



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2349263 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.
A61K 31/439 (2006.01)
C07D 453/04 (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2014.09.29
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2014.04.23
(86)	Europeisk søknadsnr	09822784.6
(86)	Europeisk innleveringsdag	2009.10.23
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2011.08.03
(30)	Prioritet	2008.10.23, US, 107830 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 SM TR
	Utpekte samarbeidende stater	AL BA RS
(73)	Innehaver	Vertex Pharmaceuticals Incorporated, 50 Northern Avenue, Boston, MA 02210, USA
(72)	Oppfinner	BINCH, Hayley, 1406 Flair Encinitas Drive, Encinitas, CA 92024, USA FANNING, Lev, T., D., 115 Dole Way, San Marcos, CA 92078, USA HURLEY, Dennis, 1513 Black Walnut Drive, San Marcos, CA 92078, USA SHETH, Urvi, 9316 Babauta Road 71, San Diego, CA 92129, USA SILINA, Alina, 7160 Shoreline Drive 4308, San Diego, CA 92122, USA YANG, Xiaoqing, 4526 Vereda Mar De Ponderosa, San Diego, CA 92130, USA BOTFIELD, Martyn, 47 Walden Terrace, Concord, MA 01742, USA GROOTENHUIS, Peter, D.J., 4801 Riding Ridge Road, San Diego, CA 92130, USA VAN GOOR, Fredrick, 832 Ormond Court, San Diego, CA 92109, USA NUMA, Mehdi, Michel Djamel, 3106 Jemez Drive, San Diego, CA 92117, USA
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	MODULATORER AV TRANSMEMBRANKONDUKTANS-REGULATOR FOR CYSTISK FIBROSE
(56)	Anførte publikasjoner	WO-A2-2006/002421

MODULATORER AV TRANSMEMBRANKONDUKTANS-REGULATOR FOR CYSTISK FIBROSE

OPPFINNELSENS TEKNISKE OMRÅDE

5

Oppfinnelsen i dette dokumentet er relatert til modulatorer av transmembrankonduktans-regulator for cystisk fibrose («CFTR»), sammensetninger derav og fremgangsmåter dertil. Oppfinnelsen i dette dokumentet er også relatert til behandling av sykdommer ved bruk av CFTR-modulatorer.

10

BAKGRUNN FOR OPPFINNELSEN

15

ATP-kassettransportører er en familie av membrantransportørproteiner som regulerer transporten av mange forskjellige farmakologiske midler, potensielt toksiske legemidler, xenobiotika, samt anioner. De er homologe membranproteiner som binder og anvender cellulært adenosintrifosfat (ATP) for sine spesifikke aktiviteter. Noen av disse transportørene ble oppdaget som multilegemiddelresistente proteiner (som MDR1-P-glykoproteinet eller det multilegemiddelresistente proteinet MRP1) som forsvarer ondartede cancerceller mot kjemoterapeutiske midler. Foreløpig er 48 slike transportører identifisert og gruppert i 7 familier basert på deres sekvensidentitet og funksjon.

20

25

Et medlem av ATP-kassettransportørfamilien som ofte assosieres med sykdom, er den cAMP/ATP-medierte anionekanal CFTR. CFTR uttrykkes i forskjellige celletyper, herunder absorberende og sekretoriske epitelceller, hvor den regulerer anionefluks over membranen og aktiviteten av andre ionekanaler og proteiner. I epitelceller er normal CFTR-funksjon avgjørende for opprettholdelse av elektrolyttransport gjennom hele kroppen, herunder lunge- og fordøyelsesvev. CFTR er sammensatt av ca. 1480 aminosyrer som koder for et protein bestående av en tandemrepetisjon av transmembrandomener, hvor hvert inneholder seks transmembranhelikser og et nukleotidbindingsdomene. De to transmembrandomenene er bundet av et stort, polart, regulerende (R)-domene med flere fosforyleringssteder som regulerer kanalaktivitet og cellulær trafikk.

30

35

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, hvilket resulterer i cystisk fibrose («CF»), den vanligste dødelige genetiske sykdommen hos mennesker. Cystisk fibrose rammer ca. 1 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 som uttrykkes endogent i lungeepitler, til redusert apikal anioneseekresjon, hvilket forårsaker en ubalanse i ione- og fluidtransport. Den resulterende reduksjonen i anionetransport bidrar til økt slimakkumulering i lungene 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 infertile, og fertiliteten reduseres blant kvinner med cystisk fibrose. I motsetning til de alvorlige effektene av 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 for 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 mer enn 1000 sykdommer som forårsaker mutasjoner i CF-genet (<http://www.genet.sickkids.on.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 oppstår i ca. 70 prosent av tilfellene med cystisk fibrose og er forbundet 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 ER, og trafikk 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. Sammen fører det reduserte antallet kanaler i

membranen og den defekte gatingen til redusert anionetransport over 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, men færre enn villtype CFTR. (Dolmans *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 R117H-CFTR og G551D-CFTR, kan andre sykdommer som forårsaker mutasjoner i CFTR som resulterer i defekt trafikk, syntese og/eller kanal gating, opp- eller nedreguleres til å endre anionesekresjon og modifisere sykdomsprogresjon og/eller alvorlighetsgrad.

Selv om CFTR transporterer forskjellige molekyler i tillegg til anioner, er det klart at denne rollen (transporten av anioner, klorid og bikarbonat) representerer et element i en viktig mekanisme for transport av ioner og vann over epitelet. De andre elementene inkluderer den epitele Na^+ -kanalen, ENaC, $\text{Na}^+/\text{2Cl}^-\text{K}^+$ co-transporter, Na^+/K^+ -ATPase-pumpen og de basolaterale K^+ -membrankanale, som er ansvarlige for opptaket av klorid i cellen.

Disse elementene samarbeider om å oppnå retningsavhengig transport gjennom epitelet via sin selektive ekspresjon og lokalisering innenfor cellen. Kloridabsorpsjon finner sted ved hjelp av den samordnede aktiviteten til ENaC og CFTR på apikalmembranen og Na^+/K^+ -ATPase-pumpen og Cl-kanalene uttrykt på cellens basolaterale overflate. Sekundær aktiv transport av klorid fra den luminalen siden fører til akkumulering av intracellulært klorid, som deretter passivt kan forlate cellen via Cl^- -ionekanalene, hvilket resulterer i en vektorieell transport. Arrangement av $\text{Na}^+/\text{2Cl}^-\text{K}^+$ co-transporter, Na^+/K^+ -ATPase-pumpe og de basolaterale K^+ -membrankanale på den basolaterale overflaten og CFTR på luminalen siden koordinerer sekresjonen av klorid via CFTR på luminalen siden. Fordi vann sannsynligvis aldri aktivt transporteres selv, avhenger dets strømming over epitler av små transepiteliale osmotiske gradienter generert av bulkstrømningen av natrium og klorid.

Defekt bikarbonattransport på grunn av mutasjoner i CFTR antas å forårsake defekter i visse sekretoriske funksjoner. Se f.eks., «Cystic fibrosis: impaired bicarbonate secretion and mucoviscidosis,» Paul M. Quinton, Lancet 2008; 372: 415-417.

Mutasjoner i CFTR som er forbundet med moderat CFTR-dysfunksjon er også tydelig i pasienter med tilstander som deler visse sykdomsmanifestasjoner med CF, men ikke møter de diagnostiske kriteriene for CF. Disse inkluderer medfødt bilateralt fravær av vas deferens, idiopatisk kronisk pankreatitt, kronisk bronkitt og kronisk rhinosinusitt. Andre sykdommer hvor mutant-CFTR antas å være en risikofaktor sammen med modifikatorgener eller miljøfaktorer, inkluderer primær skleroserende kolangitt, allergisk bronkopulmonal aspergillose og astma.

Sigarettrøyk, hypoksi og miljøfaktorer som induserer hypoksisk signalering, har også vært påvist å svekke CFTR-funksjonen og kan bidra til visse former for lungesykdom, slik som kronisk bronkitt. Sykdommer som kan skyldes defekt CFTR-funksjon, men som ikke oppfyller de diagnostiske kriteriene for CF, karakteriseres som CFTR-relaterte sykdommer.

I tillegg til cystisk fibrose kan modulering av CFTR-aktivitet være fordelaktig for andre sykdommer som ikke direkte er forårsaket av mutasjoner i CFTR, slik som sekretoriske sykdommer og andre proteinoppløsnings sykdommer mediert av CFTR. CFTR regulerer klorid- og bikarbonatfluksen over mange cellers epitler, for å regulere fluidbevegelse, proteinoppløsning, slimviskositet og enzymaktivitet. Defekter i CFTR kan forårsake blokkering av luftveiene eller kanalene i mange organer, herunder leveren og bukspyttkjertelen. Potensiatorer er forbindelser som forbedrer gatingaktiviteten til CFTR i cellemembranen. En hvilken som helst sykdom som involverer fortykning av slimhinnen, svekket fluidregulering, svekket slimklarering eller blokkerte kanaler som fører til inflammasjon og vevsdestruksjon, kan være en kandidat for forsterkere.

Disse inkluderer, men er ikke begrenset til kronisk obstruktiv lungesykdom (KOLS), astma, røykindusert KOLS, kronisk bronkitt, rhinosinusitt, forstoppelse, keratoconjunctivitis sicca og Sjögrens syndrom, gastro-øsofageal reflukssykdom, gallestein, rektal prolaps og inflammatorisk tarmsykdom. KOLS er karakterisert ved en luftveisbegrensning som er progressiv og ikke fullt ut reversibel. Luftveisbegrensningen skyldes hypersekresjon av slim, emfysem og bronkiolitt. Aktivatorer av mutant- eller villtype-CFTR tilbyr en potensiell behandling av slimhypersekresjon og svekket slimklarering, som er alminnelig ved KOLS. Økning i anioneseekretsjon over CFTR kan spesielt lette fluidtransport til luftveisoverflatevæsken for å fukte slimhinnen og optimalisert perisiliær fluidviskositet. Dette vil føre til forbedret slimklarering og en reduksjon i

symptomene assosiert med KOLS. Ved å forhindre stadig infeksjon og inflammasjon på grunn av forbedret luftveisklarering, kan CFTR-modulatorer i tillegg forebygge eller bremse den parenkyme destruksjonen av luftveiene som karakteriserer emfysem, og redusere eller reversere økningen i slimsektretorisk celleantall og -størrelse som ligger bak hypersekresjon av slim ved luftveissykdommer. 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, legemidler, kjemiske/termiske forbrenninger og 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 forbedre de assosierte symptomene. Personer med cystisk fibrose har tilbakevendende episoder med intestinal obstruksjon og høyere insidens av rektal prolaps, gallestein, gastro-øsofageal reflukssykdom, GI-ondartetheter og inflammatorisk tarmsykdom, hvilket indikerer at CFTR-funksjon kan spille en viktig rolle for å forebygge slike sykdommer.

Som drøftet 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 trafikk til plasmamembranen. Følgelig er ikke tilstrekkelige mengder av det modne proteinet til stede ved plasmamembranen, og kloridtransport innenfor epitellev reduseres vesentlig. Dette cellulære fenomenet med ER-maskineriets defekte ER-prosessering av CFTR, har faktisk blitt påvist å være den bakenforliggende årsaken ikke bare til CF-sykdom, men til et bredt felt av andre isolerte og arvelige sykdommer. De to måtene ER-maskineriet kan svikte på, er enten ved tap av binding til ER-eksport av proteinene, hvilket fører til degradasjon, eller ved ER-akkumulering av disse

defekte/misfoldede proteinene [Aridor M, *et al.*, *Nature Med.*, 5(7), s. 745–751 (1999), Shastry, 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 forbundet 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, koagulerings-fibrinolyse-mangler slik som protein C-mangel, arvelig angioødem type 1, lipidprosesseringsmangler slik som familiær hyperkolesterolemi, kylomikronemi type 1, abetalipoproteinemi, 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-sialyltransferase), polyendokrinopati/hyperinsulemi, diabetes mellitus (på grunn av insulinreseptor), Laron-dvergvekst (på grunn av veksthormonreseptor), myeloperoxidasemangel, primær hypoparathyroidisme (på grunn av preproparathyroidhormon), melanom (på grunn av tyrosinase). Sykdommene forbundet 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 nevrologiske polyglutaminlidelser slik som Huntingtons, spinocerebellar ataksi type I, spinal og bulbær muskelatrofi, dentatorubral-pallidolusyan, 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 (på grunn av prionproteinprosesseringsdefekt), infertilitet, pankreatitt, pankreatisk insuffisiens, osteoporese, osteopeni, Gorhams syndrom, kloridkanalsykdommer, myotonia congenita (Thomson og Becker-former), Bartters syndrom type II, Dents sykdom, hyperekplasi, lysosom lagringssykdom, Angelmans syndrom, primær

ciliær dyskinesi (PCD), PCD med situs inversus (også kjent som Kartagener-syndrom), PCD uten situs inversus og ciliær aplasi og leversykdom.

Andre sykdommer som impliseres av en mutasjon i CFTR, inkluderer sterilitet hos menn forårsaket av medfødt bilateralt fravær av vas deferens (CBAVD), mild lungesykdom, idiopatisk pankreatitt og allergisk bronkopulmonal aspergillose (ABPA). Se, «CFTR-opathies: disease phenotypes associated with cystic fibrosis transmembrane regulator gene mutations,» Peadar G. Noone and Michael R. Knowles, Respir. Res. 2001, 2: 328-332.

10

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

15

Selv om det er atskillige årsaker til diaré, er de største konsekvensene av diaré sykdommer som skyldes for stor kloridtransport, felles for alle og inkluderer dehydrering, acidose, redusert 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.

20

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.

25

Det er følgelig et behov for potente og selektive CFTR-potensiatorer av villtype- og mutantformer av human CFTR. Disse mutant-CFTR-formene inkluderer blant annet $\Delta F508$ del, G551D, R117H, 2789+5G->A.

30

Det er også et behov for modulatorer av CFTR-aktivitet, og sammensetninger derav, som kan anvendes til å modulere CFTR-aktiviteten i cellemembranen hos et pattedyr.

35

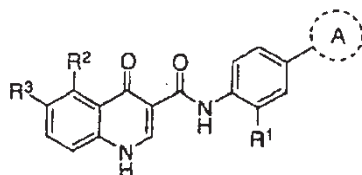
Det er et behov for fremgangsmåter for behandling av sykdommer forårsaket av mutasjon i CFTR ved hjelp av slike modulatorer av CFTR-aktivitet.

Det er et behov for fremgangsmåter for modulering av CFTR-aktivitet i en cellemembran ex vivo hos et pattedyr.

WO 2006/002421 A2 relaterer til N-fenylhydroksychinolingkarboksamider og deres medisinske anvendelse i behandling av inflammatoriske og pulmonære sykdommer.

