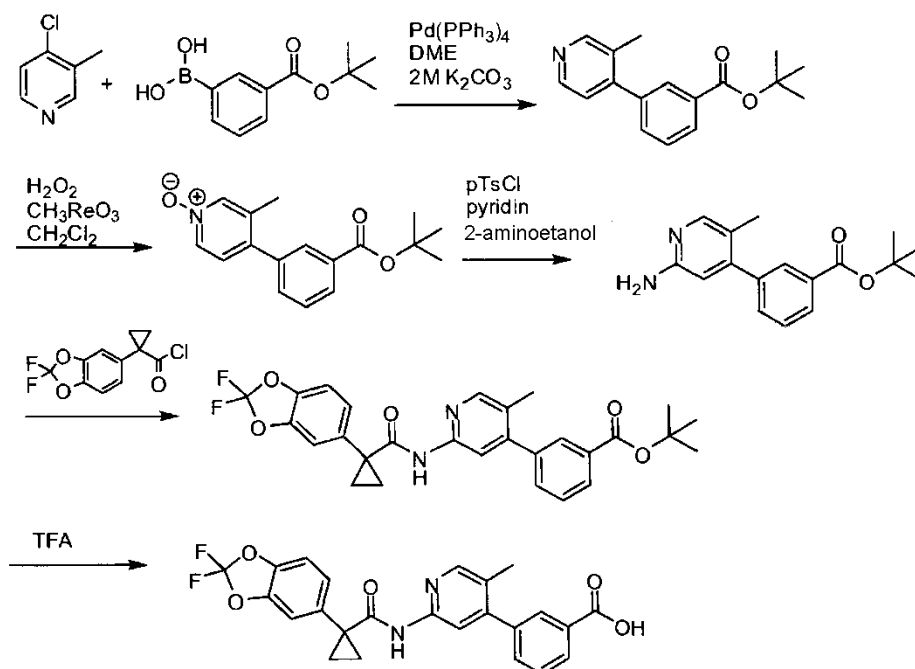
Tabell 4.

Navn	Struktur
<i>N</i> -(5-(2-metoksybenzyl)pyridin-2-yl)-1-(4-metoksyfenyl)syklopropankarboksamid	
1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)- <i>N</i> -(5-(2-metoksybenzyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid	
1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)- <i>N</i> -(5-(2-metoksybenzoyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid	
<i>N</i> -(5-(2-metoksybenzoyl)pyridin-2-yl)-1-(4-metoksyfenyl)syklopropankarboksamid	
<i>N</i> -(5-(2-metoksybenzyl)pyridin-2-yl)-1-p-tolylsyklopropankarboksamid	
1-(4-klorfenyl)- <i>N</i> -(5-(2-metoksybenzyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid	

Navn	Struktur
1-(3,4-dimetoksyfenyl)-N-(5-(2-metoksybenzyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid	
1-(3-metoksyfenyl)-N-(5-(2-metoksybenzyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid	
N-(5-(2-metoksybenzyl)pyridin-2-yl)-1-(4-(trifluormetoksy)fenyl)syklopropankarboksamid	
N-(5-(2-metoksybenzoyl)pyridin-2-yl)-1-fenylsyklopropankarboksamid	
N-(5-(2-metoksybenzoyl)pyridin-2-yl)-1-p-tolylsyklopropankarboksamid	
1-(4-klorfenyl)-N-(5-(2-metoksybenzoyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid	
1-(2,2-difluorbenzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(5-(2-metoksybenzoyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid	
1-(3,4-dimetoksyfenyl)-N-(5-(2-metoksybenzoyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid	

Navn	Struktur
N-(5-(2-metoksybenzoyl)pyridin-2-yl)-1-(2-metoksyfenyl)syklopropankarboksamid	
N-(5-(2-metoksybenzoyl)pyridin-2-yl)-1-(4-(metyltio)fenyl)syklopropankarboksamid	
N-(5-(2-metoksybenzoyl)pyridin-2-yl)-1-(4-(trifluormetoksy)fenyl)syklopropankarboksamid	

Fremstilling av 3-(2-(1-(2,2-difluorbenzo[d][1,3]dioksol-5-yl)syklopropankarboksamido)-5-metylpyridin-4-yl)benzosyre)



5

Trinn a: *tert*-butyl 3-(3-metylpyridin-4-yl)benzoat

4-klor-3-metylpyridin (2,00 g, 15,7 mmol), 3-(*tert*-butoksykarbonyl)fenylborsyre (5,42 g, 24,4 mmol), en 2M vandig løsning av kaliumkarbonat (31,4 ml, 62,8 mmol) og palladiumtetrakis(trifenylfosfin) ($\text{Pd(PPh}_3)_4$, 0,906 g, 0,784 mmol) ble suspendert i 1,2-dimetoksyetan (DME, 150 ml). Den resulterende blandingen ble omrørt og varmet opp til 80 °C i 60 timer. Den ubearbeidede reaksjonsblanding ble avkjølt til romtemperatur, og deretter ble sjiktene separert. Det organiske sjiktet ble avdampet til tørr tilstand og deretter renses på 120 g silikagel med en gradient på 0–70 % etylacetat i heksaner, for å gi det rene produktet som en blekgul olje (3,02 g, 11,2 mmol, 71,4 %).

Trinn b: 4-(3-(*tert*-butoksykarbonyl)fenyl)-3-metylpyridin 1-oksidi

tert-butyl 3-(3-metylpyridin-4-yl)benzoat (0,500 g, 1,86 mmol) ble oppløst i en blanding av diklormetan (0,800 ml) og 30 % hydrogenperoksid (0,421 ml). Metyltrioxorhenium (VII) (2,3 mg, 0,92 mmol) ble tilsatt, og reaksjonsblanding ble kraftig omrørt i 5 timer. Sjiktene ble så separert, og det organiske sjiktet ble behandlet med natriumsulfitt og deretter tørket over natriumsulfat. Det ubearbeidede produktet ble filtrert, avdampet til tørr tilstand og anvendt uten ytterligere rensing. ESI-MS m/z beregn. 285,1, fant 286,1 ($M+1$)⁺. Retensjonstid 1,22 minutter.

Trinn c: *tert*-butyl 3-(2-amino-5-metylpyridin-4-yl)benzoat

4-(3-(*tert*-butoksykarbonyl)fenyl)-3-metylpyridin 1-oksidi (0,467 g, 1,64 mmol) ble oppløst i en blanding av pyridin (0,53 ml) og acetonitril (15 ml) under en atmosfære av argon. 4-metylbenzen-1-sulfonylchlorid (0,406 g, 2,13 mmol) ble tilsatt, og reaksjonsblanding ble omrørt ved 75 °C i 72 timer. Etanolamin (7 ml) ble så tilsatt, og reaksjonsblanding ble omrørt i 5 minutter ved romtemperatur. Det ubearbeidede produktet ble fordelt mellom diklormetan og en mettet vandig løsning av natriumbikarbonat. Sjiktene ble separert, og det organiske sjiktet ble vasket med en mettet vandig løsning av natriumklorid. Det organiske sjiktet ble tørket over natriumsulfat og deretter renses på 40 g silikagel med en gradient på 0–100 % etylacetat i heksaner, for å gi det rene produktet (0,169 g, 0,594 mmol, 36,3 %). ESI-MS m/z beregn. 284,2, fant 285,1 ($M+1$)⁺. Retensjonstid på 1,28 minutter. ¹H NMR (400,0 MHz, DMSO-*d*₆) δ

7,94 - 7,91 (m, 1H), 7,84 (s, 1H), 7,79 (d, $J = 1,7$ Hz, 1H), 7,62 - 7,56 (m, 2H), 6,33 (s, 1H), 5,78 (s, 2H), 1,99 (s, 3H), 1,55 (s, 9H).

Trinn d: *tert*-butyl 3-(2-(1-(2,2-difluorbenzo[*d*][1,3]dioksol-5-yl)syklopropankarboksamido)-5-metylpyridin-4-yl)benzoat

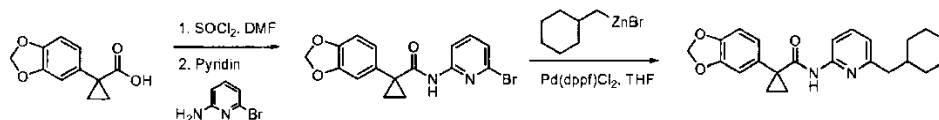
1-(2,2-difluorbenzo[*d*][1,3]dioksol-5-yl)syklopropankarboksylsyre (144 mg, 0,593 mmol) ble plassert i en ovnstørket kolbe under nitrogen. Tionylklorid (1 ml) og *N,N*-dimetylformamid (0,1 ml) ble tilsatt, og løsningen ble omrørt i 30 minutter ved romtemperatur. Overskytende tionylklorid ble fjernet under vakuum, og det resulterende faststoffet ble suspendert i 2 ml vannfritt diklormetan. Denne løsningen ble så sakte tilsatt i en løsning av *tert*-butyl 3-(2-amino-5-metylpyridin-4-yl)benzoat (129 mg, 0,454 mmol) i 5 ml vannfritt diklormetan inneholdende trietylamin (0,165 ml, 1,19 mmol). Den resulterende blandingen ble omrørt i 15 timer ved romtemperatur. Det ubearbeidede produktet ble avdampet til tørr tilstand og deretter rensset på 12 g silikagel med en gradient på 0–40 % etylacetat i heksaner, for å gi det rene produktet som et gult faststoff (162 mg, 0,319 mmol, 70,3 %). ESI-MS m/z beregn. 508,2, fant 509,1 ($M+1$)⁺ Retensjonstid 2,22 minutter. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,85 (s, 1H), 8,18 (s, 1H), 7,98 - 7,96 (m, 1H), 7,89 (s, 1H), 7,82 (d, $J = 1,6$ Hz, 1H), 7,64 - 7,62 (m, 2H), 7,57 (d, $J = 1,6$ Hz, 1H), 7,42 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H), 7,34 (dd, $J = 1,7, 8,3$ Hz, 1H), 2,14 (s, 3H), 1,55 (s, 9H), 1,51 - 1,49 (m, 2H), 1,19 - 1,15 (m, 2H).

Trinn e: 3-(2-(1-(2,2-difluorbenzo[*d*][1,3]dioksol-5-yl)syklopropankarboksamido)-5-metylpyridin-4-yl)benzosyre

tert-butyl 3-(2-(1-(2,2-difluorbenzo[*d*][1,3]dioksol-5-yl)syklopropankarboksamido)-5-metylpyridin-4-yl)benzoat (40, mg, 0,079 mmol) ble oppløst i diklormetan (1 ml). Trifluoreddiksyre (0,500 ml) ble tilsatt, og reaksjonsblandingene ble omrørt ved romtemperatur i 1 time. Den ubehandlede reaksjonsblandingene ble avdampet til tørr tilstand for å gi det rene produktet. ESI-MS m/z beregn. 452,1, fant 453,0 ($M+1$)⁺ Retensjonstid 1,64 minutter. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1H NMR (400,0 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,01 (s, 1H), 8,22 (s, 1H), 8,03 - 8,00 (m, 1H), 7,89 (d, $J = 2,5$ Hz, 2H), 7,68 -

7,64 (m, 2H), 7,58 (d, $J = 1,6$ Hz, 1H), 7,43 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H), 7,35 (dd, $J = 1,7, 8,3$ Hz, 1H), 2,18 (s, 3H), 1,54 - 1,51 (m, 2H), 1,21 - 1,17 (m, 2H).

Fremstilling av 1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(6-(sykloheksylmetyl)pyridin-2-yl)syklopronankarboksamid



Trinn a: 1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(6-bromopyridin-2-yl)syklopropankarboksamid

1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)syklopropankarboksylsyre (2,4 g, 11,6 mmol) i tonylklorid (2,5 ml, 34,7 mmol) ble tilsatt *N,N*-dimetylformamid (0,1 ml). Reaksjonsblandingen ble omrørt ved romtemperatur i 30 minutter før den ble avdampet til tørr tilstand for å gi syrekloridet.

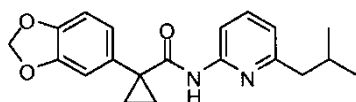
6-bromopyridin-2-amin (2,0 g, 11,6 mmol) i pyridin (10 ml) ble tilsatt syrekloridet. Reaksjonen ble varmet opp til 100 °C i 12 timer. Reaksjonen ble fortynnet med diklormetan (30 ml) og vasket med 1 N NaOH (3 x 20 ml). De organiske sjiktene ble tørket over Na₂SO₄ og avdampet til tørr tilstand. Det ubearbeidede materialet ble rensert ved silikagelkromatografi (utvasking med 0–50 % etylacetat i heksaner) for å gi produktet (2,9 g, 8,0 mmol, 70 %). ESI-MS *m/z* beregn. 360,01, fant 361,1 (*M*+1)⁺. Retensjonstid 3,59 minutter.

Trinn b: 1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(6-(sykloheksylmetyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid

En 0,5 M løsning av (sykloheksylmetyl)sink(II)bromid i THF (0,8 ml, 0,4 mmol) ble tilsatt [1,1'-bis(difenylfosfino)ferrocen] diklorpalladium(II) (8 mg, 0,01 mmol), og reaksjonen ble omrørt under nitrogen i 20 minutter. 1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-*N*-(6-bromopyridin-2-yl)syklopropankarboksamid (36 mg, 0,1 mmol) ble tilsatt, og reaksjonen ble bestrålt i mikrobølge i 10 minutter ved 150 °C. Reaksjonen ble bråkjølt med en mettet ammoniumkloridløsning (2 ml) og en mettet

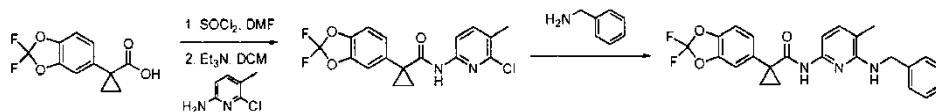
etylendiamintetraeddiksyredinatriumsaltløsning (2 ml). Blandingen ble omrørt i 30 minutter før den ble ekstrahert med diklormetan (3 x4 ml). De organiske sjiktene ble tørket over Na₂SO₄ og avdampet. Det ubearbeidede produktet ble oppløst i DMSO (1 ml) og renset ved preparativ væskekromatografi med omvendt fase, med en gradient på 0–99 % acetonitril i vann inneholdende 0,05 % trifluoreddiksyre, for å gi det rene produktet (20 mg, 0,05 mmol, 50 %). ESI-MS *m/z* beregn. 378,19, fant 379,1 (M+1)⁺; retensjonstid 3,55 minutter.

Fremstilling av 1-(benzo[*d*][1,3]dioksol-5-yl)-*N*-(6-isobutylpyridin-2-yl)syklopropankarboksamid



1-(benzo[*d*][1,3]dioksol-5-yl)-*N*-(6-isobutylpyridin-2-yl)syklopropankarboksamid ble fremstilt fra 1-(benzo[*d*][1,3]dioksol-5-yl)-*N*-(6-bromopyridin-2-yl)syklopropankarboksamid og isobutylsink(II)klorid på en måte som er analog med den til 1-(benzo[*d*][1,3]dioksol-5-yl)-*N*-(6-(sykloheksylmetyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid.

Fremstilling av N-(6-(benzylamino)-5-metylpyridin-2-yl)-1-(2,2-difluorbenzo[*d*][1,3]dioksol-5-yl)syklopropankarboksamid



Trinn a: N-(6-klor-5-metylpyridin-2-yl)-1-(2,2-difluorbenzo[*d*][1,3]dioksol-5-yl)syklopropankarboksamid

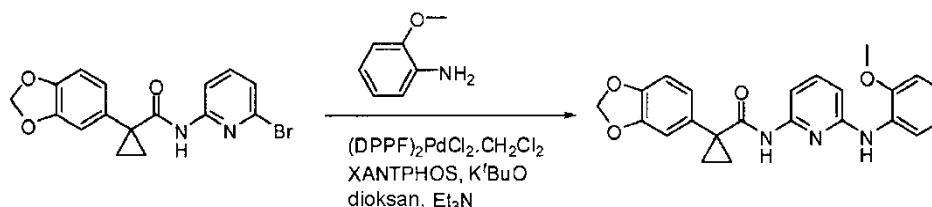
1-(2,2-difluorbenzo[*d*][1,3]dioksol-5-yl)syklopropankarboksylsyre (18,8 g, 78 mmol) i tionylklorid (17 ml, 233 mmol) ble tilsatt *N,N*-dimetylformamid (0,2 ml, 2,6 mmol). Reaksjonsblandingen ble omrørt ved romtemperatur i to timer. Overskytende tionylklorid og *N,N*-dimetylformamid ble fjernet *in vacuo*, og det resulterende syrekloridet ble anvendt direkte i neste trinn.

En løsning av 6-klor-5-metylpyridin-2-amin (11,1 g, 78 mmol) og trietylamin (22,0 ml, 156 mmol) i diklormetan (100 ml) ble tilsatt en løsning av 1-(2,2-difluorbenzo[d][1,3]dioksol-5-yl)syklopropankarbonylchlorid (20,3 g, 78 mmol) i diklormetan (50 ml). Den resulterende reaksjonsblandingen ble omrørt ved romtemperatur i atten timer. Reaksjonsblandingen ble så vasket med 1N vandig NaOH (2 x 200 ml), 1 N vandig HCl (1 x 200 ml) og mettet vandig NaHCO₃ (1 x 200 ml). De organiske sjiktene ble tørket over natriumsulfat og avdampet for å gi produktet (26,9 g, 73,3 mmol, 94 %, 2-trinn). ESI-MS *m/z* beregn. 366,06, fant 367,3(M+1)⁺. Retensjonstid 2,19 minutter. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,30 (s, 1H), 7,89-7,87 (m, 1H), 7,78-7,76 (m, 1H), 7,54-7,53 (m, 1H), 7,41-7,39 (m, 1H). 7,33-7,30 (m, 1H), 2,26 (s, 3H), 1,52-1,49 (m, 2H), 1,19-1,16 (m, 2H).

Trinn b. N-(6-(benzylamino)-5-metylpyridin-2-yl)-1-(2,2-difluorbenzo[d][1,3]dioksol-5-yl)syklopropankarboksamid

Benzylamin (0,5 ml, 4,6 mmol) ble tilsatt N-(6-klor-5-metylpyridin-2-yl)-1-(2,2-difluorbenzo[d][1,3]dioksol-5-yl)syklopropankarboksamid (37 mg, 0,1 mmol), og reaksjonsblandingen ble bestrålt i mikrobølge ved 170 °C i 60 minutter. Det ubearbeidede produktet ble rensert ved preparativ væskechromatografi med omvendt fase, med en gradient på 0–99 % acetonitril i vann inneholdende 0,05 % trifluorediksyre, for å gi det rene produktet. ESI-MS *m/z* beregn. 437,4, fant 438,3 (M+1)⁺; retensjonstid 1,83 minutter.

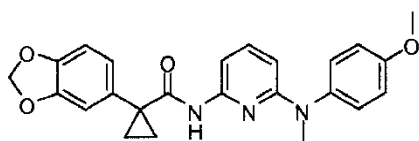
Fremstilling av 1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(6-(2-metoksyfenylamino)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid



1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(6-brompyridin-2-yl)syklopropankarboksamid (72 mg, 0,2 mmol) ble tilsatt XANTPHOS (7,00 mg, 0,008 mmol), K^tBuO (31 mg,

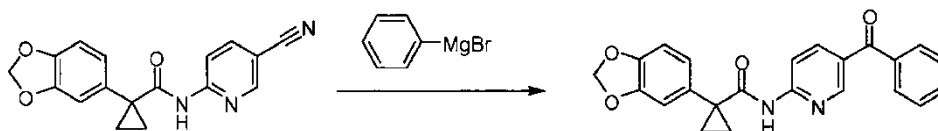
0,28 mmol), (DPPF)₂PdCl₂.CH₂Cl₂ (33,00 mg, 0,24 mmol) og 2-metoksyanilin (30 mg, 0,24 mmol), 1,4-dioksan (0,400 ml) og trietylamin (0,200 ml). Reaksjonsblandingen ble varmet opp til 150 °C i en mikrobølgereaktor i 10 minutter. Det resulterende materialet ble avkjølt til romtemperatur. Løsemiddelet ble avdampet under redusert trykk. Den resulterende blandingen ble oppløst i diklormetan og vasket med H₂O. Det organiske sjiktet ble tørket over vannfritt Na₂SO₄ og avdampet under redusert trykk. Det ubearbeidede produktet ble rensert ved kolonnekromatografi på silikagel for å gi 1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(6-(2-metoksyfenylamino)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid som deretter ble behandlet med HCl i MeOH for å danne HCl-saltet (2,4 mg, 0,0055 mmol, 2,7 %). ESI-MS *m/z* beregn. 403,1, fant 404,5 (M+1)⁺; retensjonstid 3,01 minutter.