SAMMENDRAG AV OPPFINNELSEN

Det har nå blitt funnet at forbindelser ifølge denne oppfinnelsen, og farmasøytisk akseptable sammensetninger derav, er nyttige som modulatorer av CFTR-aktivitet. Forbindelsene har den generelle formelen (I):



eller farmasøytisk akseptable salter derav, hvor R^1 , R^2 , R^3 og A beskrives generelt og i klasser og underklasser nedenfor.

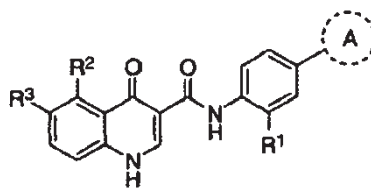
Disse forbindelsene og farmasøytisk akseptable sammensetninger, er nyttig i behandling eller reduksjon av alvorlighetsgrad for en rekke sykdommer eller tilstander forbundet med mutasjoner i CFTR.

DETALJERT BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN

Generell beskrivelse av forbindelsene ifølge oppfinnelsen:

Oppfinnelsen i dette dokumentet er relatert til forbindelser av formel (I), nyttige som modulatorer av CFTR-aktivitet.

9

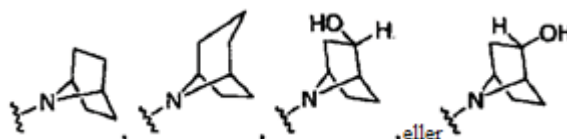


(I);

eller farmasøytisk akseptable salter derav, der:

ring A velges fra:

5



R^1 er $-\text{CF}_3$, $-\text{CN}$ eller $-\text{C}\equiv\text{CCH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$;

R^2 er hydrogen, $-\text{CH}_3$, $-\text{CF}_3$, $-\text{OH}$ eller $-\text{CH}_2\text{OH}$;

10

R^3 er hydrogen, $-\text{CH}_3$, $-\text{OCH}_3$ eller $-\text{CN}$;

gitt at både R^2 og R^3 ikke samtidig er hydrogen.

Forbindelser og definisjoner:

15

Forbindelser ifølge denne oppfinnelsen inkluderer de som er beskrevet generelt ovenfor og illustreres ytterligere av klassene, underklassene og artene beskrevet i dette dokumentet. Som anvendt i dette dokumentet, skal følgende definisjoner gjelde med mindre annet er angitt.

20

Betegnelsen «ABC-transportør» betyr som anvendt i dette dokumentet, 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» betyr som anvendt heri et domene på ABC-transportøren som kan binde til en modulator. Se f.eks. Hwang, T. C. *et al.*, J. Gen. Physiol. (1998): 111(3),477-90.

25

Betegnelsen «CFTR» betyr som anvendt i dette dokumentet, transmembran konduktansregulator for cystisk fibrose eller en mutasjon derav i stand til å regulere aktivitet, herunder blant annet ΔF508 CFTR, R117H CFTR og G551D CFTR. (se f.eks. <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>, for CFTR-mutasjoner).

30

Betegnelsen «modulering» betyr som anvendt i dette dokumentet, økning eller reduksjon med en målbar mengde.

5 Betegnelsen «normal CFTR» eller «normal CFTR-funksjon» betyr som anvendt i dette dokumentet villtypeaktig CFTR uten svekkelse på grunn av miljøfaktorer, slik som røyking, forurensning eller noe som gir inflammasjon i lungene.

10 Betegnelsen «reduert CFTR» eller «reduert CFTR-funksjon» betyr som anvendt i dette dokumentet, mindre enn normal CFTR eller mindre enn normal CFTR-funksjon.

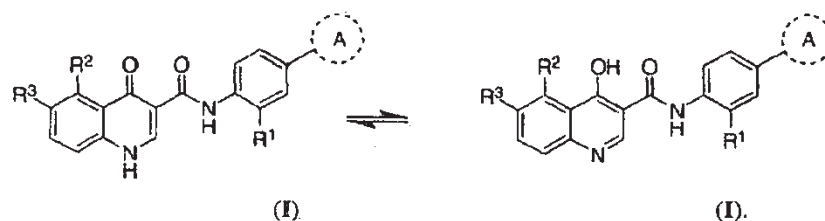
15 For denne oppfinnelsens formål identifiseres de kjemiske elementene i henhold til den periodiske tabellen over elementer, CAS-versjonen, Handbook of Chemistry and Physics, 75. utg. Generelle prinsipper i organisk kjemi beskrives videre i «Organic Chemistry», Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito: 1999 og «March's Advanced Organic Chemistry». 5. utg. Red.: Smith, M.B. and March, J., John Wiley & Sons, New York: 2001.

20 Kombinasjoner av substituenten som man tenker seg i denne oppfinnelsen, er fortrinnsvis de som resulterer i dannelsen av stabile eller kjemisk mulige forbindelser. Betegnelsen «stabil» som anvendt i dette dokumentet, viser til forbindelser som i det vesentlige ikke endres når de utsettes for forhold som muliggjør deres produksjon, detektering og fortrinnsvis deres gjenvinning, rensing og anvendelse til ett eller flere av formålene som beskrives i dette dokumentet. I
25 noen utførelsesformer er en stabil forbindelse eller en kjemisk mulig forbindelse en som ikke i det vesentlige endres når den holdes ved en temperatur på 40 °C eller mindre, i fravær av fukt eller andre kjemisk reaktive betingelser, i minst en uke.

30 Betegnelsen «beskyttelsesgruppe», som anvendt i dette dokumentet, viser til et middel anvendt til midlertidig blokkering av ett eller flere ønskede reaktive steder i en multifunksjonell forbindelse. I visse utførelsesformer har en beskyttelsesgruppe ett eller flere, eller fortrinnsvis alle, de følgende egenskapene: a) reagerer selektivt i god avkastning for å gi et beskyttende substratum som er stabilt mot reaksjonene som oppstår ved ett eller flere av de andre reaktive stedene; og b) er selektivt
35 fjernbar i god avkastning av reagensmidler som ikke angriper den genererte funksjonelle gruppen. Det redegjøres for eksemplariske beskyttelsesgrupper i

Greene, T.W., Wuts, P. G i «Protective Groups in Organic Synthesis», tredje utg., John Wiley & Sons, New York: 1999 og andre utgaver av denne boken.

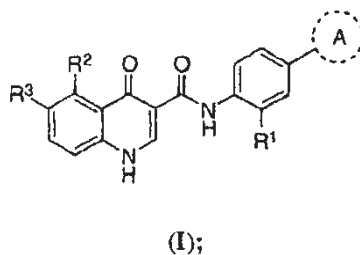
Med mindre annet er angitt, er strukturer angitt i dette dokumentet også ment å inkludere alle isomere (f.eks. enantiomere, diastereomere og geometriske (eller konformasjonelle)) former av strukturen, f.eks. R- og S-konfigurasjonene for hvert asymmetriske senter, (Z) og (E) dobbeltbindingsisomerer og (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 annet er oppgitt, er alle tautomere former av forbindelsene i oppfinnelsen innenfor omfanget av oppfinnelsen; f.eks. forbindelser av formel (I) kan forekomme som tautomerer:



Med mindre annet er angitt, er strukturer angitt i dette dokumentet i tillegg også ment å inkludere forbindelser som er forskjellige bare i nærvær av ett eller flere isotopisk anrikede atomer. 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 -anriket karbon, er f.eks. innenfor denne oppfinnelsens omfang. Slike forbindelser er nyttige for eksempel som analytiske verktøy eller prober i biologiske assayer. Slike forbindelser, særlig forbindelser som inneholder deuteriumatomer, kan vise modifiserte metabolismeegenskaper.

Beskrivelse av eksempler på forbindelser:

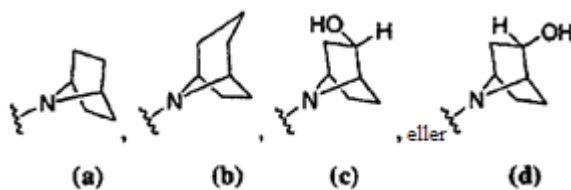
Oppfinnelsen i dette dokumentet tilveiebringer en forbindelse av formel (I):



12

eller farmasøytisk akseptable salter derav, der:

ring A velges fra:



5

R^1 er $-\text{CF}_3$, $-\text{CN}$ eller $-\text{C}\equiv\text{CCH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$;

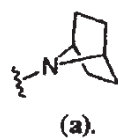
R^2 er hydrogen, $-\text{CH}_3$, $-\text{CF}_3$, $-\text{OH}$ eller $-\text{CH}_2\text{OH}$;

R^3 er hydrogen, $-\text{CH}_3$, $-\text{OCH}_3$ eller $-\text{CN}$;

gitt at både R^2 og R^3 ikke samtidig er hydrogen.

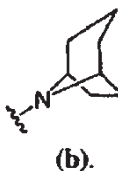
10

I én utførelsesform er ring A



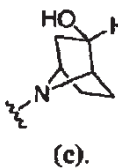
15

I én utførelsesform er ring A

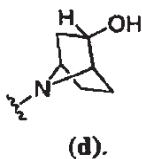


I en annen utførelsesform er ring A

20



I enda en annen utførelsesform er ring A



25

I én utførelsesform er R^1 -CF₃.

I en annen utførelsesform er R^1 -CN.

5 I en annen utførelsesform er R^1 -C≡CCH₂N(CH₃)₂.

I én utførelsesform er R^2 -CH₃.

I en annen utførelsesform er R^2 -CF₃.

10

I en annen utførelsesform er R^2 -OH.

I en annen utførelsesform er R^2 -CH₂OH.

15 I én utførelsesform er R^3 -CH₃.

I én utførelsesform er R^3 -OCH₃.

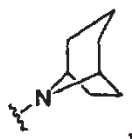
I en annen utførelsesform er R^3 -CN.

20

I én utførelsesform er R^2 hydrogen; og R^3 er -CH₃, -OCH₃ eller -CN.

I en annen utførelsesform er R^2 -CH₃, -CF₃, -OH eller -CH₂OH; og R^3 er hydrogen.

25 I flere utførelsesformer av oppfinnelsen i dette dokumentet, er ring A

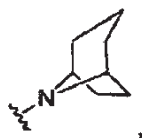


30

R^1 er -CF₃, R^2 er hydrogen; og R^3 er -CH₃, -OCH₃ eller -CN. I andre utførelsesformer er R^1 -CN. I enda andre utførelsesformer er R^1 -C≡CCH₂N(CH₃)₂. I én utførelsesform er R^3 -CH₃. Eller R^3 er -OCH₃. Eller R^3 er -CN.

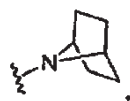
I videre utførelsesformer av oppfinnelsen i dette dokumentet, er ring A

14



5 R^1 er $-\text{CF}_3$, R^2 er $-\text{CH}_3$, $-\text{CF}_3$, $-\text{OH}$ eller $-\text{CH}_2\text{OH}$ og R^3 er hydrogen. I andre utførelsesformer er R^1 $-\text{CN}$. I enda andre utførelsesformer er R^1 $-\text{C}\equiv\text{CCH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$. I én utførelsesform er R^2 $-\text{CH}_3$. Eller R^2 er $-\text{CF}_3$. Eller R^2 er $-\text{OH}$. Eller R^2 er $-\text{CH}_2\text{OH}$.

I flere utførelsesformer av oppfinnelsen i dette dokumentet, er ring A



10

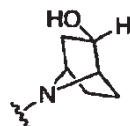
R^1 er $-\text{CF}_3$, R^2 er hydrogen; og R^3 er $-\text{CH}_3$, $-\text{OCH}_3$ eller $-\text{CN}$. I andre utførelsesformer er R^1 $-\text{CN}$. I enda andre utførelsesformer er R^1 $-\text{C}\equiv\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$. I én utførelsesform er R^3 $-\text{OCH}_3$. Eller R^3 er $-\text{CH}_3$. Eller R^3 er $-\text{CN}$.

15 I videre utførelsesformer av oppfinnelsen i dette dokumentet, er ring A



20 R^1 er $-\text{CF}_3$, R^2 er $-\text{CH}_3$, $-\text{CF}_3$, $-\text{OH}$ eller $-\text{CH}_2\text{OH}$ og R^3 er hydrogen. I andre utførelsesformer er R^1 $-\text{CN}$. I enda andre utførelsesformer er R^1 $-\text{C}\equiv\text{CCH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$. I én utførelsesform er R^2 $-\text{CH}_3$. Eller R^2 er $-\text{CF}_3$. Eller R^2 er $-\text{OH}$. Eller R^2 er $-\text{CH}_2\text{OH}$.

I flere utførelsesformer av oppfinnelsen i dette dokumentet, er ring A



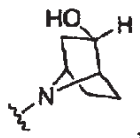
25

R^1 er $-\text{CF}_3$, R^2 er hydrogen; og R^3 er $-\text{CH}_3$, $-\text{OCH}_3$ eller $-\text{CN}$. I andre utførelsesformer er R^1 $-\text{CN}$. I enda andre utførelsesformer er R^1 $-\text{C}\equiv\text{CCH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$. I én utførelsesform er R^3 $-\text{CH}_3$. Eller R^3 er $-\text{OCH}_3$. Eller R^3 er $-\text{CN}$.

30

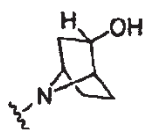
I videre utførelsesformer av oppfinnelsen i dette dokumentet, er ring A

15



5 R^1 er $-\text{CF}_3$, R^2 er $-\text{CH}_3$, $-\text{CF}_3$, $-\text{OH}$ eller $-\text{CH}_2\text{OH}$ og R^3 er hydrogen. I andre utførelsesformer er R^1 $-\text{CN}$. I enda andre utførelsesformer er R^1 $-\text{C}\equiv\text{CCH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$. I én utførelsesform er R^2 $-\text{CH}_3$. Eller R^2 er $-\text{CF}_3$. Eller R^2 er $-\text{OH}$. Eller R^2 er $-\text{CH}_2\text{OH}$.

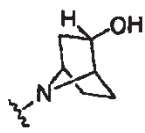
I flere utførelsesformer av oppfinnelsen i dette dokumentet, er ring A



10

R^1 er $-\text{CF}_3$, R^2 er hydrogen; og R^3 er $-\text{CH}_3$, $-\text{OCH}_3$ eller $-\text{CN}$. I andre utførelsesformer er R^1 $-\text{CN}$. I enda andre utførelsesformer er R^1 $-\text{C}\equiv\text{CCH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$. I én utførelsesform er R^3 $-\text{CH}_3$. Eller R^3 er $-\text{OCH}_3$. Eller R^3 er $-\text{CN}$.