Fremstilling av 1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(6-((2-metoksyfenyl)(metyl)amino)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid



1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(6-((2-metoksyfenyl)(metyl)amino)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid ble syntetisert ved hjelp av prosedyren for 1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(6-(2-metoksyfenylamino)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid ved å reagere 2-metoksy-N-metylanilin med 1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(6-brompyridin-2-yl)syklopropankarboksamid.

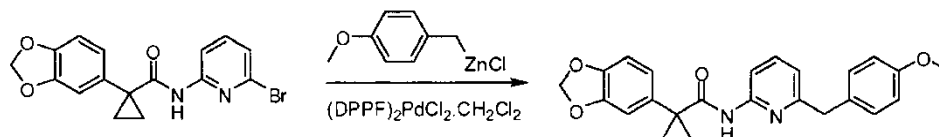
Fremstilling av 1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(5-benzoylpyridin-2-yl)syklopropankarboksamid



En løsning av 1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(5-cyanopyridin-2-yl)syklopropankarboksamid (61,00 mg, 0,20 mmol) i THF (1 ml) ved 0 °C ble

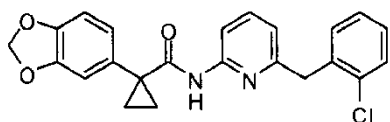
sakte tilsatt en løsning av fenylmagnesiumbromid (133 μ L, 3 M, 0,40 mmol) i eter, og reaksjonsblandingen ble varmet opp til romtemperatur og omrørt ved romtemperatur i åtti timer. Saltsyre (1M) ble tilsatt i reaksjonsmaterialet. Produktet ble ekstrahert ved hjelp av etylacetat. Det organiske sjiktet ble tørket over vannfritt Na₂SO₄ og avdampet under redusert trykk. Det ubearbeidede produktet ble oppløst i DMSO (1 ml), filtrert og rensset ved preparativ HPLC med omvendt fase, for å gi 1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(5-benzoylpyridin-2-yl)syklopropankarboksamid som et TFA-salt (18 mg, 0,035 mmol, 18 %). ESI-MS *m/z* beregn. 386,1, fant 387,1 (M+1)⁺; retensjonstid 3,45 minutter.

Fremstilling av 1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(6-(4-metoksybenzyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid



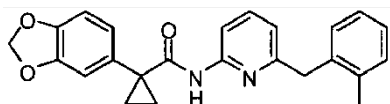
(DPPF)₂PdCl₂·CH₂Cl₂ (17 mg, 0,02 mmol) ble tilsatt en løsning av (4-metoksybenzyl)sink(II)klorid (1,60 ml, 0,5 M, 0,80 mmol) i THF under nitrogenatmosfære og omrørt ved romtemperatur i fem minutter. Til dette ble en løsning av 1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(6-bromopyridin-2-yl)syklopropankarboksamid (72 mg, 0,20 mmol) i THF (800 μ L) sakte tilsatt under nitrogenatmosfære. Reaksjonen ble varmet opp til 150 °C i en mikrobølgereaktor i 10 minutter. Det resulterende materialet ble avkjølt til romtemperatur. Na₂EDTA og mettet vandig NH₄Cl ble tilsatt i reaksjonsmaterialet og omrørt ved romtemperatur i 30 minutter. Produktet ble ekstrahert ved hjelp av diklormetan. Det organiske sjiktet ble tørket over vannfritt Na₂SO₄ og avdampet under redusert trykk. Det ubearbeidede produktet ble oppløst i DMSO (1 ml), filtrert og rensset ved preparativ HPLC med omvendt fase, for å gi 1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(6-(4-metoksybenzyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid som et TFA-salt (27 mg, 0,052 mmol, 26 %). ESI-MS *m/z* beregn. 402,2, fant 403,0 (M+1)⁺; retensjonstid 3,24 minutter.

Fremstilling av 1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(6-(2-klorbenzyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid



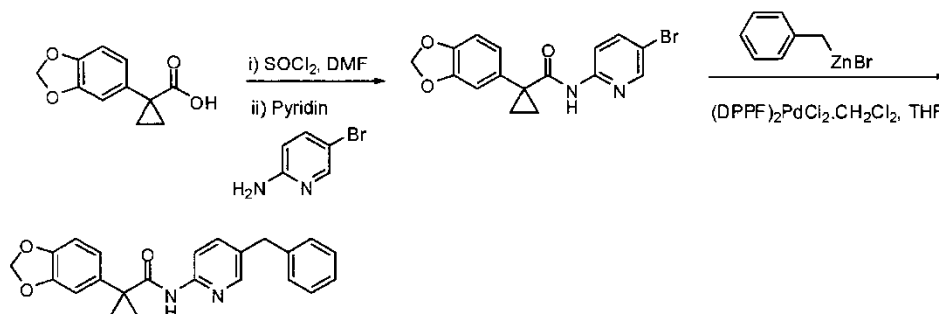
1-(benzo[*d*][1,3]dioksol-5-yl)-*N*-(6-(2-klorbenzyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid ble syntetisert ved hjelp av prosedyren for 1-(benzo[*d*][1,3]dioksol-5-yl)-*N*-(6-(4-metoksybenzyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid ved å reagere (2-klorbenzyl)sink(II)klorid med 1-(benzo[*d*][1,3]dioksol-5-yl)-*N*-(6-brompyridin-2-yl)syklopropankarboksamid.

Fremstilling av 1-(benzo[*d*][1,3]dioksol-5-yl)-*N*-(6-(2-metylbenzyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid



1-(benzo[*d*][1,3]dioksol-5-yl)-*N*-(6-(2-metylbenzyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid (VRT-810361) ble syntetisert ved hjelp av prosedyren for 1-(benzo[*d*][1,3]dioksol-5-yl)-*N*-(6-(4-metoksybenzyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid ved å reagere (2-metylbenzyl)sink(II)klorid med 1-(benzo[*d*][1,3]dioksol-5-yl)-*N*-(6-brompyridin-2-yl)syklopropankarboksamid.

Fremstilling av 1-(benzo[*d*][1,3]dioksol-5-yl)-*N*-(5-benzylpyridin-2-yl)syklopropankarboksamid



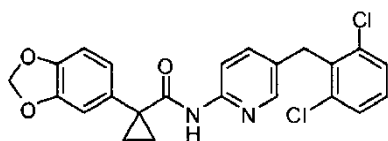
Trinn a: 1-(benzo[*d*][1,3]dioksol-5-yl)-*N*-(5-brompyridin-2-yl)syklopropankarboksamid

1-(benzo[*d*][1,3]dioksol-5-yl)syklopropankarboksytsyre (9,50 g, 46,00 mmol), ble tilsatt tionylklorid (10,00 ml, 138,00 mmol) og DMF (4 dråper), og reaksjonsblandingen ble omrørt og varmet opp ved 60 °C i tretti minutter. Overskytende tionylklorid ble avdampet under redusert trykk. En andel av syreklorid (14,4 mmol) ble oppløst i pyridin (10 ml) og ble sakte tilsatt i 5-brompyridin-2-amin (14,4 mmol) i pyridin (10 ml). Reaksjonsblandingen ble omrørt ved 110 °C i én time og tretti minutter. Pyridinet ble avdampet under redusert trykk. Den resulterende blandingen ble oppløst i diklormetan (100 ml) og vasket med 1 N NaOH (3 x 25 ml). Det organiske sjiktet ble tørket over vannfritt Na₂SO₄ og avdampet under redusert trykk. Det ubearbeidede produktet ble renset ved kolonnekromatografi på silikagel for å gi 1-(benzo[*d*][1,3]dioksol-5-yl)-*N*-(5-brompyridin-2-yl)syklopropankarboksamid (4,20 g, 11,7 mmol, 81 %).

Trinn b: 1-(benzo[*d*][1,3]dioksol-5-yl)-*N*-(5-benzylpyridin-2-yl)syklopropankarboksamid

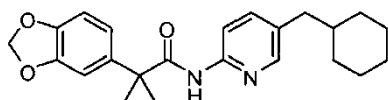
En løsning av benzylsink(II)bromid (1,60 ml, 0,5 M, 0,8 mmol) i THF og (DPPF)₂PdCl₂.CH₂Cl₂ (17 mg, 0,02 mmol) ble omrørt ved romtemperatur i 20 minutter under nitrogenatmosfære. Til dette ble en løsning av 1-(benzo[*d*][1,3]dioksol-5-yl)-*N*-(5-brompyridin-2-yl)syklopropankarboksamid (72 mg, 0,20 mmol) i THF (800 µL) tilsatt, og reaksjonsblandingen ble varmet opp til 150 °C i en mikrobølgerektor i 10 minutter. Det resulterende materialet ble avkjølt til romtemperatur. Na₂EDTA og mettet vandig NH₄Cl ble tilsatt i reaksjonsmaterialet og omrørt ved romtemperatur i 20 minutter. Produktet ble ekstrahert ved hjelp av diklormetan. Det organiske sjiktet ble tørket over vannfritt Na₂SO₄ og avdampet under redusert trykk. Det ubearbeidede produktet ble oppløst i DMSO (1 ml), filtrert og renset ved preparativ HPLC med omvendt fase, for å gi 1-(benzo[*d*][1,3]dioksol-5-yl)-*N*-(5-benzoylpyridin-2-yl)syklopropankarboksamid som et TFA-salt (15 mg, 0,031 mmol, 15 %). ESI-MS *m/z* beregn. 372,1, fant 373,1 (M+1)⁺; retensjonstid 7,14 minutter.

Fremstilling av 1-(benzo[*d*][1,3]dioksol-5-yl)-*N*-(5-(2,6-diklorbenzyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid



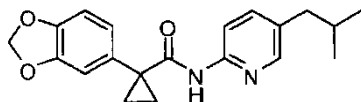
1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-*N*-(5-(2,6-diklorbenzyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid ble syntetisert ved hjelp av prosedyren for 1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-*N*-(5-benzylpyridin-2-yl)syklopropankarboksamid ved å reagere 1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-*N*-(5-brompyridin-2-yl)syklopropankarboksamid med (2,6-diklorbenzyl)sink(II)klorid.

Fremstilling av 1-benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-*N*-(5-(sykloheksylmetyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid



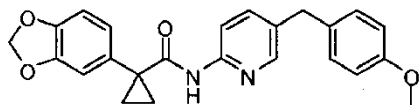
1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-*N*-(5-(sykloheksylmetyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid ble syntetisert ved hjelp av prosedyren for 1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-*N*-(5-benzylpyridin-2-yl)syklopropankarboksamid ved å reagere 1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-*N*-(5-brompyridin-2-yl)syklopropankarboksamid med (sykloheksylmetyl)sink(II)bromid.

Fremstilling av 1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-*N*-(5-isobutylpyridin-2-yl)syklopropankarboksamid



1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-*N*-(5-isobutylpyridin-2-yl)syklopropankarboksamid ble syntetisert ved hjelp av prosedyren for 1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-*N*-(5-benzylpyridin-2-yl)syklopropankarboksamid ved å reagere 1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-*N*-(5-brompyridin-2-yl)syklopropankarboksamid med isobutylsink(II)bromid.

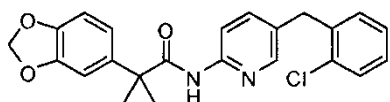
Fremstilling av 1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(5-(4-metoksybenzyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid



5 1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(5-(4-metoksybenzyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid ble syntetisert ved hjelp av prosedyren for 1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(5-benzylpyridin-2-yl)syklopropankarboksamid ved å reagere 1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(5-brompyridin-2-yl)syklopropankarboksamid med (4-metoksybenzyl)sink(II)klorid.

10

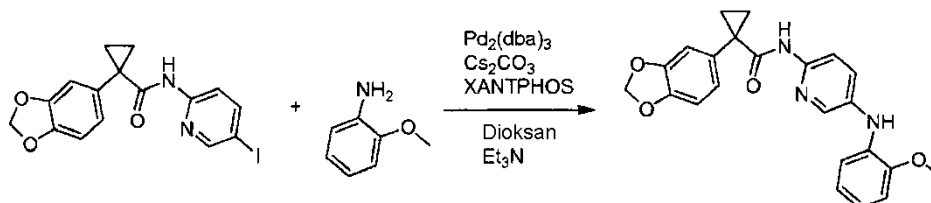
Fremstilling av 1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(5-(2-klorbenzyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid



15 1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(5-(2-klorbenzyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid ble syntetisert ved hjelp av prosedyren for 1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(5-benzylpyridin-2-yl)syklopropankarboksamid ved å reagere 1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(5-brompyridin-2-yl)syklopropankarboksamid med (2-klorbenzyl)sink(II)klorid.

20

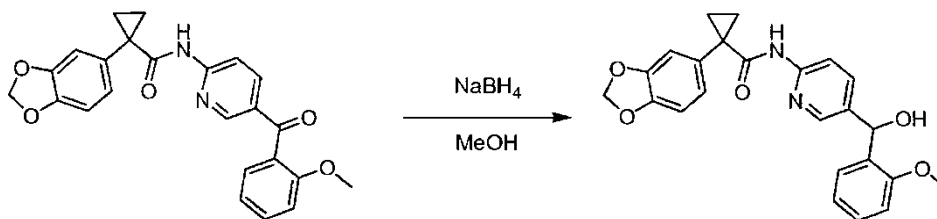
Fremstilling av 1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(5-(2-metoksyfenylamino)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid



25 1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(5-iodopyridin-2-yl)syklopropankarboksamid (816 mg, 0,200 mmol) ble suspendert i 1,4-dioksan (0,4 ml) og trietylamin

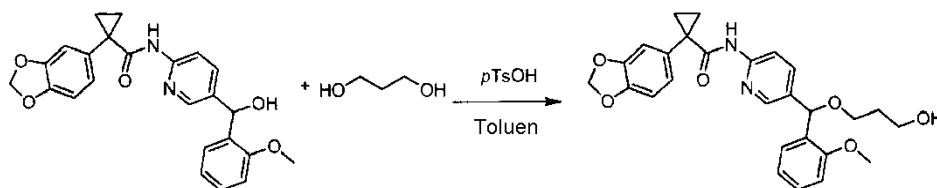
(0,2 ml) inneholdende cesiumkarbonat (91,2 mg, 0,0280 mmol), tris(dibenzylideneacetone)dipalladium (0) (1,8 mg, 0,0020 mmol), 2-metoksyanilin (0,027 ml, 0,24 mmol) og (9,9-dimetyl-9*H*-xanten-4,5-diyl)bis(difenylfosfin) (XANTPHOS, 2,3 mg, 0,0040 mmol). Reaksjonsblandingen ble varmet opp til 100 °C i 15 timer. Det ubearbeidede produktet ble så filtrert, avdampet til tørr tilstand, oppløst i *N,N*-dimetylformamid (1 ml) og rensset ved preparativ væskechromatografi med omvendt fase, med en gradient på 0–99 % acetonitril i vann inneholdende 0,05 % trifluoreddiksyre, for å gi det rene produktet (2,6 mg, 0,0049, 2,4 %). ESI-MS *m/z* beregn. 403,2, fant 404,5 (*M*+1)⁺. Retensjonstid 2,73 minutter.

Fremstilling av 1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-*N*-(5-(hydroksy(2-metoksyfenyl)metyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid



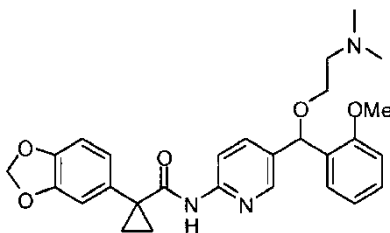
1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-*N*-(5-(2-metoksybenzoyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid (0,50 g, 1,2 mmol) ble suspendert i 25 ml metanol. Natriumborhydrid (0,454 g, 12,0 mmol) ble tilsatt i små porsjoner. Etter omrøring i én time ble reaksjonsblandingen avdampet til tørr tilstand og rensset på 40 g silikagel med en gradient på 15–70 % etylacetat i heksaner, for å gi det rene produktet som et hvitt faststoff (0,2125 g, 0,5078 mmol, 42 %). ESI-MS *m/z* beregn. 418,6, fant 419,3 (*M*+1)⁺. Retensjonstid 2,59 minutter.

Fremstilling av 1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-*N*-(5-((3-hydroksypropoksy)(2-metoksyfenyl)metyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid



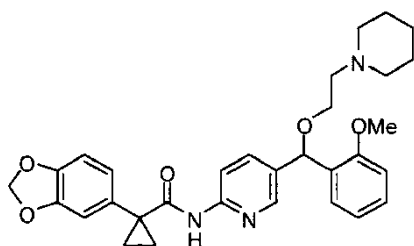
1-(benzo[*d*][1,3]dioksol-5-yl)-*N*-(5-(hydroksy(2-metoksyfenyl)metyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid (41,8 mg, 0,100 mmol) ble suspendert i 2 ml toluen inneholdende 4-metylbenzensulfonsyrehydrat (*p*TsOH, 23,8 mg, 0,125 mmol) og propan-1,3-diol (9,89 mg, 0,130 mmol). Reaksjonsblandingen ble så varmet opp til 140 °C i 5 minutter i en mikrobølgereaktor. Det ubearbeidede produktet ble så filtrert, avdampet til tørr tilstand, oppløst i *N,N*-dimetylformamid (1 ml) og renses ved preparativ væskechromatografi med omvendt fase, med en gradient på 0–99 % acetonitril i vann inneholdende 0,05 % trifluoreddiksyre, for å gi det rene produktet (26,5 mg, 0,0556 mmol, 55,6 %). ESI-MS *m/z* beregn. 476,5, fant 477,3 (*M*+1)⁺. Retensjonstid 2,71 minutter.

Fremstilling av 1-(benzo[*d*][1,3]dioksol-5-yl)-*N*-(5-((2-(dimetylamino)etoksy)(2-metoksyfenyl)metyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid



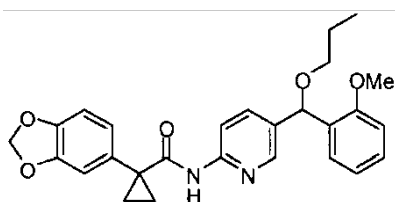
1-(benzo[*d*][1,3]dioksol-5-yl)-*N*-(5-((2-(dimetylamino)etoksy)(2-metoksyfenyl)metyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid ble fremstilt fra 1-(benzo[*d*][1,3]dioksol-5-yl)-*N*-(5-(hydroksy(2-metoksyfenyl)metyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid og 2-(dimetylamino)etanol på en måte som er analog med den til 1-(benzo[*d*][1,3]dioksol-5-yl)-*N*-(5-((3-hydroksypropoksy)(2-metoksyfenyl)metyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid.

Fremstilling av 1-(benzo[*d*][1,3]dioksol-5-yl)-*N*-(5-((2-metoksyfenyl)(2-(piperidin-1-yl)etoksy)metyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid



1-(benzo[*d*][1,3]dioksol-5-yl)-*N*-(5-((2-metoksyfenyl)(2-(piperidin-1-yl)etoksy)metyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid ble fremstilt fra 1-(benzo[*d*][1,3]dioksol-5-yl)-*N*-(5-(hydroksy(2-metoksyfenyl)metyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid og 2-(piperidin-1-yl)etanol på en måte som er analog med den til 1-(benzo[*d*][1,3]dioksol-5-yl)-*N*-(5-((3-hydroksypropoksy)(2-metoksyfenyl)metyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid.

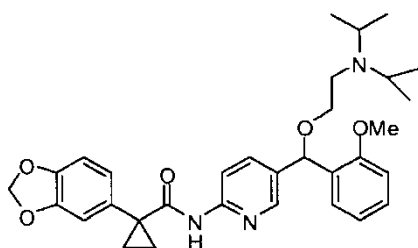
10 **Fremstilling av 1-(benzo[*d*][1,3]dioksol-5-yl)-*N*-(5-((2-metoksyfenyl)(propoksy)metyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid**



1-(benzo[*d*][1,3]dioksol-5-yl)-*N*-(5-((2-metoksyfenyl)(propoksy)metyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid ble fremstilt fra 1-(benzo[*d*][1,3]dioksol-5-yl)-*N*-(5-(hydroksy(2-metoksyfenyl)metyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid og propan-1-ol på en måte som er analog med den til 1-(benzo[*d*][1,3]dioksol-5-yl)-*N*-(5-((3-hydroksypropoksy)(2-metoksyfenyl)metyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid.