15 I videre utførelsesformer av oppfinnelsen i dette dokumentet, er ring A



20 R^1 er $-\text{CF}_3$, R^2 er $-\text{CH}_3$, $-\text{CF}_3$, $-\text{OH}$ eller $-\text{CH}_2\text{OH}$ og R^3 er hydrogen. I andre utførelsesformer er R^1 $-\text{CN}$. I enda andre utførelsesformer er R^1 $-\text{C}\equiv\text{CCH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$. I én utførelsesform er R^2 $-\text{CH}_3$. Eller R^2 er $-\text{CF}_3$. Eller R^2 er $-\text{OH}$. Eller R^2 er $-\text{CH}_2\text{OH}$.

Representative forbindelser ifølge oppfinnelsen i dette dokumentet er angitt nedenfor i tabell 1 nedenfor.

25

Tabell 1

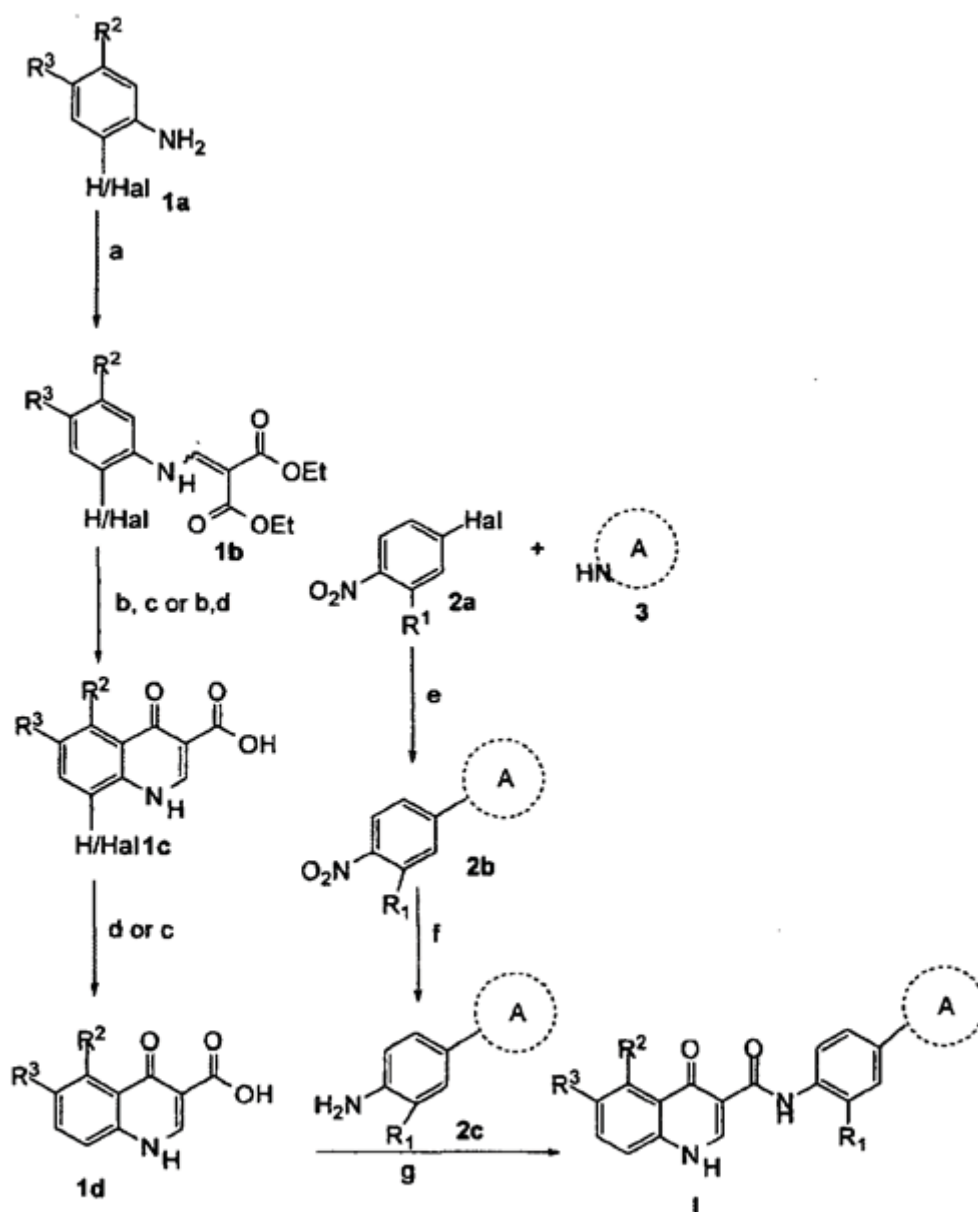
1	2	3

16

4	5	6
7	8	9
10	11	12
13	14	

Generelle syntetiske skjemaer

Forbindelser av oppfinnelsen i dette dokumentet lar seg enkelt tilberede ved fremgangsmåter kjent i faget, og som beskrevet i skjema 1-3.

Skjema 1. Fremstilling av forbindelser med formelen (I)

a) $(CO_2R_2)CH=CH(OR)$, toluene, varme; b) Dowhterm eller difenyleter, reflux, N_2 -atmosfære; c) Fjerning av blokkerende halogruppe dersom det finnes (f.eks. $-Cl$), Pd/C , H_2 , E_tOH ; d) Fjerning av beskyttelsesgruppen R ved base eller syre; e) CH_3CH , $E_{t3}N$, varme; f) Pd/C , H_2 , E_tOH ; g) HATU, $E_{t3}N$, DMF eller propylfosfonsyre syklisk vannfri (T3P[®]), pyridine, 2-metyltetrahydrofuran.

Skjema 1 beskriver en sammenfallende tilnærming til tilberedelsen av forbindelser av formel (I) fra substituerte benzenderivater **1a** og **2a**. I den endelige transformasjonen kan amidformulering via kopling av karboksylsyre **1d** med amin **2c** for å gi en forbindelse av formel (I) oppnås ved anvendelse enten av O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetrametylurioniumheksafluorofosfat (HATU) og trietylamin i N,N-dimetylformamid (DMF) eller propylsulfronsyre, syklisk vannfri

(T3P®) og pyridin i 2-metyltetrahydrofuran. Karboksylsyre **1d** tilberedes fra det tilsvarende substituerte benzenderivatet **1a** via en sekvens som starter med varmeformidlet konsensering av **1a** med et egnet malonat $(\text{CO}_2\text{R})_2\text{CH}=\text{CH}(\text{OR})$, der R er en alkylgruppe, slik som etyl, etyl eller lignende for å gi **1b**.

5

Forbindelse **1b** konverteres til karboksylsyre **1d** via en tre-trinns sekvens, inkludert intramolekylær syklisering ved oppvarming ved reflux i Downtherm eller difenyleter (trinn b), etterfulgt av fjerning (ved behov) av den blokkerende halogruppen (trinn c) under palladiumkatalysert dehalogeneringsbetingelser og syre- eller basekatalysert såpedannelse (trinn d). Rekkefølgen på avbeskyttelses- og såpedannelsestrinnene kan reverseres; dvs. **trinn c** kan finne sted før eller etter trinn d, som beskrevet i skjema 1.

10

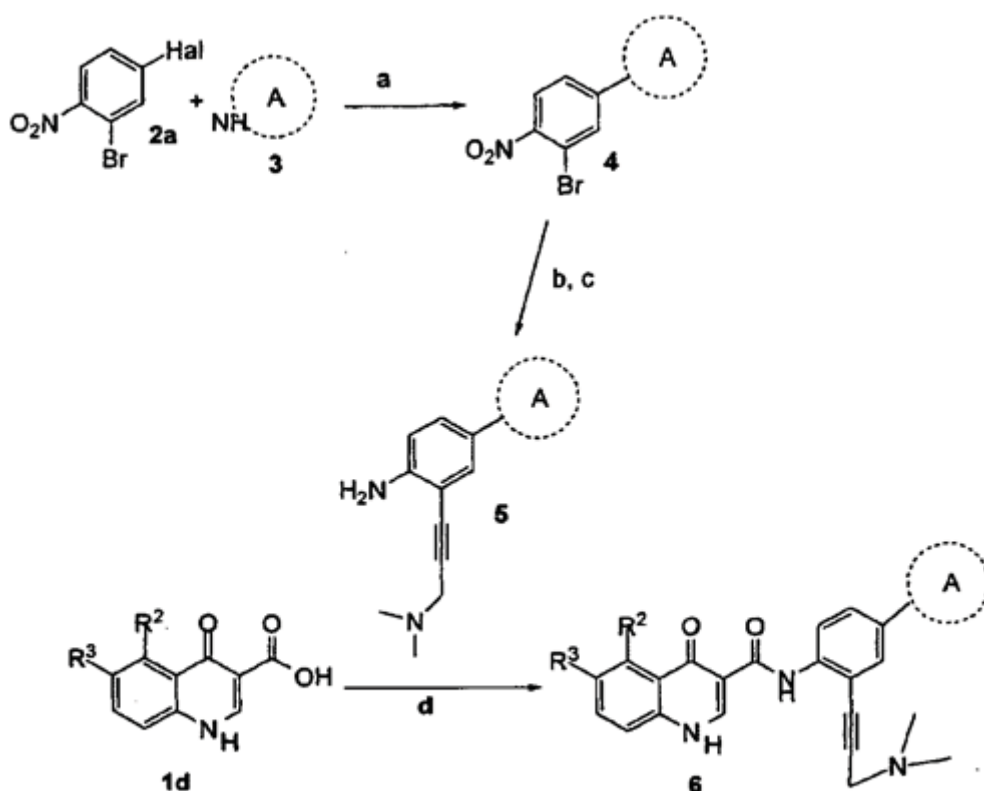
Med henvisning igjen til skjema 1, kan anilinderivat 2c tilberedes fra nitrobenzen 2a via en tre-trinns sekvens. Kopling, derfor, av nitrobenzen 2a med et syklisk amin

15



3 som definert i dette dokumentet i nærvær av trietylamin, gir forbindelse **2b**. Palladiumkatalysert reduksjon av **2b** gir amin **2c**.

20

Skjema 2. Fremstilling av forbindelser med formelen (I)

a) DMSO, K_2CO_3 , 80 °C; b) N,N-dimethylprop-2-yn-1-amin, $Pd(PPh_3)_2Cl_2$, CuI, DMF, TEA, 80 °C; c) Fe, $FeSO_4$, H_2O eller Zn, AcOH, H_2O ; d) HATU, Et_3N , DMF eller propylfosfonsyre syklisk vannfri (T3P®), pyridine, 2-metyltetrahydrofuran.

Skjema 2 angir syntesen av forbindelser av formel (I) som bærer en propylnylamin sidekjede. Kopling, derfor, av nitrobenzen **2a**, der Hal er en

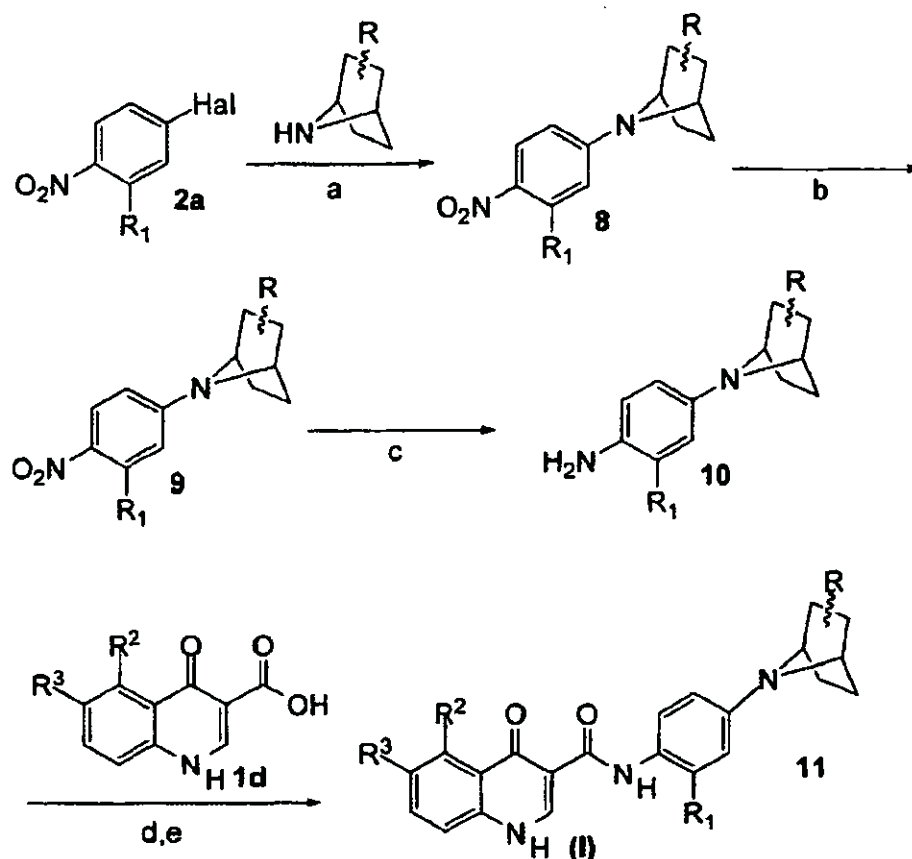
5



3 som definert i dette dokumentet i nærvær av kaliumkarbonat MDSO gir forbindelse **4**. Palladiumkatalysert kopling av forbindelse **4** med N,N-dimethylprop-2-yn-1-amin, etterfulgt av jern- eller sinkkatalysert reduksjon av nitromoiteten, gir amin **5**. Kopling av amin **5** med karboksylsyre **1d** gir forbindelse **6**, som er en forbindelse av formel (I).

10

Skjema 3. Fremstilling av forbindelser av formel (I) der R er H eller OH



a) DMSO, K₂CO₃, varme eller CH₃CN, TEA, varme; b) PGX slik som TBDMSCl, base slik som imidazol, DMF; c) H₂, Pd/C, EtOH; d) HATU, Et₃N, DMF eller propylfosfonsyre syklisk vannfri (T3P®), pyridin, 2-metyltetrahydrofuran; e) avbeskyttelse av PG, slik som HCl, EtOH. PG = beskyttelsesgruppe; X = forlatende gruppe.

Skjema 3 angir syntesen av en forbindelse av formel (I) der

5



3 er 7-azabisyklo[2.2.1]heptan, alternativt med en ekso- eller endo-hydroksygruppe ved 2-posisjonen. De hydroksysubstituerte adduktene (+)-endo-7-azabisyklo[2.2.1]heptan-2-ol, (-)-endo-7-azabisyklo[2.2.1]heptan-2-ol, (+)-ekso-7-azabisyklo[2.2.1]heptan-2-ol og (-)-ekso-7-azabisyklo[2.2.1]heptan-2-ol kan tilberedes ved anvendelse av prosedyrer som beskrevet i Fletcher S.R., et al., «Total Synthesis and Determination of the Absolute Configuration of Epibatidine,» *J. Org. Chem.*, **59**, s. 1771-1778 (1994). 7-Azabisyklo[2.2.1]heptan er kommersielt tilgjengelig fra Tyger Scientific Inc. 324 Stokes Avenue Ewing, NJ, 08638 USA.