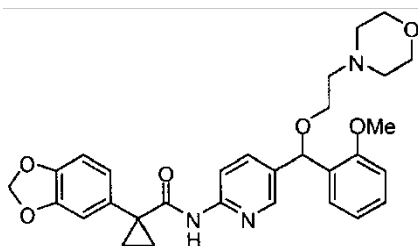
20

Fremstilling av 1-(benzo[*d*][1,3]dioksol-5-yl)-*N*-(5-((2-(diisopropylamino)etoksy)(2-metoksyfenyl)metyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid



1-(benzo[*d*][1,3]dioksol-5-yl)-*N*-(5-((2-(diisopropylamino)etoksy)(2-metoksyfenyl)metyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid ble fremstilt fra 1-(benzo[*d*][1,3]dioksol-5-yl)-*N*-(5-(hydroksy(2-metoksyfenyl)metyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid og 2-(diisopropylamino)etanol på en måte som er analog med den til 1-(benzo[*d*][1,3]dioksol-5-yl)-*N*-(5-((3-hydroksypropoksy)(2-metoksyfenyl)metyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid.

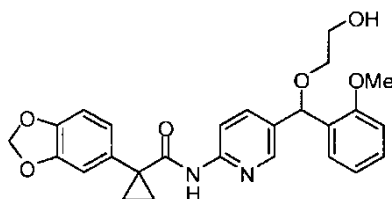
10 **Fremstilling av 1-(benzo[*d*][1,3]dioksol-5-yl)-*N*-(5-((2-metoksyfenyl)(2-morfolinoetoksy)metyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid**



15 1-(benzo[*d*][1,3]dioksol-5-yl)-*N*-(5-((2-metoksyfenyl)(2-morfolinoetoksy)metyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid ble fremstilt fra 1-(benzo[*d*][1,3]dioksol-5-yl)-*N*-(5-(hydroksy(2-metoksyfenyl)metyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid og 2-morfolinoetanol på en måte som er analog med den til 1-(benzo[*d*][1,3]dioksol-5-yl)-*N*-(5-((3-hydroksypropoksy)(2-metoksyfenyl)metyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid.

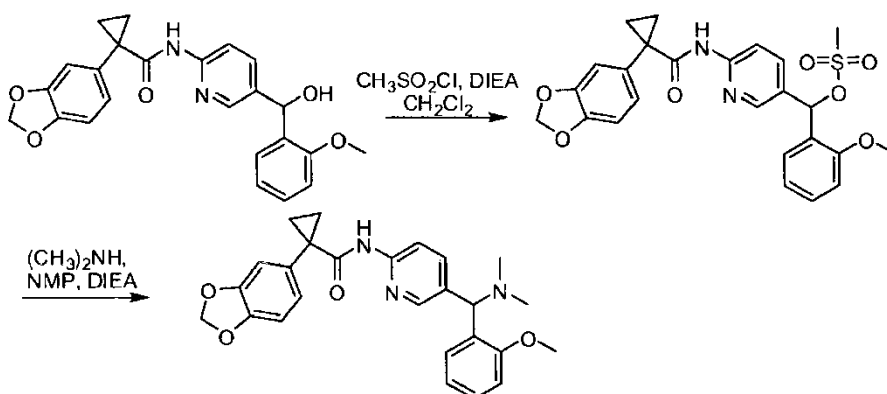
20

Fremstilling av 1-(benzo[*d*][1,3]dioksol-5-yl)-*N*-(5-((2-hydroksyetoksy)(2-metoksyfenyl)metyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid



1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-*N*-(5-((2-hydroksyetoksy)(2-
 metoksyfenyl)metyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid ble fremstilt fra 1-
 5 (benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-*N*-(5-(hydroksy(2-metoksyfenyl)metyl)pyridin-2-
 yl)syklopropankarboksamid og etan-1,2-diol på en måte som er analog med den
 til 1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-*N*-(5-((3-hydroksypropoksy)(2-
 metoksyfenyl)metyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid.

10 **Fremstilling av 1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-*N*-(5-((dimetylamino)(2-
 metoksyfenyl)metyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid**



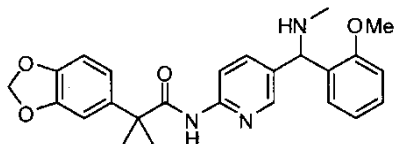
Trinn a: **(6-(1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)syklopropankarboksamido)pyridin-3-yl)(2-metoksyfenyl)metyl
 15 metansulfonat**

Metansulfonylklorid (56 µl, 0,72 mmol) ble sakte tilsatt i blandingen av 1-
 benzo[1,3]dioksol-5-yl-syklopropankarboksylsyre {5-[hydroksy-(2-metoksy-
 20 fenyl)-metyl]-pyridin-2-yl}-amid (50 mg, 0,12 mmol) og DIEA (24 µl,
 0,14 mmol) i diklormetan (2 ml) ved 0 °C. Reaksjonsblandingen ble omrørt ved
 omgivelsestemperatur i 3 timer. Løsemidlene ble avdampet og resten ble
 anvendt i det neste trinnet uten noe ytterligere rensing.

Trinn b: 1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(5-((dimetylamino)(2-metoksyfenyl)metyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid

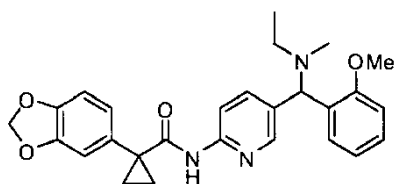
(6-(1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)syklopropankarboksamido)pyridin-3-yl)(2-metoksyfenyl)metylmetansulfonat (0,12 mmol) ble oppløst i NMP (2 ml) etterfulgt av tilsetning av 2M løsning av dimetylamin i THF (600 µl, 0,12 mmol) og DIEA (21 µl, 0,12 mmol). Reaksjonsblandingen ble holdt ved omgivelsestemperatur i 16 timer. Den resulterende blandingen ble utsatt for HPLC-rensing for å tilveiebringe trifluoreddiksalt av målmaterialiet (55 mg, 82 %) som et fargeløst faststoff. ¹H-NMR (DMSO): δ 8,43 (s, 1H), δ 8,40 (d, J=2 Hz, 1H), δ 8,06 (d, J=8,7 Hz, 1H), δ 7,96 (dd, J= 2 Hz, J=8,7 Hz, 1H), δ 7,56 (bd, J=6,5 Hz, 1H), δ 7,39 (bt, J=6,5 Hz, 1H), δ 7,05-7,11 (m, 3H), δ 6,96 (s, 2H), δ 6,05 (s, 2H), δ 5,68 (bm, 1H), δ 3,85 (s, 3H), δ 2,75 (s, 6H), δ 1,42-1,45 (m, 2H), δ 1,13-1,16 (m, 2H).

Fremstilling av 1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(5-((2-metoksyfenyl)(metylamino)metyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid



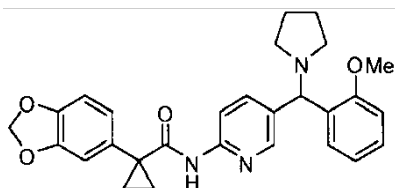
1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(5-((2-metoksyfenyl)(metylamino)metyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid ble fremstilt fra (6-(1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)syklopropankarboksamido)pyridin-3-yl)(2-metoksyfenyl)metyl metansulfonat og metylamin på en måte som er analog med den til 1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(5-((dimetylamino)(2-metoksyfenyl)metyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid.

Fremstilling av 1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-((etyl(metyl)amino)(2-metoksyfenyl)metyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid



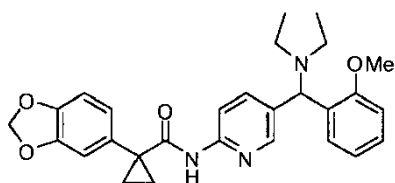
1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(5-((etyl(metyl)amino)(2-
 metoksyfenyl)metyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid ble fremstilt fra (6-(1-
 5 (benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)syklopropankarboksamido)pyridin-3-yl)(2-
 metoksyfenyl)metylmetansulfonat og N-metyletanamin på en måte som er
 analog med den til 1-(benzo[d] [1,3]dioksol-5-yl)-N-(5-((dimetylamino)(2-
 metoksyfenyl)metyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid.

10 **Fremstilling av 1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(5-((2-
 metoksyfenyl)(pyrrolidin-1-yl)metyl)pyridin-2-
 yl)syklopropankarboksamid**



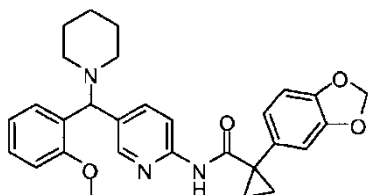
15 1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(5-((2-metoksyfenyl)(pyrrolidin-1-
 yl)metyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid ble fremstilt fra (6-(1-
 (benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)syklopropankarboksamido)pyridin-3-yl)(2-
 metoksyfenyl)metylmetansulfonat og pyrrolidin på en måte som er analog med
 den til 1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(5-((dimetylamino)(2-
 20 metoksyfenyl)metyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid.

**Fremstilling av 1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(5-((dietylamino)(2-
 metoksyfenyl)metyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid**



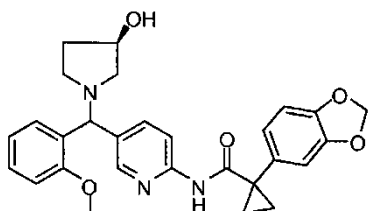
1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(5-((diethylamino)(2-metoksyfenyl)metyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid ble fremstilt fra (6-(1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)syklopropankarboksamido)pyridin-3-yl)(2-metoksyfenyl)metylmetansulfonat og dietylamin på en måte som er analog med den til 1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(5-((dimetylamino)(2-metoksyfenyl)metyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid.

Fremstilling av 1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(5-((2-metoksyfenyl)(piperidin-1-yl)metyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid



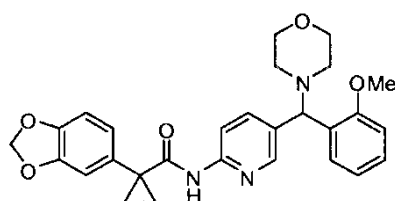
1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(5-((2-metoksyfenyl)(piperidin-1-yl)metyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid ble fremstilt fra (6-(1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)syklopropankarboksamido)pyridin-3-yl)(2-metoksyfenyl)metylmetansulfonat og piperidin på en måte som er analog med den til 1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(5-((dimetylamino)(2-metoksyfenyl)metyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid.

Fremstilling av 1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(5-(((R)-3-hydroksypyrrolidin-1-yl)(2-metoksyfenyl)metyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid



1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(5-(((R)-3-hydroksypyrrolidin-1-yl)(2-metoksyfenyl)metyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid ble fremstilt fra (6-(1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)syklopropankarboksamido)pyridin-3-yl)(2-metoksyfenyl)metylmetansulfonat og (R)-3-hydroksypyrrolidin på en måte som er analog med den til 1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(5-((dimetylamino)(2-metoksyfenyl)metyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid.

Fremstilling av 1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(5-((2-metoksyfenyl)(morfolino)metyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid

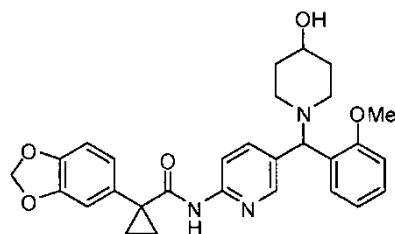


10

1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(5-((2-metoksyfenyl)(morfolino)metyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid ble fremstilt fra (6-(1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)syklopropankarboksamido)pyridin-3-yl)(2-metoksyfenyl)metylmetansulfonat og morfolin på en måte som er analog med den til 1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(5-((dimetylamino)(2-metoksyfenyl)metyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid.

15

Fremstilling av 1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(5-((4-hydroksypiperidin-1-yl)(2-metoksyfenyl)metyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid



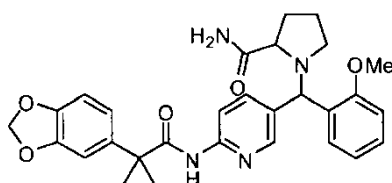
20

1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(5-((4-hydroksypiperidin-1-yl)(2-metoksyfenyl)metyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid ble fremstilt fra (6-(1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)syklopropankarboksamido)pyridin-3-yl)(2-

25

metoksyfenyl)metylmetsulfonat og 4-hydroksypiperidin på en måte som er analog med den til 1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(5-((dimetylamino)(2-metoksyfenyl)metyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid.

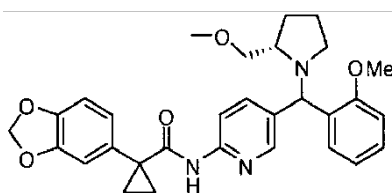
5 **Fremstilling av 1-((6-(1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)syklopropankarboksamido)pyridin-3-yl)(2-metoksyfenyl)metyl)pyrrolidin-2-karboksamid**



10 1-((6-(1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)syklopropankarboksamido)pyridin-3-yl)(2-metoksyfenyl)metyl)pyrrolidin-2-karboksamid ble fremstilt fra (6-(1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)syklopropankarboksamido)pyridin-3-yl)(2-metoksyfenyl)metylmetsulfonat og pyrrolidin-2-karboksamid på en måte som er analog med den til 1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(5-((dimetylamino)(2-metoksyfenyl)metyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid.

15

Fremstilling av 1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(5-(((S)-2-(metoksymetyl)pyrrolidin-1-yl)(2-metoksyfenyl)metyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid

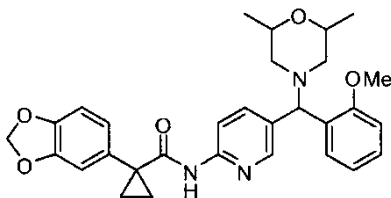


20

1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(5-(((S)-2-(metoksymetyl)pyrrolidin-1-yl)(2-metoksyfenyl)metyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid ble fremstilt fra (6-(1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)syklopropankarboksamido)pyridin-3-yl)(2-metoksyfenyl)metylmetsulfonat og piperidin på en måte som er analog med den til 1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(5-((dimetylamino)(2-metoksyfenyl)metyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid.

25

Fremstilling av 1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(5-((2,6-dimetylmorfolino)(2-metoksyfenyl)metyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid



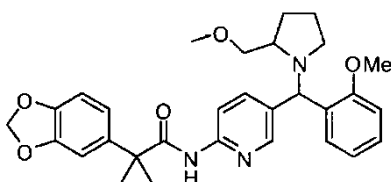
5

1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(5-((2,6-dimetylmorfolino)(2-metoksyfenyl)metyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid ble fremstilt fra (6-(1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)syklopropankarboksamido)pyridin-3-yl)(2-metoksyfenyl)metylmetsulfonat og 2,6-dimetylmorfolin på en måte som er analog med den til 1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(5-((dimetylamino)(2-metoksyfenyl)metyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid.

10

Fremstilling av 1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(5-((2-(metoksymetyl)pyrrolidin-1-yl)(2-metoksyfenyl)metyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid

15

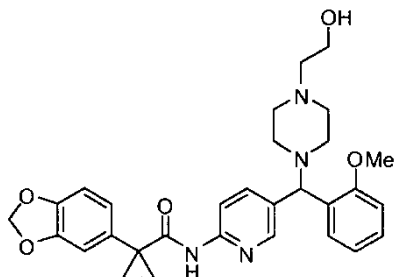


1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(5-((2-(metoksymetyl)pyrrolidin-1-yl)(2-metoksyfenyl)metyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid ble fremstilt fra (6-(1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)syklopropankarboksamido)pyridin-3-yl)(2-metoksyfenyl)metylmetsulfonat og 2-(metoksymetyl)pyrrolidin på en måte som er analog med den til 1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(5-((dimetylamino)(2-metoksyfenyl)metyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid.

20

25

Fremstilling av 1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(5-((4-(2-hydroksyetyl)piperazin-1-yl)(2-metoksyfenyl)metyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid

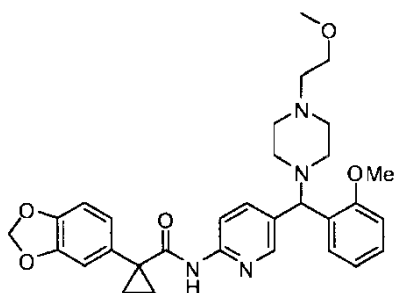


5

1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(5-((4-(2-hydroksyetyl)piperazin-1-yl)(2-metoksyfenyl)metyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid ble fremstilt fra (6-(1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)syklopropankarboksamido)pyridin-3-yl)(2-metoksyfenyl)metylmetansulfonat og 2-(piperazin-1-yl)etanol på en måte som er analog med den til 1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(5-((dimetylamino)(2-metoksyfenyl)metyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid.

10

Fremstilling av 1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(5-((4-(2-metoksyetyl)piperazin-1-yl)(2-metoksyfenyl)metyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid



15

1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(5-((4-(2-metoksyetyl)piperazin-1-yl)(2-metoksyfenyl)metyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid ble fremstilt fra (6-(1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)syklopropankarboksamido)pyridin-3-yl)(2-metoksyfenyl)metylmetansulfonat og 1-(2-metoksyetyl)piperazin på en måte som er analog med den til 1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(5-((dimetylamino)(2-metoksyfenyl)metyl)pyridin-2-yl)syklopropankarboksamid.

20

Angitt nedenfor er de karakteriserende dataene for forbindelsen ifølge den foreliggende oppfinnelsen og eksempelforbindelser med formelen I, fremstilt i henhold til eksemplene ovenfor.

5

Tabell 5.

Smnst. nr.	LC/MS M+1	LC/RT min
1	403,1	3,48
2	311,1	2,26
3	403,1	3,24
4	443,5	3,4
5	387,1	3,44
6	326,3	2,33
7	474,3	2,94
8	389,3	3,2
9	472,3	2,88
10	419,3	2,91
11	532,3	2,39
12	433,3	3,3
13	389,1	2,89
14	387,1	3,45
15	390,3	2,93
16	379,3	8,16
17	351,1	3,5
18	546,5	2,59
19	297,1	2,67
20	446,3	2,8
21	297,3	2,09
22	545,5	2,74

Smnst. nr.	LC/MS M+1	LC/RT min
23	516,3	2,96
24	441,3	8,81
25	269,1	2,82
26	311,3	2,4
27	417,3	3,5
28	403,5	3,57
29	339,3	6,6
30	457,5	3,79
31	373,3	3,33
32	486,3	2,94
33	461,5	3,6
34	389,1	2,97
35	403,3	3,15
36	516,3	2,97
37	419,3	3,69
38	283,1	2,68
39	531,5	2,61
40	333,1	1,48
41	345,1	3,07
42	297,3	2,18
43	325,3	2,13
44	419,3	2,57
45	515,5	2,75
46	393,1	3,3
47	301,3	3,05
48	389,1	2,55

Smnst. nr.	LC/MS M+1	LC/RT min
49	488,3	2,8
50	453	1,63
51	516,3	3,01
52	404,5	2,73
53	432,3	2,74
54	283,1	2,61
55	488,3	2,76
56	339,2	3,19
57	463,5	2,66
58	502,3	2,75
59	407,5	3,39
60	403,5	3,11
61	267,1	1,6
62	460,3	2,86
63	373,1	7,14
64	404,5	3,01
65	308,1	3,07
66	477,3	2,71
67	379,1	3,56
68	453,1	3,69
69	283,1	2,13
70	387,3	3,7
71	530,5	2,53
72	297,3	2,19
73	438,3	1,83
74	418,3	2,87

Smnst. nr.	LC/MS M+1	LC/RT min
75	297,1	2,48
76	407,5	3,69
77	373,1	3,5
78	407	3,6

Assayer for detektering og måling av forbindelsenes $\Delta F508$ -CFTR-korreksjonsegenskaper

5

Optiske membranpotensialfremgangsmåter for analyse av forbindelsenes $\Delta F508$ -CFTR-modulasjonsegenskaper

10 Assayet benytter fluorescerende spenningssensitive fargemiddel til å måle endringer i membranpotensial ved hjelp av en fluorescerende plateleser (f.eks. FLIPR III, Molecular Devices, Inc.) som en avlesning for økning i funksjonell $\Delta F508$ -CFTR i NIH 3T3-celler. Drivkraften for responsen er opprettelsen av en kloridiongradient sammen med kanalaktivering ved hjelp av ett enkelt væsketilsetningstrinn etter at cellene tidligere har vært behandlet med

15 forbindelser og deretter fylt med et spenningssensitivt fargemiddel.

Identifikasjon av korreksjonsforbindelser

20 For å identifisere små molekyler som korrigerer trafikkdefekten som er assosiert med $\Delta F508$ -CFTR, ble det utviklet HTS-assayformat med enkelttilsetning. Assayplater inneholdende celler inkuberes i ~2–4 timer i vevskulturinkubator ved 37 °C, 5 % CO₂, 90 % fuktighet. Deretter er cellene klare for forbindelseeksponering etter klebing til bunnen av assayplatene.