15

Som med serien av transformasjoner sammenfattet i skjema 1 og 2, gir kopling av forbindelse **2a** med bisyklo[2.2.1] amin **7** således forbindelse **8**. Hvis en hydroksygruppe forekommer i forbindelse **8**, kan det være nødvendig å beskytte hydroksygruppen med en beskyttelsesgruppe før etterfølgende transformasjoner. Behandling av forbindelse **8** med tert-butyldimetylsilylklorid ved anvendelse av kjente betingelser, gir således den beskyttede forbindelsen **9** før reduksjon av nitromoietet for å gi aminet **10**. Amiddannelsen med **1d** (jfr. skjema 3) og fjerning av hydroksybeskyttelsesgruppen (etter behov) gir forbindelse **11** som er en forbindelse av formel (**I**).

Anvendelser, formuleringer og administrering

Farmasøytisk akseptable sammensetninger

I ett aspekt av oppfinnelsen i dette dokumentet tilveiebringes farmasøytisk akseptable sammensetninger, der disse sammensetningene omfatter enhver av forbindelsene som beskrevet i dette dokumentet, 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 oppfinnelsen i dette dokumentet kan finnes i fri form for behandling, eller eventuelt, som et farmasøytisk akseptabelt derivat eller et prolegemiddel derav. Ifølge oppfinnelsen i dette dokumentet, vil et farmasøytisk akseptabelt derivat eller et prolegemiddel inkludere, men ikke være begrenset til, farmasøytisk akseptable salter, estere, salter av slike estere, eller hvilket som helst annet addukt eller derivat som ved administrering til en pasient med behov for det er i stand til direkte eller indirekte å tilveiebringe en forbindelse som ellers beskrevet heri, eller en metabolitt eller rest derav.

Betegnelsen «farmasøytisk akseptabelt salt» betyr som anvendt i dette dokumentet de saltene som ifølge rimelig medisinsk skjønn er egnet til anvendelse i kontakt med vev hos mennesker og laverestående dyr uten unødig toksisitet, irritasjon, allergisk respons og lignende, og som viser et rimelig nytte/risiko-forhold. Et «farmasøytisk akseptabelt salt» betyr hvilket som helst ikke-toksisk salt eller salt av en ester av en forbindelse ifølge denne oppfinnelsen som ved administrering til en

mottaker er i stand til enten direkte eller indirekte å tilveiebringe en forbindelse ifølge denne oppfinnelsen eller en inhibitorisk aktiv metabolitt eller rest derav.

- 5 Farmasøytisk akseptable salter er velkjente i faget. S. M. Berge, *et al.* beskriver f.eks. farmasøytisk akseptable salter i detalj i *J. Pharmaceutical Sciences*, **1977**, 66, 1-19, innarbeidet i dette dokumentet ved henvisning. 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
- 10 er dannet med uorganiske syrer, slik som saltsyre, bromsyre, fosforsyre, svovelsyre og perklorisyre, eller med organiske syrer slik som eddiksyre, oksalsyre, maleinsyre, vinsyre, sitronsyre, ravsyre eller malonsyre eller ved å anvende andre fremgangsmåter som anvendes i faget, slik som ionebytte.
- 15 Andre farmasøytisk akseptable salter inkluderer adipat-, alginat-, askorbat-, aspartat-, benzensulfonat-, benzoat-, bisulfat-, borat-, butyrat-, kamforat-, kamforsulfonat-, sitrat-, syklopentanpropionat-, diglukonat-, dodecylsulfat-, edisylat (etandisulfonat)-, etansulfonat-, format-, fumarat-, glukohexanoat-, glyserofosfat-, glukonat-, hemisulfat-, heptanoat-, heksanoat-, hydrojodid-, 2-
- 20 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 derivert fra egnede
- 25 baser inkluderer alkalimetall-, alkalijordmetall-, ammoniakk- og $N^+(C_{1-4}alkyl)_4$ -salts. Denne oppfinnelsen vedrører også kvaternisering av eventuelle basiske nitrogenholdige grupper av forbindelsene beskrevet i dette dokumentet. Vann- eller oljeløselige eller dispergerbare produkter kan oppnås ved slik kvaternisering. Representative alkali- eller jordalkalimetallsalter inkluderer natrium, litium,
- 30 kalium, kalsium, magnesium og lignende. Farmasøytisk akseptable salter inkluderer videre, når egnet, ikke-toksisk ammonium, kvaternær ammonium og aminkationer dannet ved hjelp av motioner slik som halid, hydroksid, karboksylat, sulfat, fosfat, nitrat, lavalkylsulfonat og arylsulfonat.
- 35 Som beskrevet ovenfor omfatter de farmasøytisk akseptable sammensetningene ifølge oppfinnelsen i dette dokumentet videre en farmasøytisk akseptabelt bærer, adjuvant eller vehikkel, hvilket inkluderer, som anvendt i dette

dokumentet, 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 kaliumsorbit, 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, sukkerarter 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 polyetylglykol; 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

I enda et annet aspekt gir oppfinnelsen i dette dokumentet en fremgangsmåte for lette av alvorsgraden av en tilstand, sykdom eller lidelse implisert av CFTR-mutasjon. I visse utførelsesformer tilveiebringer oppfinnelsen i dette dokumentet en fremgangsmåte for behandling av en tilstand, sykdom, eller lidelse implisert ved en mangel på CFTR-aktivitet, der fremgangsmåten omfatter administrering av en sammensetning omfattende en forbindelse med formelen (I) til et individ, foretrukket et pattedyr, med behov for det.

I visse utførelsesformer gir oppfinnelsen i dette dokumentet en fremgangsmåte for behandling av sykdom forbundet med redusert CFTR-funksjon på grunn av mutasjoner i genet som koder for CFTR eller miljøfaktorer (f.eks. røyk). Disse sykdommene omfatter cystisk fibrose, kronisk bronkitt, tilbakevendende bronkitt, akutt bronkitt, sterilitet hos menn forårsaket av medfødt bilateralt fravær av vas deferens (CBAVD), sterilitet hos kvinner forårsaket av medfødt fravær av livmor og vagina (CAUV), idiopatisk kronisk pankreatitt (ICP), idiopatisk tilbakevendende pankreatitt, idiopatisk akutt pankreatitt, kronisk rhinosinusitt, primær skleroserende kolangitt, allergisk bronkopulmonal aspergillose, diabetes, keratoconjunctivitis sicca, forstoppelse, allergisk bronkopulmonal aspergillose (ABPA), bensykdommer (f.eks. osteoporose) og astma.

I visse utførelsesformer gir oppfinnelsen i dette dokumentet en fremgangsmåte for behandling av sykdommer forbundet med normal CFTR-funksjon. Disse sykdommene inkluderer kronisk obstruktiv lungesykdom (KOLS), kronisk bronkitt, tilbakevendende bronkitt, akutt bronkitt, rhinosinusitt, forstoppelse, pankreatitt, herunder kronisk pankreatitt, tilbakevendende pankreatitt og akutt pankreatitt, pankreatisk insuffisiens, sterilitet hos menn forårsaket av medfødt bilateralt fravær av vas deferens (CBAVD), mild lungesykdom, idiopatisk pankreatitt, leversykdom, arvelig emfysem, gallestein, gastro-øsofageal refluks sykdom, gastrointestinale ondartetheter, inflammatorisk tarmsykdom, forstoppelse, diabetes, artritt, osteoporose og osteopeni.

I visse utførelsesformer gir oppfinnelsen i dette dokumentet en fremgangsmåte for behandling av sykdommer forbundet normal CFTR-funksjon, inkludert arvelig hemokromatose, koaguleringsfirbinolyse, mangler slik som protein-C-mangel, type 1 arvelig angioødem, lipidprosesseringsmangler, slik som familiær hyperkolesterolemi, type 1 kylomikronemi, abetalipoproteinemi, lysosomallagringsykdommer, slik som [-cellesykdom/pseudo-Hurler,

mukopolysakkaridoser, Sandhof/Tay-Sachs, Crigler-Najjar type II, polyendokrinopati/hyperinsulemi, diabetes mellitus, Laron-dvergvekst, myeloperoksidasemangel, primær hypoparatyroidisme, melanoma, glykanose CDG type 1, medfødt hypertyroidisme, osteogenesis imperfecta, arvelig hypofibrinogenemi, ACT-mangel, diabetes insipidus (DI), nevrofyseal DI, nefrogen DI, Charcot-Marie Toth's syndrom, Pelizaeus-Merzbachers sykdom, neurodegenerative sykdommer slik som Alzheimers sykdom, Parkinsons sykdom, amyotrop lateral sklerose, progressiv supranukleær lammelse, Picks sykdom, flere polyglutamin nevrologiske sykdommer, slik som Huntington's, spinocerebular ataksi type I, spinal og bulbær muskelatrtrofi, dentatorubral pallidoluysian, atropi og myoton dystrofi, samt spongiforme enkefalopatier, slik som arvelig Creutzfeldt-Jakob-sykdom (på grunn av prionprosesseringsdefekt), Fabry Gerstmann sykdom, Straussler-Scheinker syndrom, Gorhams syndrom, kloridkanalopatier, myotonia congenita (Thomson og Becker- former), Bartters syndrom type III, Dents sykdom, hyperekpleksi, epilepsi, hyperekpleksi, lysosomal lagringssykdom, Angelman syndrom, primær ciliær dyskenesi (PCD), PCD med situs inversus (også kjent som Kartagener syndrom), PCD uten situs inversus og ciliær aplasi eller Sjogrens sykdom, omfattende trinnet med administrering til pattedyret av en virkningsfull mengde av en sammensetning av en forbindelse av oppfinnelsen i dette dokumentet.

Ifølge en alternativ foretrukket utførelsesform, tilveiebringer oppfinnelsen i dette dokumentet en fremgangsmåte for behandling av cystisk fibrose, omfattende trinnet med administrering til pattedyret av en sammensetning, omfattende trinnet med administrering til pattedyret av en virkningsfull mengde av en sammensetning, omfattende en forbindelse ifølge oppfinnelsen i dette dokumentet.

Ifølge oppfinnelsen, er en «virkningsfull mengde» av forbindelsen eller den farmasøytisk akseptable sammensetning derav, den mengden som er virkningsfull for behandling eller begrensningsgraden av én eller flere av sykdommene, lidelsene eller tilstandene som angitt ovenfor.

Forbindelsene og sammensetningene ifølge fremgangsmåten i oppfinnelsen i dette dokumentet, kan administreres ved anvendelse av enhver mengde og en hvilken som helst administrasjonsvei for behandling eller reduksjon av alvorlighetsgraden av én eller flere sykdommer, lidelser eller tilstander som angitt ovenfor.

I visse utførelsesformer er forbindelsene og sammensetningene ifølge oppfinnelsen i dette dokumentet nyttige for behandling eller begrensnig av alvorlighetsgraden av cystisk fibrose hos pasienter som viser CFTR-restaktivitet i den apikale membranen av respiratoriske og ikke-respiratoriske epitel.

5 Forekomsten av CFTR-restaktivitet på epiteloverflaten kan uten videre detekteres ved anvendelse av fremgangsmåter som er kjent i faget, f.eks. elektrofysiologiske, biokjemiske eller histokjemiske standardteknikker. Slike fremgangsmåter identifiserer CFTR-aktivitet ved anvendelse av elektrofysiologiske teknikker *in vivo* eller *ex vivo*, måling av Cl-konsentrasjoner i

10 svette eller spytt, eller biokjemiske eller histokjemiske teknikker *ex vivo* for å overvåke celleoverflatens densitet. Ved anvendelse av slike fremgangsmåter kan CFTR-restaktiviteten uten videre detekteres hos pasienter som er heterozygote eller homozygote for en rekke forskjellige mutasjoner, inkludert pasienter som er homozygote eller heterozygote for den vanligste mutasjonen, $\Delta F508$.

15 I en annen utførelsesform er forbindelsene og sammensetningene ifølge oppfinnelsen i dette dokumentet nyttige for behandling eller begrensnig av alvorlighetsgraden av cystisk fibrose hos pasienter som har induisert eller økt CFTR-restaktivitet ved anvendelse av farmakologiske fremgangsmåter eller

20 genbehandling. Slike fremgangsmåter øker mengden av CFTR til stede på celleoverflaten, hvilket derved induserer en foreløpig fraværende CFTR-aktivitet hos en pasient eller økning av det eksisterende nivået av CFTR-restaktivitet hos en pasient.

25 I én utførelsesform er forbindelsene og sammensetningene ifølge oppfinnelsen i dette dokumentet nyttige for behandling eller begrensnig av alvorlighetsgraden av cystisk fibrose hos pasienter innenfor visse genotyper som viser CFTR-restaktivitet, f.eks. klasse III-mutasjoner (reduisert regulering eller gating), klasse IV-mutasjoner (endret konduktans) eller klasse V-mutasjoner (reduisert syntese) (Lee R. Choo-

30 Kang, Pamela L., Zeitlin, *Type I, II, III, IV, and V cystic fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Defects and Opportunities of Therapy*; Current Opinion in Pulmonal Medicine 6:521–529, 2000). Andre pasientgenotyper som viser CFTR-restaktivitet, inkluderer pasienter homozygote for én av disse klassene eller heterozygote med hvilke som helst andre klasser av mutasjoner, herunder klasse I-

35 mutasjoner, klasse II-mutasjoner eller en mutasjon som mangler klassifisering.

I én utførelsesform er forbindelsene og sammensetningene ifølge oppfinnelsen i dette dokumentet nyttige for behandling eller begrensnig av alvorlighetsgraden av cystisk fibrose hos pasienter innenfor visse kliniske fenotyper, f.eks. en moderat til mild klinisk fenotype som typisk korrelerer med mengden av CFTR-restaktivitet i den apikale membranen i epitel. Slike fenotyper inkluderer pasienter som viser pankreatisk insuffisiens, eller pasienter som er diagnostisert med idiopatisk pankreatitt og medfødt bilateralt fravær av vas deferens eller mild lungesykdom.

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 i dette dokumentet en fysisk diskret enhet med middel som er egnet for pasienten som skal behandles. Det skal imidlertid forstås at den totale daglige anvendelsen av forbindelsene og sammensetningene ifølge oppfinnelsen i dette dokumentet vil bestemmes av behandlende lege etter rimelig medisinsk skjønn. 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 faget. Betegnelsen «pasient» betyr som anvendt i dette dokumentet et dyr, fortrinnsvis et pattedyr, og mest fortrinnsvis 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, dråper eller patch), bukkalt, som en oral eller nasal spray eller lignende, avhengig av den behandlede infeksjonens alvorlighetsgrad. 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 0,5 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, etylkarbonat, etylacetat, benzylalkohol, benzylbenzoat, propylenglykol, 1,3-butylenglykol, dimetylformamid, oljer (særlig bomull-, jordnøtt-, mais-, kim-, oliven-, ricinus- og sesamoljer), glyserol, 10 tetrahydrofurfurylalkohol, polyetylenglykoler og fettsyreestere av sorbitan og blandinger derav. Foruten inerte tynnere kan de orale sammensetningene også inkludere adjuvanter slik som fuktemiddel, emulsjons- og suspensjonsmiddel, søtningsmiddel, smakstilsetningsmiddel og parfumeringsmiddel.