25 Cellene ble inkubert i serumfritt medium i 16–24 timer i vevskulturinkubator ved 37 °C, 5 % CO₂, 90 % fuktighet i nærvær eller fravær (negativ kontroll) av testforbindelse. Cellene ble deretter skylt 3 ganger med Krebs Ringers løsning og fylt med et spenningssensitivt redistribusjonsfargemiddel. For å aktivere $\Delta F508$ -CFTR ble 10 µM forskolin og CFTR-potensiator, genistein (20 µM) tilsatt sammen

30 med Cl⁻-fritt medium i hver brønn. Tilsetningen av Cl⁻-fritt medium fremmet Cl⁻-

utstrømning som svar på $\Delta F508$ -CFTR-aktivering, og den resulterende membrandepolarisasjonen ble optisk overvåket ved hjelp av spenningssensorfargemiddel.

5 Identifikasjon av potensiatorforbindelser

For å identifisere potensiatorer av $\Delta F508$ -CFTR ble det utviklet et HTS-assayformat med dobbeltilsetning. Dette HTS-assayet benytter fluorescerende spenningssensitive fargemiddel til å måle endringer i membranpotensial på FLEPR III som en måling for økning i $\Delta F508$ CFTR-gating (konduktans) i temperaturkorrigerede $\Delta F508$ CFTR NIH 3T3-celler. Drivkraften for responsen er en Cl^- -ionegradient sammen med kanalaktivering med forskolin i et enkelt væsketilsetningstrinn ved hjelp av en fluorescerende plateleser slik som FLIPR III etter at cellene tidligere har vært behandlet med potensiatorforbindelser (eller DMSO-vehikkelkontroll), og deretter fylt med et redistribusjonsfargemiddel.

Løsninger:

Badeløsning nr.1: (i mM) NaCl 160, KCl 4.5, $CaCl_2$ 2, $MgCl_2$ 1, HEPES 10, pH 7,4 med NaOH.

Kloridfri badeløsning: Kloridsalter i badeløsning nr. 1 substitueres med glukonatsalter.

Cellekultur

NIH3T3-fibroblaster fra mus som stabilt uttrykker $\Delta F508$ -CFTR, anvendes til optiske målinger av membranpotensial. Cellene holdes ved 37 °C i 5 % CO_2 og 90 % fuktighet i Dulbeccos modifiserte Eagle-medium supplert med 2 mM glutamin, 10 % bovint fosterserum, 1 x NEAA, β -ME, 1 x pen/strep og 25 mM HEPES i 175 cm² kulturflasker. I alle optiske assayer ble cellene utsådd ved ~20 000/brønn på 384-brønners matrigelovertrukne plater og dyrket i 2 timer ved 37 °C før dyrking ved 27 °C i 24 timer for potensiatorassayet. I korreksjonsassayene dyrkes cellene ved 27 °C eller 37 °C med og uten forbindelser i 16–24 timer.

Elektrofysiologiske assayer for analyse av forbindelsenes $\Delta F508$ -CFTR-modulasjonsegenskaper.

5 1. Ussing-kammerassay

Ussing-kammerforsøk ble utført på polariserte luftveisepitelceller som uttrykker $\Delta F508$ -CFTR, for å karakterisere $\Delta F508$ -CFTR-modulatoren som er identifisert i de optiske assayene, ytterligere. Ikke-CF- og CF-luftveisepitler ble isolert fra bronkialt vev, dyrket som tidligere beskrevet (Galiotta, L.J.V., Lantero, S., Gazzolo, A., Sacco, O., Romano, L., Rossi, G.A., & Zegarra-Moran, O. (1998) In Vitro Cell Dev. Biol. 34, 478–481), og plassert på Costar® Snapwell™-filtre som var forhåndsovertrukket med NIH3T3-kondisjonert medium. Etter fire dager ble det apikale mediet fjernet, og cellene ble dyrket ved en luft/væske-fasegrense i > 14 dager før anvendelse. Dette resulterte i et monosjikt av fullstendig differensierte sylinderceller som ble ciliert, trekk som er karakteristiske for luftveisepitler. Ikke-CF HBE ble isolert fra ikke-røykere som ikke hadde noen kjent lungesykdom. CF-HBE ble isolert fra pasienter homozygote for $\Delta F508$ -CFTR.

20 HBE dyrket på Costar® Snapwell™-cellekulturinnsatser ble plassert i et Ussing-kammer (Physiologic Instruments, Inc., San Diego, CA), og den transepiteliale resistensen og kortslutningsstrømmen i nærvær av en basolateral til apikal Cl^- -gradient (I_{sc}) ble målt ved hjelp av et spenning-klemme-system (Department of Bioengineering, University of Iowa, IA). I korte trekk ble HBE undersøkt under spenning-klemme-registreringsforhold ($V_{\text{hold}} = 0 \text{ mV}$) ved 37°C . Den basolaterale løsningen inneholdt (i mM) 145 NaCl, 0,83 K_2HPO_4 , 3,3 KH_2PO_4 , 1,2 MgCl_2 , 1,2 CaCl_2 , 10 glukose, 10 HEPES (pH justert til 7,35 med NaOH), og den apikale løsningen inneholdt (i mM) 145 NaGlukonat, 1,2 MgCl_2 , 1,2 CaCl_2 , 10 glukose, 10 HEPES (pH justert til 7,35 med NaOH).

Identifikasjon av korreksjonsforbindelser

35 Den typiske protokollen benyttet en basolateral til apikal membrans Cl^- -konsentrasjonsgradient. For å konfigurere denne gradienten ble det anvendt normal Ringer på den basolaterale membranen, mens apikal NaCl ble erstattet

med ekvimolart natriumglukonat (titrert til pH 7,4 med NaOH) for å gi en stor Cl^- -konsentrasjonsgradient over epitelet. Alle forsøk ble utført med intakte monosjikt. For å aktivere $\Delta\text{F508-CFTR}$ fullt ut ble den apikale siden tilsatt forskolin (10 μM), PDE-inhibitor, IBMX (100 μM) og CFTR-potensiator, genistein (50 μM).

Som observert i andre celletyper øker inkubasjon ved lave temperaturer av FRT-celler og humane bronkiale epitelceller som er isolert fra syke CF-pasienter (CF-HBE) som uttrykker $\Delta\text{F508-CFTR}$, den funksjonelle densiteten til CFTR i plasmamembranen. For å bestemme korreksjonsforbindelsenes aktivitet ble cellene inkubert med testforbindelse i 24–48 timer ved 37 °C og deretter vasket 3 x før registrering. cAMP- og genistein-mediert I_{SC} i forbindelsesbehandlede celler ble normalisert til 37 °C-kontroller og uttrykt som prosentvis aktivitet av CFTR-aktivitet i wt-HBE. Preinkubering av cellene med korreksjonsforbindelsen økte signifikant cAMP- og genistein-mediert I_{SC} sammenlignet med 37 °C-kontrollene.

Identifikasjon av potensiatorforbindelser

Den typiske protokollen benyttet en basolateral til apikal membrans Cl^- -konsentrasjonsgradient. For å konfigurere denne gradienten ble det anvendt normal Ringers på den basolaterale membranen, mens apikal NaCl ble erstattet med ekvimolart natriumglukonat (titrert til pH 7,4 med NaOH) for å gi en stor Cl^- -konsentrasjonsgradient over epitelet. Den apikale siden av cellekulturinnsatsene ble tilsatt forskolin (10 μM) og alle testforbindelser. Virkningen av de antatte $\Delta\text{F508-CFTR}$ -potensiatorne ble sammenlignet med den av den kjente potensiatoren, genistein.

2. Patch-klemme-registreringer

Samlet Cl^- -strøm i $\Delta\text{F508-NIH3T3}$ -celler ble overvåket ved hjelp av den perforerte patch-registreringskonfigurasjonen som tidligere beskrevet (Rae, J., Cooper, K., Gates, P., & Watsky, M. (1991) J. Neurosci. Methods 37, 15–26). Spennings-klemme-registreringer ble utført ved 22 °C ved hjelp av en Axopatch 200B patch-klemme-forsterker (Axon Instruments Inc., Foster City, CA). Pipettløsningen inneholdt (i mM) 150 *N*-metyl-D-glukamin (NMDG)-Cl, 2 MgCl_2 , 2

CaCl₂, 10 EGTA, 10 HEPES og 240 µg/ml amfotericin-B (pH justert til 7,35 med HCl). Det ekstracellulære mediet inneholdt (i mM) 150 NMDG-Cl, 2 MgCl₂, 2 CaCl₂, 10 HEPES (pH justert til 7,35 med HCl). Pulsgenerering, datainnsamling og analyse ble utført ved hjelp av en PC utstyrt med et Digidata 1320 A/D-grensesnitt sammen med Clampex 8 (Axon Instruments Inc.). For å aktivere ΔF508-CFTR ble det tilsatt 10 µM forskolin og 20 µM genistein i badet, og strøm/spenning-forholdet ble overvåket hvert 30 sekund.

Identifikasjon av korreksjonsforbindelser

For å bestemme korreksjonsforbindelsenes aktivitet for å øke densiteten av funksjonell ΔF508-CFTR i plasmamembranen anvendte vi de ovennevnte perforerte patch-registreringsteknikkene til å måle strømdensiteten etter 24 timers behandling med korreksjonsforbindelsene. For å aktivere ΔF508-CFTR fullt ut ble cellene tilsatt 10 µM forskolin og 20 µM genistein. Under våre registreringsforhold var strømdensiteten etter 24 timers inkubasjon ved 27 °C høyere enn det som ble observert etter 24 timers inkubasjon ved 37 °C. Disse resultatene er i overensstemmelse med de kjente virkningene som inkubasjon ved lav temperatur har på ΔF508-CFTR-densiteten i plasmamembranen. For å bestemme hvordan korreksjonsforbindelser virker på CFTR-strømdensitet ble cellene inkubert med 10 µM av testforbindelsen i 24 timer ved 37 °C, og strømdensiteten ble sammenlignet med 27 °C- og 37 °C-kontrollene (prosentvis aktivitet). Før registrering ble cellene vasket 3 x med ekstracellulært registreringsmedium for å fjerne enhver resterende testforbindelse. Preinkubering med 10 µM av korreksjonsforbindelser økte signifikant cAMP- og genistein-avhengig strøm sammenlignet med 37 °C-kontrollene.