15 Injiserbare fremstillinger, for eksempel sterile injiserbare vandige eller oljeholdige suspensjoner, kan formuleres ifølge den kjente teknikken ved hjelp 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 20 en løsning i 1,3-butandiol. Blant de akseptable vehiklene og løsemidlene som kan benyttes, er vann, Ringers løsning, U.S.P. og isotonisk 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 25 oleinsyre anvendes dessuten for fremstilling av injiserbare middel.

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

For å forlenge effekten av en forbindelse ifølge oppfinnelsen i dette dokumentet, er det ofte ønskelig å bremse absorpsjonen av forbindelsen fra subkutan eller intramuskulær injeksjon. Dette kan oppnås ved anvendelse av en flytende 35 suspensjon av krystallinsk eller amorft materiale med svak vannløselighet. 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 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 også ved innkapsling av forbindelsen i liposomer eller mikroemulsjoner som er compatible med kroppsvev.

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

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) fyllmiddel eller forlengere slik som stivelse, laktose, sukrose, glukose, mannitol og kiselsyre, b) bindemiddel slik som for eksempel karboksymetylcellulose, alginater, gelatin, polyvinylpyrrolidon, sukrose og akasie, c) fuktighetsbevarere slik som glyserol, d) desintegreringsmiddel slik som agar-agar, kalsiumkarbonat, potet- eller tapiokastivelser, alginsyre, visse silikater og natriumkarbonat, e) løsningsinhiberende middel slik som parafin, f) absorpsjonsakseleratorer slik som 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 polyetylglykoler, natriumlaurylsulfat og blandinger derav. Ved kapsler, tabletter og piller kan doseringsformen også omfatte buffermiddel.

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 polyetylglykoler med høy molekylvekt og lignende. Fastdoseformene av tabletter, drasjeer, kapsler, piller og granulater kan tilberedes

med overtrekk og skall, slik som enteriske overtrekk og andre overtrekk velkjent i den farmasøytiske formuleringsteknikken. Disse kan eventuelt inneholde matteringsmidler og kan også være av en sammensetning som frisetter kun den/de aktive ingrediensen(e), eller fortrinnsvis i visse deler av mage-
 5 tarmkanalen, eventuelt på en forsinket måte. Eksempel på integrerte sammensetninger som kan anvendes, inkluderer polymere stoffer og voksmiddel. Faste sammensetninger av en lignende type kan også anvendes som fyllmiddel i myk- og hardfylte gelatinkapsler ved anvendelse av slike eksipienter som laktose eller melkesukker samt polyetylenglykoler med høy molekylvekt og lignende.

10 De aktive forbindelsene kan også være i mikroinnkapslet form med én eller flere eksipienter som nevnt ovenfor. Fastdoseformene av tabletter, drasjeer, kapsler, piller og granulater kan tilberedes med overtrekk og skall, slik som enteriske overtrekk, og frissettingsregulerende overtrekk og andre overtrekk velkjent i den
 15 farmasøytiske formuleringsteknikken. I slike fastdoseformer kan den aktive forbindelsen blandes med minst ett inert fortynningsmiddel, slik som sukkrose, laktose eller stivelse. Slike doseringsformer kan også omfatte, hvilket er normal praksis, ytterligere andre stoffer enn inerte tynnere, f.eks. tableteringssmøremiddel og andre tableteringshjelpemiddel, slik som en
 20 magnesiumstearat og mikrokrySTALLinsk cellulose. Ved kapsler, tabletter og piller kan doseringsformene også omfatte buffermiddel. De kan eventuelt inneholde matteringsmiddel 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. Eksempel på integrerte sammensetninger som
 25 kan anvendes, inkluderer polymere stoffer og voksmiddel.

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
 30 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. Oppfinnelsen i dette dokumentet omfatter dessuten anvendelse av transdermale plaster, som har den ekstra fordel at de tilveiebringer kontrollert tilførsel av en
 35 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.

5 Aktiviteten av en forbindelse som benyttes i denne oppfinnelsen som en modulator av en CFTR, kan analyseres i henhold til fremgangsmåtene som er beskrevet generelt i faget og eksemplene i dette dokumentet.

10 Det skal også forstås at forbindelsene og de farmasøytisk akseptable sammensetningene ifølge oppfinnelsen i dette dokumentet, 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

15 kompatibilitet og den ønskede terapeutiske effekten som skal oppnås. Det skal også forstås 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

20 i dette dokumentet er ytterligere terapeutiske midler som normalt administreres for å behandle eller forebygge en bestemt sykdom eller tilstand, kjent som «egnet for sykdommen eller tilstanden som behandles».

25 I en utførelsesform er det ytterligere midlet valgt fra et slimløsende middel, en bronkodilatator, et antibiotikum, et antiinfeksiøst agens, et antiinflammatorisk middel, en annen CFTR-modulator enn en forbindelse ifølge oppfinnelsen i dette dokumentet, eller et næringsmiddel. I en videre utførelsesform er det ytterligere midlet en annen CFTR-modulator enn en forbindelse ifølge oppfinnelsen i dette dokumentet.

30 I en utførelsesform er det ytterligere midlet et antibiotikum. Eksempler på antibiotika som er nyttige heri, inkluderer tobramycin, herunder tobramycininhalert pulver (TIP), azitromycin, aztreonam, herunder den aerosoliserte formen av aztreonam, amikacin, herunder liposomale formuleringer

35 derav, ciprofloksacin, herunder formuleringer derav egnet til administrering ved inhalering, levoflaksacin, herunder aerosoliserte formuleringer derav og kombinasjoner av to antibiotika, f.eks. fosfomycin og tobramycin.

I en annen utførelsesform er det ytterligere middelet en mucolytt. Eksempler på mucolytter som er nyttige heri, inkluderer Pulmozyme®.

5 I en annen utførelsesform er det ytterligere midlet en bronkodilator. Eksempler på bronkodilatorer inkluderer albuterol, metaprotenerolsulfat, pirbuterolacetat, salmeterol eller tetrabulinsulfat.

10 I en annen utførelsesform er det ytterligere midlet virkningsfullt for gjenopprettelse av lungeluftveisoverflatevæske. Slike midler forbedrer bevegelsen av salt inn og ut av celler, slik at slim i lungeluftveien er mer hydrert, og derfor enklere å fjerne. Eksempler på slike midler inkluderer hypertonisk saltløsning, denufosoltetranatrium
 15 (((3S,5R)-5-(4-amino-2-okso-2,4-dihydro-1H-pyrimidin-1-yl)-3-hydroksyokso-2-yl]metoksyhydroksyfosforyl) [(((2R,3S,4R,5R)-5-(2,4-dio-2,4-dihydro-1H-pyrimidin-1-yl)-3,4, 4-dihydroksyokso-2-yl]metoksyhydroksyfosforyl)oksohydroksyfosforyl]hydrogenfosfat) eller bronkitol (inhalerbar formulering av mannitol).

20 I en annen utførelsesform er det ytterligere middelet et antiinflammatorisk middel, dvs. et middel som kan redusere inflammasjonen i lungene. Eksempler på slike midler som er nyttige heri, inkluderer ibuprofen, dokosaheksansyre (DHA), sildenafil, inhalert glutation, pioglitazon, hydroksyklorokin eller simvastatin.

25 I en annen utførelsesform reduserer det ytterligere middelet aktiviteten til den epiteliale natriumkanalblokkeren (ENaC) enten direkte ved blokkering av kanalen eller indirekte ved modulering av proteaser som fører til en økning i ENaC-aktivitet (f.eks. serinproteaser, kanalaktiverende proteaser). Eksempler på slike midler inkluderer kamostat (en tryptinaktig proteaseinhibitor), QAU145, 552-02, GS-9411, INO-4995, Aerolytic og amilorid. Ytterligere midler som reduserer aktiviteten til epitel natriumkanalblokkerer (ENaC) kan f.eks.
 30 finnes i PCT-publikasjon nr. WO2009/074575.

35 Blant andre sykdommer beskrevet i dette dokumentet, anvendes kombinasjoner av CFTR-modulatorer slik som forbindelse av formel (I) og midler som reduserer aktiviteten av ENaC, til behandling av Liddles syndrom, en inflammatorisk eller allergisk tilstand, herunder cystisk fibrose, primær ciliær dyskinesi, kronisk bronkitt, kronisk obstruktiv lungesykdom, astma,

luftveisinfeksjoner, lungekarsinom, xerostomi og keratoconjunctivitis sicca, luftveisinfeksjoner (akutt og kronisk, viral og bakteriell) og lungekarsinom.

5 Kombinasjoner av CFTR-modulatorer, slik som forbindelser av formel (I), og midler som reduserer aktiviteten av ENaC, er også nyttige for behandling av sykdommer mediert ved blokkering av den epiteliale natriumkanalen, og omfatter også andre sykdommer enn lungesykdommer som er assosiert med abnormal fluidregulering over et epitel, kanskje med abnormal fysiologi i de beskyttende overflatevæskene på overflaten, f.eks. xerostomi (tørr munn) eller keratoconjunctivitis sicca (tørre øyne). 10 Blokkering av den epiteliale natriumkanalen i nyren kan videre anvendes til å fremme diurese og dermed indusere en hypotensiv effekt.

Astma inkluderer både iboende (ikke-allergisk) astma og ytre (allergisk) astma, mild astma, moderat astma, alvorlig astma, astma bronchialis, treningsindusert 15 astma, jobbrelatert astma og astma indusert etter bakteriell infeksjon. Behandling av astma skal også forstås som å omfatte behandling av pasienter, f.eks. under 4 eller 5 år gamle, som viser hvesende symptomer, og som er diagnostisert eller kan diagnostiseres som «hvesende spedbarn», en etablert pasientkategori av større medisinsk betydning, og nå ofte identifisert som begynnende astmatikere eller 20 astmatikere i tidlig fase. (For enkelhets skyld omtales denne særlige astmatiske tilstanden som «hvesende spedbarn-syndrom».) Den forebyggende virkningen for behandling av astma vil være åpenbar ved redusert frekvens eller alvorlighetsgrad av symptomatiske anfall, f.eks. av akutte astmatiske eller bronkokonstriktoriske anfall, forbedret lungefunksjon eller forbedret luftveishyperreaktivitet. Det kan 25 videre underbygges ved redusert krav til annen symptomatisk behandling, dvs. behandling for eller beregnet på å hindre eller avbryte symptomatiske anfall når disse oppstår, f.eks. antiinflammatorisk (f.eks. kortikosteroid) eller bronkodilatorisk. Den forebyggende fordelen ved astma kan særlig være åpenbar hos pasienter utsatt for «morgenanfall». «Morgenanfall» er et anerkjent astmatisk syndrom, 30 alminnelig for en betydelig prosentandel av astmatikere og karakterisert ved astmaanfall, f.eks. mellom ca. 4 og 6 om morgenen, dvs. ved et tidspunkt normalt vesentlig fjernt fra all tidligere administrert symptomatisk astmabehandling.

35 Kronisk obstruktiv lungesykdom inkluderer kronisk bronkitt eller dyspné assosiert dermed, emfysem og eksaserbasjon av luftveishyperreaktivitet etter annen legemiddelbehandling, særlig annen inhalert legemiddelbehandling. I noen utførelsesformer er kombinasjonene av CFTR-modulatorer, slik som

forbindelser av formel (I), og midler som reduserer ENaC-aktiviteten, nyttige for behandling av bronkitt eller genese av alle typer, herunder for eksempel akutt, arakidisk, kataral, krupøs, kronisk eller ftinoid bronkitt.

5 I en annen utførelsesform er det ytterligere middelet en annen CFTR-modulator enn en forbindelse av formel (I), dvs. et middel som har som effekt å modulere CFTR-aktivitet. Eksempler på slike midler inkluderer ataluren («PTC124®», 3-[5-(2-fluorfenyl)-1,2,4-oksadiazol-3-yl]benzosyre), sinapultid, lankovutid, depelestat (en human rekombinant neutrofil elastaseinhibitor), kobiproston (7-{(2R, 4aR, 5R, 7aR)-2-[(3S)-1,1-difluor-3-metylpentyl]-2-hydroksy-6-oksooktahydrosyklopenta[b]pyran-5-yl}heptansyre) eller (3-(6-(1-(2,2-difluorbenzo[d][1,3]dioksol-5-yl)syklopropankarboksamid)-3-metylpyridin-2-yl)benzosyre. I en annen utførelsesform er det ytterligere middelet (3-(6-(1-(2,2-difluorbenzo[d][1,3]dioksol-5-yl)syklopropankarboksamido)-3-
10
15 metylpyridin-2-yl)benzosyre.

I en annen utførelsesform er det ytterligere middelet et næringsmiddel. Eksempler på slike midler inkluderer pankrelipase (pankreatinenzymutbytting), herunder Pancrease®, Pancreacarb®, Ultrase® eller Creon®, Liprotomase®
20 (tidligere Trizyte®), Aquadeks® eller glutatininhalering. I en utførelsesform er det ytterligere næringsmiddelet pankrelipase.

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 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

30 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. Oppfinnelsen i dette dokumentet inkluderer således i et annet aspekt en sammensetning for overtrekking av en implanterbar innretning omfattende en forbindelse ifølge den foreliggende oppfinnelsen som generelt beskrevet ovenfor, og i klasser og
35

underklasser heri, og en bærer som er egnet til overtrekking av den implanterbare innretningen. I enda et annet aspekt inkluderer oppfinnelsen i dette dokumentet en implanterbar innretning overtrukket med en sammensetning omfattende en forbindelse ifølge oppfinnelsen i dette dokumentet som generelt 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 tilberedningen av overtrukne, implanterbare innretninger beskrives i amerikansk patent nr. 6,099,562; 5,886,026 og 5,304,121. Overtrekkene er vanligvis biokompatible polymermaterialer, slik som en hydrogelpolymer, polymetyldisiloksan, polykaprolakton, polyetylglykol, polymelkesyre, 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 av oppfinnelsen relaterer til modulering av CFTR-aktivitet i et biologisk assay (*in vitro*), hvilken metode omfatter å bringe den biologiske prøven i kontakt med en forbindelse av formel (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.

Modulering av CFTR i en biologisk prøve er nyttig for en rekke formål, kjent av fagfolk på området. Eksempler på slike formål inkluderer, men er ikke begrenset til studien av CFTR i biologiske og patologiske fenomener; og den sammenlignende evalueringen av nye CFTR-modulatorer.

I enda en annen utførelsesform tilveiebringes en fremgangsmåte for modulering av aktiviteten til en anionekanal *in vivo*, omfattende trinnet med å sette nevnte kanal i kontakt med en forbindelse av formel (I). I foretrukne utførelsesformer er anionkanalen en kloridkanal eller en bikarbonatkanal. I andre foretrukne utførelsesformer er anionekanalene en kloridkanal.

Ifølge en alternativ utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen i dette dokumentet en fremgangsmåte for økning av antallet funksjonelle CFTR-er i en

cellemembran, omfattende trinnet med å bringe cellen i kontakt med en forbindelse med formelen (**I**).

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

10 Det optiske membranpotensialassayet benytter spenningsensitive 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 energy transfer» *Chem Biol* **4**(4): 269–77) i kombinasjon med instrumentering for måling
15 av fluorescensendringer 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 spenningsensitive assayene er basert på endringen i fluorescensresonnerende energioverføring (Fluorescence Resonant Energy Transfer, FRET) mellom det membranløselige, spenningsensitive fargemiddelet, DiSBAC₂(3), og et fluorescerende fosfolipid, CC2-DMPE, som er festet til det ytre bladet av plasmamembranen og fungerer som FRET-donor. Endringer i membranpotensial
25 (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 konstruert til å gjennomføre cellebaserte screeninger i 96- eller 384-brønners mikrotiterplater.

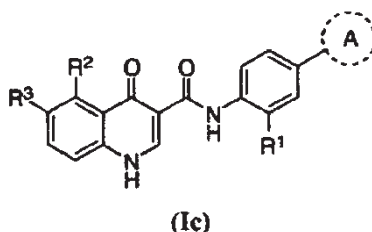
30 I et annet aspekt tilveiebringer oppfinnelsen i dette dokumentet en kit til anvendelse i målingen av CFTR-aktivitet eller et fragment derav i en biologisk prøve *in vitro* eller *in vivo*, omfattende (i) en sammensetning omfattende en forbindelse av formel (**I**) eller en hvilken som helst av utførelsesformene ovenfor; og (ii)
35 instruksjoner for a) opprettelse av kontakt mellom sammensetningen og den biologiske prøven og b) måling av CFTR-aktiviteten eller et fragment derav. I en utførelsesform omfatter kittet videre instruksjoner for a) opprettelse av kontakt

mellom en ytterligere sammensetning og den biologiske prøven, b) måling av CFTR-aktiviteten eller et fragment derav under nærvær av den ytterligere forbindelsen og c) sammenligning av CFTR-aktiviteten under nærvær av den ytterligere forbindelsen med CFTR-densiteten under nærvær av en forbindelse av formel (I). I foretrukne utførelsesformer anvendes kittet til måling av CFTR-tettheten.

For at oppfinnelsen som beskrives i dette dokumentet skal forstås fullt ut, gis følgende eksempler. Det skal forstås at disse eksemplene bare illustrerer oppfinnelsen og ikke på noen som helst måte begrenser den.

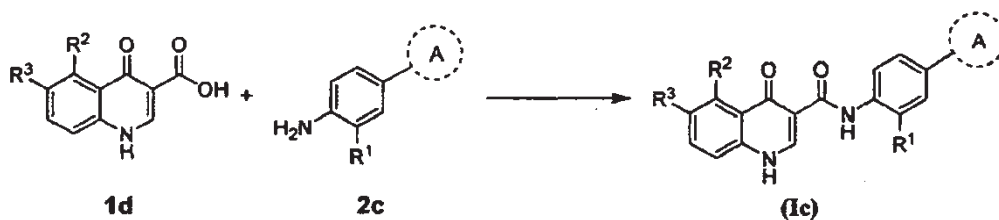
Prosesser og mellomstadier for fremstilling av forbindelser av formel (I)

Et annet aspekt av oppfinnelsen relaterer til en prosess for tilberedning av en forbindelse av formel (Ic):



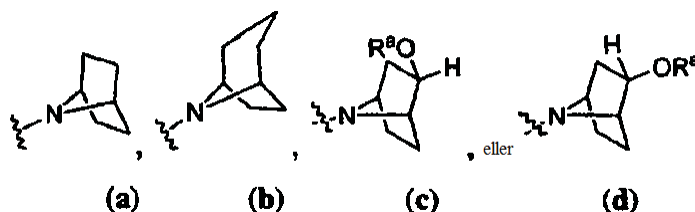
eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, der prosessen omfatter:

(a) reagering av syren i formel **1d** med et amin i formel **2c** for å gi en forbindelse av formel (**Ic**)



der:

ring A velges fra:



der

R^1 er $-\text{CF}_3$, $-\text{CN}$ eller $-\text{C}\equiv\text{CCH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$;

R^2 er hydrogen, $-\text{CH}_3$, $-\text{CF}_3$, $-\text{OH}$ eller $-\text{CH}_2\text{OH}$;

R^3 er hydrogen, $-\text{CH}_3$, $-\text{OCH}_3$ eller $-\text{CN}$; gitt at både R^2 og R^3 ikke samtidig er hydrogen, og

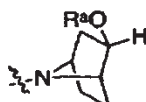
R^a er hydrogen eller en silylbeskyttende gruppe valgt fra gruppen bestående av trimetylsilyl (TMS), *tert*-butyldifenylsilyl (TBDPS), *tert*-butyldimetylsilyl (TBDMS), triisopropylsilyl (TIPS) og [2-(trimetylsilyl)etoksy]metyl (SEM).

I én utførelsesform finner reaksjonen av syren i formel **1d** med aminet i formel **2c** sted i en oppløsning i nærvær av *O*-(7-azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetrametyluroniumheksafluorofosfat (HATU) og triethylamin eller i en oppløsning i nærvær av propylfosfonsyre syklisk vannfri (T3P®) og pyridin. Mer bestemt omfatter oppløsningen *N,N*-dimetylformamid, etylacetat eller 2-metyltetrahydrofuran.

I en annen utførelsesform er R^a hydrogen eller TBDMS.

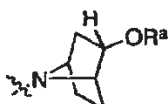
I en annen utførelsesform er R^a TBDMS.

I en annen utførelsesform omfatter prosessen et videre avbeskyttelsestrinn; f.eks. når ring A er



(c)

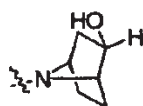
eller



(d)

der R^a er en silylbeskyttende gruppe, for generering av en forbindelse av formel (**1c**), der ring A er

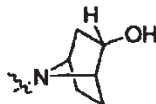
39



(c) ,

eller

5



(d) .

Fjerning av en silylbeskyttende gruppe krever vanligvis behandling med en syre, slik som eddiksyre eller lignende, selv om andre reaksjonsmidler, slik som en kilde til fluorioner (f.eks. tetrabutylammoniumfluor) kan anvendes.

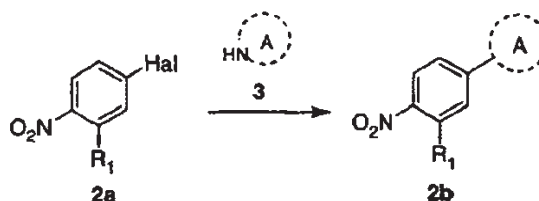
10

I prosessen tilberedes aminet i formel **2c** fra en forbindelse av formel **2a** omfattende trinnene med:

- (a) reaksjon av forbindelsen i formel **2a** med et amin i formel **3** for å gi forbindelsen i formel **2b**

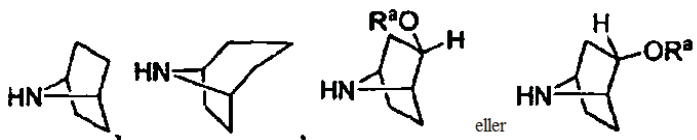
15

der:



20

Hal er F, Cl, Br eller I; og
aminet i formel **3** er

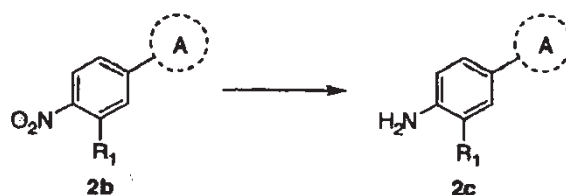


25

og

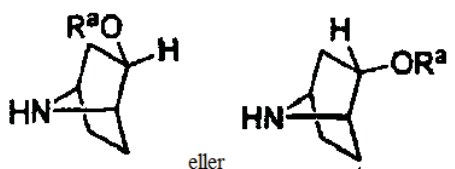
- (b) reduksjon av forbindelsen i formel **2b** til aminet i formel **2c**.

40



I én utførelsesform av prosessen for fremstilling av aminet i formel **2c**, genereres aminet i formel **3** i trinn (a) in situ fra det tilsvarende kvarternære ammoniakksaltet, slik som et aminhydroklorosalt, selv om andre ammoniakksalter (f.eks. trifluoracetatsalt), også kan anvendes.

I én utførelsesform av trinn (a) for dannelselse av aminet i formel **2c**, når aminet i formel **3** er



er R^a hydrogen eller TBDMS. Mer bestemt er R^a TBDMS.

I en annen utførelsesform finner trinn (a) sted i et polart aptrotisk løsemiddel i nærvær av en tertiær aminbase. Eksempler på anvendbare tertiære aminer inkluderer triethylamin, diisopropyletylamin, 1,5-diazabisyklo[4.3.0]non-5-en (DBN), 1,8-diazabisyklo[5.4.0]undek-7-en (DBU), 1,4-diazabisyklo[2.2.2]oktan (DABCO) og pyridin. Eksempler på anvendbare løsemidler, inkluderer N,N-dimetylformamid, dimetylsulfoksid eller acetonitril.

I én utførelsesform er den tertiære aminbasen trietylamin.

I en annen utførelsesform finner trinn (a) sted i acetonitil i nærvær av trietylamin.

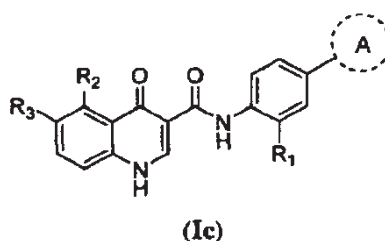
I en annen utførelsesform, er reaksjonstemperaturen i trinn (a) mellom ca. 75 °C og ca. 85 °C.

I en annen utførelsesform er reaksjonstiden for trinn (a) mellom ca. 2 og ca. 30 timer.

I én utførelsesform av prosessen for fremstilling av aminet i formel **2c**, finner trinn (b) sted i et polarprotisk løsemiddel eller en blanding av polarprotiske løsemidler i nærvær av en palladiumkatalysator. Når palladium er katalysatoren, er løsemidlet i trinn (b) vanligvis et polarprotisk løsemiddel, slik som en alkohol. Omfatter mer bestemt metanol eller etanol.

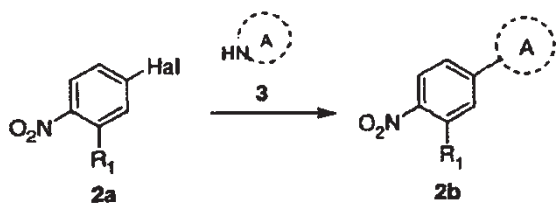
I en annen utførelsesform finner trinn (b) sted i et polarprotisk løsningsmiddel, slik som vann, i nærvær av Fe og FeSO₄ eller Zn og AcOH.

Et annet aspekt av oppfinnelsen relaterer til en prosess for tilberedning av en forbindelse av formel (**1c**):

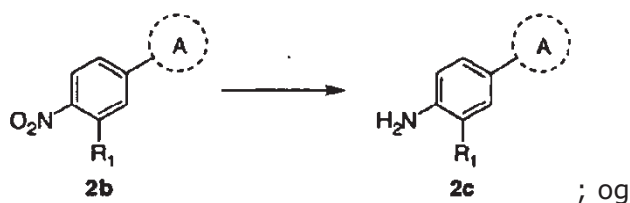


eller farmasøytisk akseptable salter derav, omfattende trinnene med:

(a) reagering av en forbindelse av formel **2a** med et amin i formel **3** for å gi en forbindelse av formel **2b**

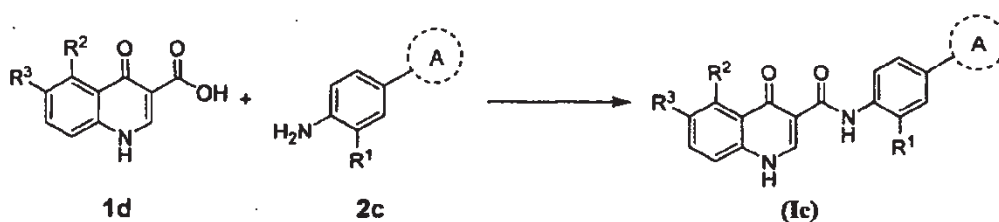


(b) konvertering av forbindelsen i formel **2b** til aminet i formel **2c** via reduksjon

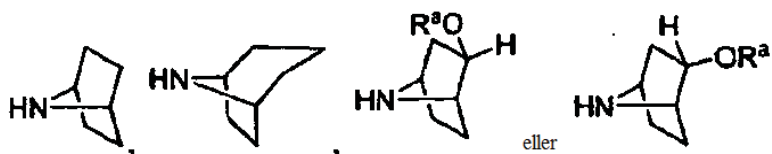


(c) reagering av aminet i formel **2c** med en syre i formel **1d** for å gi en forbindelse av formel (**1c**)

42

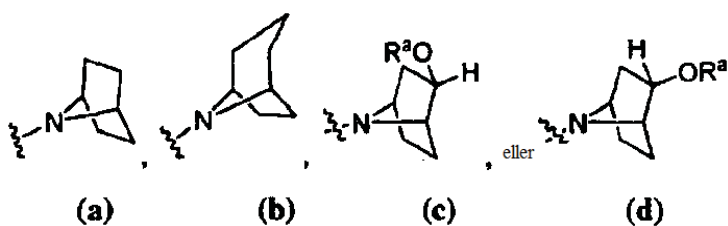


der Hal er F, Cl, Br eller I;
 aminet i formel **3** er



og

ring A velges fra:



der

R^1 er $-\text{CF}_3$, $-\text{CN}$ eller $-\text{C}\equiv\text{CCH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$;

R^2 er hydrogen, $-\text{CH}_3$, $-\text{CF}_3$, $-\text{OH}$ eller $-\text{CH}_2\text{OH}$;

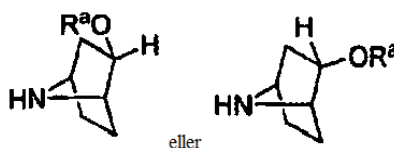
R^3 er hydrogen, $-\text{CH}_3$, $-\text{OCH}_3$ eller $-\text{CN}$;

gitt at både R^2 og R^3 ikke samtidig er hydrogen, og

R^a er hydrogen eller en silylbeskyttende gruppe valgt fra gruppen
 bestående av trimetylsilyl (TMS), *tert*-butyldifenylsilyl (TBDPS),
tert-butyldimetylsilyl (TBDMS), triisopropylsilyl (TIPS) og [2-
 (trimetylsilyl)etoksy]metyl (SEM).