Identifikasjon av potensiatorforbindelser

ΔF508-CFTR-potensiatorenes evne til å øke den makroskopiske ΔF508-CFTR Cl⁻ strømmen ($I_{\Delta F508}$) i NIH3T3-celler som stabilt uttrykker ΔF508-CFTR, ble også undersøkt ved hjelp av perforert patch-registreringsteknikker. Potensiatorene som ble identifisert fra de optiske assayene, frembrakte en doseavhengig økning i $I_{\Delta F508}$ med lignende potens og effekt observert i de optiske assayene. I alle de undersøkte cellene var reverseringspotensialet før og under potensiatoranvendelsen ca. -30 mV, hvilket er det beregnede E_{Cl} (-28 mV).

Cellekultur

NIH3T3-fibroblaster fra mus som stabilt uttrykker $\Delta F508$ -CFTR, anvendes til fullcelleregistreringer. Cellene holdes ved 37 °C i 5 % CO₂ og 90 % fuktighet i Dulbeccos modifiserte Eagle-medium supplert med 2 mM glutamin, 10 % bovint fosterserum, 1 x NEAA, β -ME, 1 x pen/strep og 25 mM HEPES i 175 cm² kulturflasker. For helcelleregistreringer ble 2500–5000 celler utsådd på poly-Lysin-overtrukne dekkglass og dyrket i 24–48 timer ved 27 °C før anvendelse for å teste potensiatorenes aktivitet, og inkubert med eller uten korreksjonsforbindelsen ved 37 °C for å måle korrektorenes aktivitet.

3. Enkeltkanalregistreringer

wt-CFTR-gatingaktivitet og temperaturkorrigert $\Delta F508$ -CFTR uttrykt i NIH3T3-celler ble observert ved hjelp av eksidert inn/ut-membranpatch-registreringer som tidligere beskrevet (Dalemans, W., Barbry, P., Champigny, G., Jallat, S., Dott, K., Dreyer, D., Crystal, R.G., Pavirani, A., Lecocq, J-P., Lazdunski, M. (1991) Nature 354, 526–528) ved hjelp av en Axopatch 200B patch-klemme-forsterker (Axon Instruments Inc.). Pipetten inneholdt (i mM): 150 NMDG, 150 asparginsyre, 5 CaCl₂, 2 MgCl₂ og 10 HEPES (pH justert til 7,35 med Tris-base). Badet inneholdt (i mM): 150 NMDG-Cl, 2 MgCl₂, 5 EGTA, 10 TES og 14 Tris-base (pH justert til 7,35 med HCl). Etter eksisjon ble både wt- og $\Delta F508$ -CFTR aktivert ved tilsetning av 1 mM Mg-ATP, 75 nM av den katalytiske underenheten av cAMP-avhengig proteinkinase (PKA, Promega Corp. Madison, WI) og 10 mM NaF for å inhibere proteinfosfataser, hvilket forhindret strøminaktivering. Pipettens potensial ble opprettholdt ved 80 mV. Kanalaktivitet ble analysert fra membranpatcher inneholdende ≤ 2 aktive kanaler. Det høyeste antallet av samtidige åpninger bestemte antallet av aktive kanaler i løpet av et forsøk. For å bestemme enkeltkanal-strømamplituden ble dataene som ble registrert fra 120 sekunder med $\Delta F508$ -CFTR-aktivitet, filtrert "offline" ved 100 Hz og deretter anvendt til å konstruere amplitudehistogrammer for alle punkter som var utstyrt med multigaussiske funksjoner ved hjelp av Bio-Patch Analysis-programvaren (Bio-Logic Comp. Frankrike). Den samlede mikroskopiske strømmen og åpne sannsynligheten (P_o) ble bestemt fra 120 sekunders kanalaktivitet. P_o ble bestemt ved hjelp av Bio-Patch-programvaren eller fra forholdet $P_o = I/i(N)$, hvor

I = gjennomsnittlig strøm, i = enkeltkanal-strømamplitude og N = antall aktive kanaler i patchen.

Cellekultur

5

NIH3T3-fibroblaster fra mus som stabilt uttrykker $\Delta F508$ -CFTR, anvendes til eksidert membranpatch-klemme-registreringer. Cellene holdes ved 37 °C i 5 % CO₂ og 90 % fuktighet i Dulbeccos modifiserte Eagle-medium supplert med 2 mM glutamin, 10 % bovint fosterserum, 1 x NEAA, β -ME, 1 x pen/strep og 25 mM HEPES i 175 cm² kulturflasker. For enkle kanalregistreringer ble 2500–5000 celler utsådd på poly-L-lysin-overtrukne dekkglass og dyrket i 24–48 timer ved 27 °C før anvendelse.

10

Forbindelsene i tabell 1 viste seg å fremvise korreksjonsaktivitet som målt i assayet beskrevet ovenfor.

15

Forbindelsene ifølge oppfinnelsen er nyttige som modulator for ATP-bindingskassett-transportører. Ved hjelp av prosedyrene beskrevet ovenfor er aktivitetene, dvs. EC50s, til forbindelsen ifølge den foreliggende oppfinnelsen og til eksempelforbindelser med formelen I, målt og vist i tabell 6.

20

Tabell 6.

IC50-/EC50 Bins: +++ <= 2,0 < ++ <= 5,0 < +		
Prosentaktivitets-bins: + <= 25,0 < ++ <= 100,0 < +++		
Smnst. nr.	BinnedEC50	Binned maks. virkning
1	+	++
2	+	+++
3	+++	+++
4	+	+++
5	+++	+++
6	+	++
7	+++	+++
8	++	++

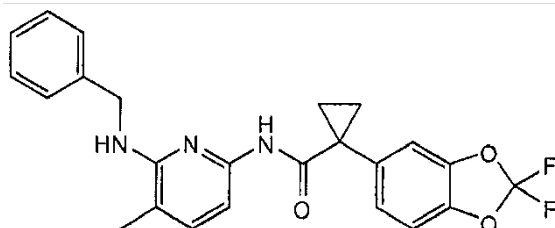
9	++	+++
10	++	++
11	++	+++
12	+	++
13	++	++
14	++	+++
15	++	++
16	+++	+++
17	++	++
18	+++	++
19	+	++
20	++	+++
21	+	+++
22	+++	++
23	+++	+++
24	+++	+++
25	+	++
26	++	+++
27	++	+++
28	+	+++
29	++	+++
30	+	++
31	++	++
32	+++	+++
33	++	+++
34	++	++
35	+++	+++

36	+++	+++
37	++	+++
38	+	++
39	+++	++
40	++	+++
41	+	++
42	+	+++
43	+	++
44	+	+++
45	++	+++
46	++	+++
47	+	+++
48	+	++
49	+++	+++
50	++	++
51	+++	+++
52	+++	+++
53	++	+++
54	+	++
55	++	+++
56	+	+++
57	++	+++
58	++	+++
59	+++	+++
60	+++	+++
61	+	++
62	++	+++

63	+++	+++
64	+++	++
65	+	++
66	++	+++
67	++	+++
68	++	+++
69	+	+++
70	++	+++
71	+++	++
72	+	+++
73	+++	+++
74	+++	+++
75	+	++
76	+	+++
77	+	++
78	+++	+++

P a t e n t k r a v

1. Forbindelsen:



eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav.

2. Farmasøytisk sammensetning omfattende

(i) forbindelsen ifølge krav 1; og

(ii) en farmasøytisk akseptabel bærer.

3. Sammensetningen ifølge krav 2, ytterligere omfattende enda et middel valgt fra gruppen bestående av et slimløsende middel, en bronkodilatator, et antibiotikum, et antiinfeksiøst middel, et antiinflammatorisk middel, en CFTR-korrektor og et næringsmiddel.

4. Fremgangsmåte for å modulere, in vitro, ABC-transportører i en membran av en celle, omfattende trinnet med å opprette kontakt mellom cellen og en forbindelse ifølge krav 1.

5. Fremgangsmåten ifølge krav 4, hvori ABC-transportøren er CFTR.

6. Forbindelsen ifølge krav 1, eller sammensetningen ifølge krav 2 eller 3, for anvendelse i behandling av en tilstand, sykdom eller lidelse hos en pasient som er implisert av ABC-transportøraktivitet, hvori tilstanden, sykdommen eller lidelsen er valgt fra cystisk fibrose, arvelig emfysem, arvelig hemokromatose, koagulering-fibrinolyse-mangler, protein C-mangel, arvelig angioødem type 1, lipidprosesseringsmangler, familiær hyperkolesterolemi, kylomikronemi type 1, a-beta-lipoproteinemi, lysosomale lagringssykdommer, I-cellesykdom/pseudo-Hurler, mukopolysakkaridoser, Sandhof/Tay-Sachs, Crigler-Najjar type II,

polyendokrinopati/hyperinsulemi, diabetes mellitus, Laron-dvergvekst, myeloperoksidasemangel, primær hypoparatyreoidisme, melanom, glykanose CDG type 1, arvelig emfysem, medfødt hypertyreoidisme, osteogenesis imperfecta, arvelig hypofibrinogenemi, ACT-mangel, diabetes insipidus (DI),
 5 nevrohypofyseal DI, nefrogen DI, Charcot-Marie-Tooths syndrom, Pelizaeus-Merzbachers sykdom, Alzheimers sykdom, Parkinsons sykdom, amyotrofisk lateralsklerose, progressiv supranukleær parese, Picks sykdom, Huntingtons, spinocerebellar ataksi type I, spinal og bulbær muskelatrofi, dentatorubral-pallidoluysian atrofi, dystrophia myotonica, spongiforme encefalopatier, arvelig
 10 Creutzfeldt-Jakobs sykdom, Fabrys sykdom, Gerstmann-Sträussler-Scheinkers syndrom, KOLS, keratoconjunctivitis sicca og Sjögrens sykdom.

7. Forbindelsen eller sammensetningen for anvendelse ifølge krav 6, hvori ABC-transportøren er CFTR.

8. Kit til anvendelse ved måling av aktiviteten av en ABC-transportør eller et fragment derav i en biologisk prøve, *in vitro* eller *in vivo*, omfattende:

(i) en sammensetning omfattende en forbindelse ifølge krav 1; og

(ii) instruksjoner for å:

a) opprette kontakt mellom sammensetningen og den biologiske prøven;

b) måle aktivitet av ABC-transportøren eller et fragment derav.