I én utførelsesform genereres aminet i formel **3** i trinn (a) in situ fra det
 tilsvarende kvarternære ammoniakksaltet, slik som et aminhydroklor salt, selv
 om andre ammoniakksalter (f.eks. trifluoracetatsalt) også kan anvendes.

I én utførelsesform av trinn (a) for dannelsen av aminet i formel **2c**, når aminet i formel **3** er



5

er R^a hydrogen eller TBDMS. Mer bestemt er R^a TBDMS.

I en annen utførelsesform finner trinn (a) sted i et polart aprotisk løsemiddel i nærvær av en tertiær aminbase. Eksempler på anvendbare tertiære aminer inkluderer triethylamin, diisopropyletylamin, 1,5-diazabisyklo[4.3.0]non-5-en (DBN), 1,8-diazabisyklo[5.4.0]undek-7-en (DBU), 1,4-diazabisyklo[2.2.2]oktan (DABCO) og pyridin.

10

I én utførelsesform er den tertiære aminbasen trietylamin.

15

I en annen utførelsesform finner trinn (a) sted i acetonitil i nærvær av trietylamin.

I en annen utførelsesform, er reaksjonstemperaturen i trinn (a) mellom ca. 75 °C og ca. 85 °C.

20

I en annen utførelsesform er reaksjonstiden for trinn (a) mellom ca. 2 og ca. 30 timer.

25

I én utførelsesform av prosessen for fremstilling av aminet i formel **2c**, finner trinn (b) sted i et polarprotisk løsemiddel eller en blanding av polarprotiske løsemidler i nærvær av en palladiumkatalysator. Når palladium er katalysatoren, er løsemidlet i trinn (b) vanligvis et polarprotisk løsemiddel, slik som en alkohol. Løsemiddelet omfatter mer bestemt metanol eller etanol.

30

I en annen utførelsesform finner trinn (b) sted i et polarprotisk løsningsmiddel, slik som vann, i nærvær av Fe og FeSO_4 eller Zn og AcOH.

35

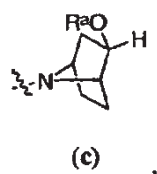
I én utførelsesform av trinn (c), finner reaksjonen av syren i formel **1d** med aminet i formel **2c** sted i en oppløsning i nærvær av **O**-(7-azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetrametyluroniumheksafluorofosfat (HATU) og triethylamin eller i

en oppløsning i nærvær av propylfosfonsyre syklisk vannfri (T3P®) og pyridin. Mer bestemt omfatter oppløsningen N,N-dimetylformamid, etylacetat eller 2-metyltetrahydrofuran.

5 I en annen utførelsesform er R^a hydrogen eller TBDMS.

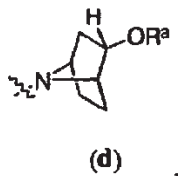
I en annen utførelsesform er R^a TBDMS.

10 I en annen utførelsesform omfatter prosessen et videre avbeskyttelsestrinn; f.eks. når ring A er



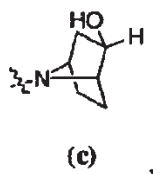
eller

15

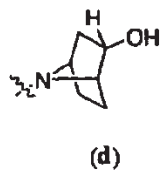


der R^a er en silylbeskyttende gruppe, for generering av en forbindelse av formel (I), der ring A er

20



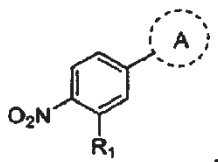
eller



25

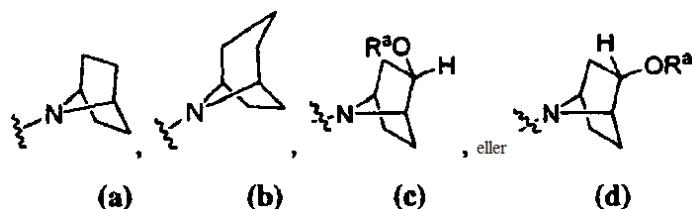
Fjerning av en silylbeskyttende gruppe krever vanligvis behandling med en syre, slik som eddiksyre eller lignende, selv om andre reaksjonsmidler, slik som en kilde til fluorioner (f.eks. tetrabutylammoniumfluor) kan anvendes.

5 Et annet aspekt av oppfinnelsen relaterer til en forbindelse som er



der ring A er

10



der

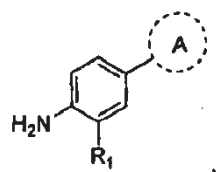
R^1 er $-\text{CF}_3$, $-\text{CN}$ eller $-\text{C}\equiv\text{CCH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$, og

15

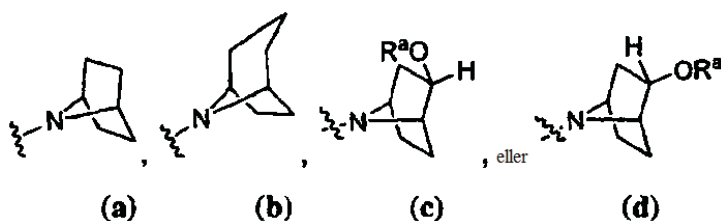
R^a er en silylbeskyttende gruppe valgt fra gruppen bestående av trimetylsilyl (TMS), *tert*-butyldifenylsilyl (TBDPS), *tert*-butyldimetylsilyl (TBDMS), triisopropylsilyl (TIPS) og [2-(trimetylsilyl)etoksy]metyl (SEM).

Et annet aspekt av oppfinnelsen relaterer til en forbindelse som er

20



der ring A er



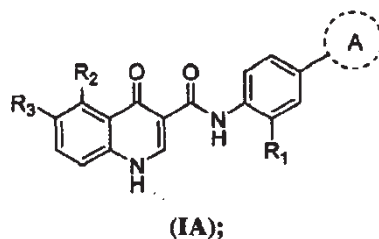
25

der

R^1 er $-\text{CF}_3$, $-\text{CN}$ eller $-\text{C}\equiv\text{CCH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$, og

R^a er en silylbeskyttende gruppe valgt fra gruppen bestående av trimetylsilyl (TMS), *tert*-butyldifenylsilyl (TBDPS), *tert*-butyldimetylsilyl (TBDMS), triisopropylsilyl (TIPS) og [2-(trimetylsilyl)etoksy]metyl (SEM).

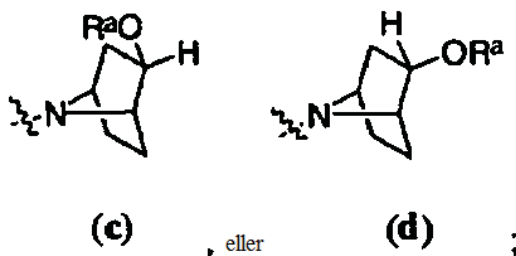
Et annet aspekt av oppfinnelsen relaterer til en forbindelse av formel (IA):



eller farmasøytisk akseptable salter derav, der:



velges fra



der

R^1 er $-\text{CF}_3$, $-\text{CN}$ eller $-\text{C}\equiv\text{CCH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$;

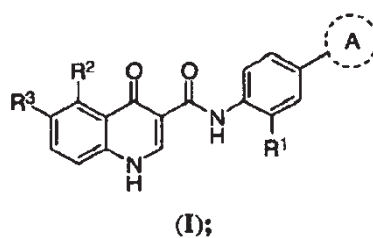
R^2 er hydrogen, $-\text{CH}_3$, $-\text{CF}_3$, $-\text{OH}$ eller $-\text{CH}_2\text{OH}$;

R^3 er hydrogen, $-\text{CH}_3$, $-\text{OCH}_3$ eller $-\text{CN}$; gitt at både R^2 og R^3 ikke samtidig er hydrogen, og

R^a er en silylbeskyttende gruppe valgt fra gruppen bestående av trimetylsilyl (TMS), *tert*-butyldifenylsilyl (TBDPS), *tert*-butyldimetylsilyl (TBDMS), triisopropylsilyl (TIPS) og [2-(trimetylsilyl)etoksy]metyl (SEM).

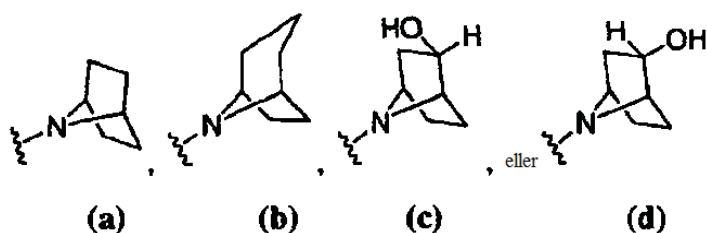
Et annet aspekt ved oppfinnelsen relaterer til en forbindelse av formel (I)

47



eller farmasøytisk akseptable salter derav, der:
ring A velges fra:

5



der

R^1 er $-\text{CF}_3$, $-\text{CN}$ eller $-\text{C}\equiv\text{CCH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$;

10

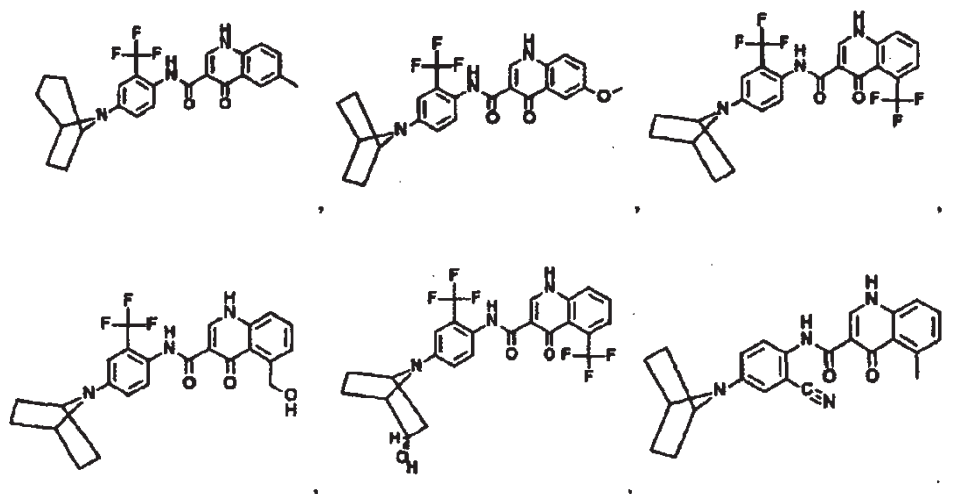
R^2 er hydrogen, $-\text{CH}_3$, $-\text{CF}_3$, $-\text{OH}$ eller $-\text{CH}_2\text{OH}$;

R^3 er hydrogen, $-\text{CH}_3$, $-\text{OCH}_3$ eller $-\text{CN}$; gitt at både R^2 og R^3 ikke
samtidig er hydrogen;

fremstilt ved en hvilken som helst av prosessene offentliggjort i dette
dokumentet.

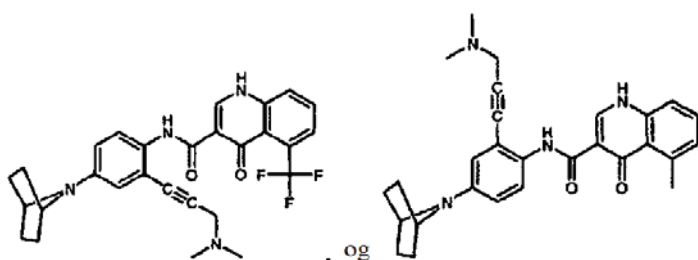
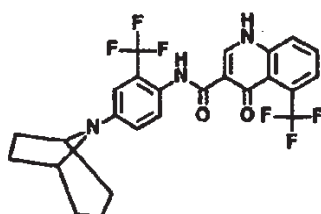
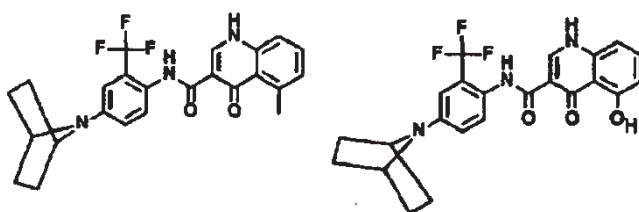
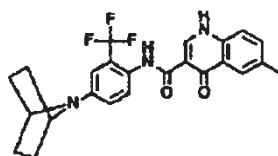
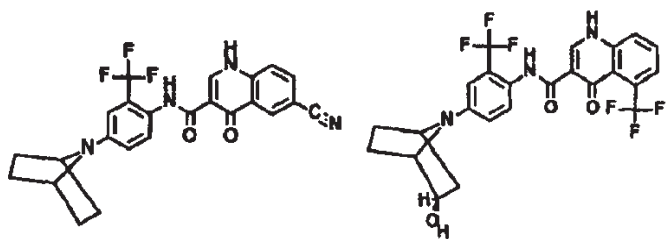
15

Et annet aspekt av oppfinnelsen relaterer til en forbindelse valgt fra gruppen
bestående av:



20

48

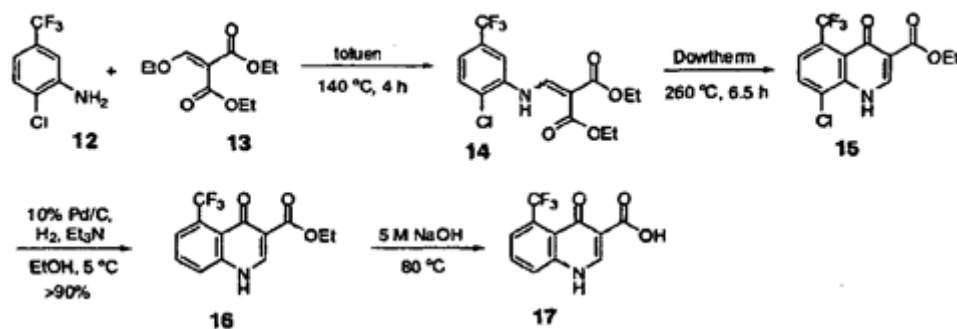


fremstilt ved en hvilken som helst av prosessene offentliggjort i dette dokumentet.

Eksempler

Mellomstadium 1: 4-okso-5-(trifluormetyl)-1,4-dihydrokinolin-3-karboksytsyre (17). Syntesen av tittelforbindelsen beskrives i skjema 4.

Skjema 4



Tilberedelse av dietyl 2-((2-kloro-5-(trifluorometyl)fenylamino) metylen) malonat (14).

2-kloro-5-(trifluormetyl)anilin **12** (200 g, 1,023 mol), dietyl-2-
 (etoksymetylen)malonat **13** (276 g, 1,3 mol) og toluen (100 ml) ble kombinert
 under nitrogenatmosfære i en trehalset, rundbunnet 1 l-kolbe utstyrt med Dean-
 Stark-kondensator. Løsningen ble varmet opp under omrøring til 140 °C og
 temperaturen ble opprettholdt i 4 t. Reaksjonsblandingen ble nedkjølt til 70 °C
 heksan (600 ml) ble sakte tilsatt. Det resulterende slurryet ble omrørt og varmet
 opp til romtemperatur. Faststoffet ble samlet opp ved filtrering, vasket med 10 %
 etylacetat i heksan (2x 400 ml) og deretter tørket under vakuum for å gi et hvitt
 fast stoff (350 g, 94 % avkastning) som det ønskede kondensatproduktet dietyl 2-
 ((2-kloro-5-(trifluorometyl)fenylamin)-metylen)-malonat **14**. ¹H NMR (400 MHz,
 DMSO-d₆) δ 11,28 (d, *J* = 13,0 Hz, 1H), 8,63 (d, *J* = 13,0 Hz, 1H), 8,10 (s, 1H),
 7,80 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 7,50 (dd, *J* = 1,5;8,4 Hz, 1H), 4,24 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H),
 4,17 (q, *J* = 7,1 Hz, 2 H), 1,27 (m, 6H).

Tilberedning av etyl 8-kloro-4-okso-5-(trifluorometyl)-1,4-dihydroquinolin-3-karboksylat (15).

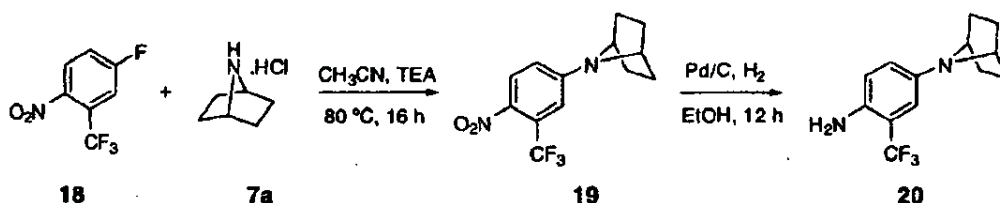
En 3-halset 1l-flaske med ladet med Dowtherm® (200 ml,
 8 ml/g), som ble avgasset ved 200 °C i 1 t. Løsemidlet ble varmet opp til 260 °C og
 ladet i porsjoner over 10 min. med dietyl 2-((2-kloro-5-(trifluorometyl)fenylamin)-
 methylene)-malonate **14** (25 g, 0,07 mol). Den resulterende blandingen ble omrørt
 ved 260 °C i 6,5 timer (t), og det resulterende etanolbiproduktet ble fjernet ved
 destillering. Blandingen ble langsomt kjølt til 80 °C. Heksan (150 ml) ble langsomt
 tilsatt i løpet av 30 minutter (min), etterfulgt av ytterligere 200 ml heksan tilsatt i
 én porsjon. Slurryet ble omrørt til det nådde romtemperatur. Faststoffet ble filtrert,
 vasket med heksan (3 × 150 ml) og deretter tørket under vakuum for å
 tilveiebringe etyl-8-klor-4-okso-5-(trifluormetyl)-1,4-dihydrokinolin-3-karboksylat
15 som et brunt faststoff (13,9 g, 65 % utbytte). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ
 11,91 (s, 1H), 8,39 (s, 1H), 8,06 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 7,81 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 4,24
 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H), 1,29 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H).

Fremstilling av etyl 4-okso-5-(trifluormetyl)-1H-quinolin-3-karboksylat (16). En trehalset 5 l-kolbe ble fylt med etyl-8-klor-4-okso-5-(trifluormetyl)-1,4-dihydrokinolin-3-karboksylat **15** (100 g, 0,3 mol), etanol (1250 ml, 12,5 ml/g) og trietylamin (220 ml, 1,6 mol). Beholderen ble deretter fylt med 10 g 10 % Pd/C (50 % våt) ved 5 °C. Reaksjonen ble omhyggelig omrørt under hydrogenatmosfære i 20 t ved 5 °C, hvorefter reaksjonsblandingen ble konsentrert til et volum på ca. 150 ml. Produktet, etyl 4-okso-5-(trifluormetyl)-1H-kinolin-3-karboksylat **16**, ble som et slurry med Pd/C ført direkte til neste trinn.

Fremstilling av 4-okso-5-(trifluormetyl)-1,4-dihydroquinolin-3-karboksylsyre (17). Etyl 4-okso-5-(trifluormetyl)-1H-kinolin-3-karboksylat **16** (58 g, 0,2 mol, ubehandlet reaksjonsslurry inneholdende Pd/C) ble suspendert i NaOH (814 ml av 5 M, 4,1 mol) i en 1 l-kolbe med tilbakeløpskondensator, og varmet opp ved 80 °C i 18 t, etterfulgt av ytterligere oppvarming ved 100 °C i 5 t. Reaksjonen ble filtrert varm nok, pakket med kelitt for fjerning av Pd/C og kelittet ble skylt med 1 N NaOH. Filtratet ble surgjort til ca. pH 1 for å oppnå et tykt hvitt presipitat. Presipitatet ble filtrert og deretter skylt med vann og kaldt acetonitril. Faststoffet ble deretter tørket under vakuum for å gi 4-okso-5-(trifluormetyl)-1,4-dihydrokinolin-3-karboksylsyre **17** som et hvitt faststoff (48 g, 92 % utbytte). ¹H NMR (400,0 MHz, DMSO-d₆) δ 15,26 (s, 1 H), 13,66 (s, 1 H), 8,98 (s, 1 H), 8,13 (dd, *J* = 1,6,7,8 Hz, 1 H), 8,06–7,99 (m, 2 H).

Mellomstadium 2: 4-(7-azabisyklo[2.2.1]heptan-7-yl)-2-(trifluormetyl)anilin (21). Syntesen av tittelforbindelsen beskrives i skjema 5.

Skjema 5



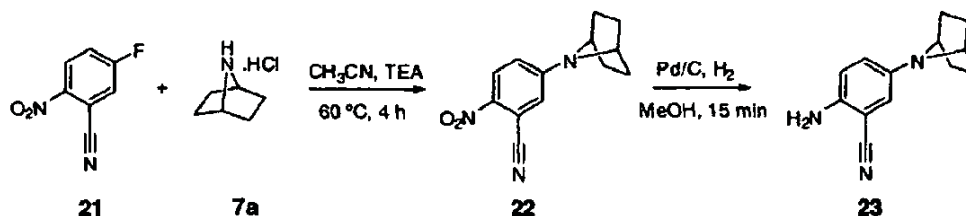
Fremstilling av 7-[4-nitro-3-(trifluormetyl)fenyl]-7-azabisyklo[2.2.1]heptan (20). Til en kolbe inneholdende 7-azabisyklo[2.2.1]heptanhydroklorid **7a** (4,6 g, 34,43 mmol, anskaffet fra Tyger Scientific Inc., 423 Stokes Avenue, Ewing, NJ, 08638, USA, under en nitrogenatmosfære) ble det tilsatt en løsning av 4-fluor-1-nitro-2-

(trifluormetyl)benzen **18** (6,0 g, 28,69 mmol) og trietylamin (8,7 g, 12,00 ml, 86,07 mmol) i acetonitril (50 ml). Reaksjonskolben ble varmet opp ved 80 °C under en nitrogenatmosfære i 16 t. Reaksjonsblandingen fikk kjøles ned og ble deretter separert mellom vann og diklorometan. Det organiske laget ble deretter vasket med 1 M HCl, tørket over Na₂SO₄, filtrert og konsentrert til tørt. Rensing ved hjelp av silikagelkromatografi (0–10 % etylacetat i heksaner) ga 7-[4-nitro-3-(trifluormetyl) fenyl]-7-azabisyklo[2.2.1]heptan **19** (7,2 g, 88 % utbytte) som et gult faststoff. ¹H NMR (400,0 MHz, DMSO-d₆) δ 8,03 (d, *J* = 9,1 Hz, 1H), 7,31 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H), 7,25 (dd, *J* = 2,6, 9,1 Hz, 1H), 4,59 (s, 2H), 1,69 - 1,67 (m, 4H), 1,50 (d, *J* = 7,0 Hz, 4H).

Fremstilling av 4-(7-azabisyklo[2.2.1]heptan-7-yl)-2-(trifluormetyl)anilin (20). En kolbe fylt med 7-[4-nitro-3-(trifluormetyl)fenyl]-7-azabisyklo[2.2.1]heptan **19** (7,07 g, 24,70 mmol) og 10 % Pd/C (0,71 g, 6,64 mmol) ble tømt og deretter spylt med nitrogen. Etanol (22 ml) ble tilsatt, og reaksjonskolben ble utstyrt med en hydrogenballong. Etter omhyggelig omrøring i 12 t ble reaksjonsblandingen spylt med nitrogen og Pd/C ble fjernet ved filtrering. Filtratet ble konsentrert til en mørk olje under redusert trykk, og resten ble rensset ved hjelp av silikagelkromatografi (0–15 % etylacetat i heksaner) for å tilveiebringe 4-(7-azabisyklo[2.2.1]heptan-7-yl)-2-(trifluormetyl)anilin **20** som et lilla faststoff (5,76 g, 91 % utbytte). ¹H NMR (400,0 MHz, DMSO-d₆) δ 6,95 (dd, *J* = 2,3; 8,8 Hz, 1H), 6,79 (d, *J* = 2,6 Hz, 1H), 6,72 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H), 4,89 (s, 2H), 4,09 (s, 2H), 1,61 - 1,59 (m, 4H) og 1,5 (d, *J* = 6,8 Hz, 4H).

Mellomstadium 3: 2-amino-5-(7-azabisyklo[2.2.1]heptan-7-yl)benzonitril (23). Syntesen av tittelforbindelsen beskrives i skjema 6.

Skjema 6



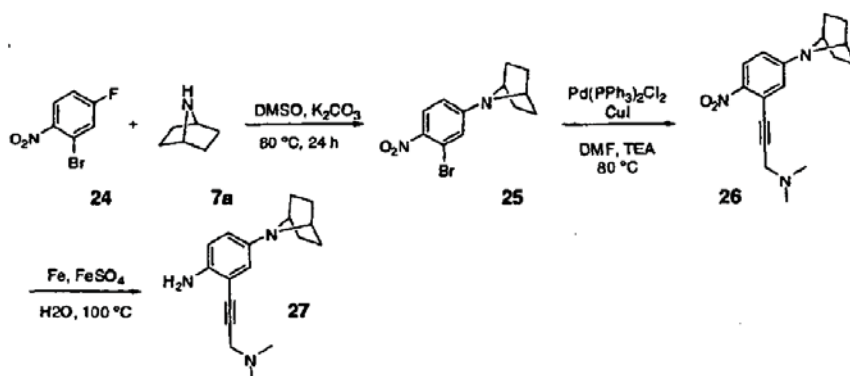
Fremstilling av 5-(7-azabisyklo[2.2.1]heptan-7-yl)-2-nitrobenzonitril (22). Til en oppløsning av 5-fluoro-2-nitrobenzonitril **21** (160 mg, 0,96 mmol) i acetonitril (1 ml) ble det sakte tilsatt 7-azabisyklo[2.2.1]heptanhydroklorid **7a** (129 mg, 0,96 mmol) og trietylamin (244 mg, 335,7 µL, 2,41 mmol).

Reaksjonen ble omrørt ved 60 °C i 4 t. Reaksjonen ble bråkjølt med vann, surgjort med 1 N HCl til pH 1 og ekstrahert med diklorometan (3x 10 ml). De kombinerte organiske lagene ble vasket med vann, tørket over MgSO₄, filtrert og konsentrert for å gi 5-(7-azabisyklo[2.2.1]heptan-7-yl)-2-nitrobenzonitril **22** (205 mg, 87 % avkastning). LCIMS *m/z* 244,3 [M+H]⁺, retensjonstid 1,69 min. (RP-C₁₈, 10 - 99 % CH₃CN/0,05 % TFA over 3 min.).

Tilberedelse av 2-amino-5-(7-azabisyklo[2.2.1]heptan-7-yl)benzonitril (23). En kolbe ladet med 5-(7-azabisyklo[2.2.1]heptan-7-yl)-2-nitrobenzonitril **22** (205 mg, 0,8427 mmol) og 10 % Pd/C (41 mg, 0,39 mmol) ble skylt med nitrogen og deretter evakuert under vakuum. Metanol (4 ml) ble tilsatt under nitrogenatmosfære og reaksjonskolben ble utstyrt med en hydrogenballong. Etter omrøring i 15 min. ble Pd/C fjernet ved filtrering og løsemidlet ble fjernet under redusert trykk for å gi 2-amino-5-(7-azabisyklo[2.2.1]heptan-7-yl)benzonitril **23** (170 mg, 95 % avkastning). ¹H NMR (400,0 MHz, DMSO-d₆) δ 7,02 (dd, *J* = 2,8; 9,0 Hz, 1H), 6,87 (d, *J* = 2,7 Hz, 1H), 6,68 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H), 5,36 (s, 2H), 4,09 (s, 2H), 1,59 (d, *J* = 6,8 Hz, 4H), 1,34 (d, *J* = 6,8 Hz, 4H).

Mellomstadium 4: 4-(7-azabisyklo[2.2.1]heptan-7-yl)-2-(3-(dimetylamoni)prop-1-ynyl)anilin (27). Syntesen av tittelforbindelsen beskrives i skjema 7.

Skjema 7



Fremstilling av 7-[3-brom-4-nitrofenyl]-7-azabisyklo[2.2.1]heptan (25).

Til en oppløsning med 2-brom-4-fluor-1-nitro-benzen **24** (1,1 g, 4,8 mmol) og K₂CO₃ (2,0 g, 14,3 mmol) i DMSO (8,400 ml), ble det porsjonsvis tilsatt 7-azabisyklo[2.2.1]heptan **7a** (765,4 mg, 5,7 mmol). Reaksjonen ble omrørt ved 80 °C i 24 t. Reaksjonen ble fortynnet med vann for å felle ut produktet. Faststoffet ble løst opp på nytt i diklormetan, vasket med 1,0 N HCl, tørket over

MgSO₄, filtrert og konsentrert for å gi 7-(3-bromo-4-nitrofenyl)-7-azabisyklo[2.2.1]heptan **25** (1,1 g, 78 % avkastning). Det ubearbeidede produktet ble anvendt direkte i det neste trinnet. LC/MS *m/z* 299,1 [M+H]⁺, retensjonstid 1,97 min. (RP-C₁₈, 10 - 99 % CH₃CN/0,05 % TFA over 3 min.).

5

Tilberedning av 3-[5-(7-azabisyklo[2.2.1]heptan-7-yl)-2-nitro-fenyl]-N,N-dimetyl-prop-2-yn-1-amin (26). Til 7-(3-brom-4-nitro-fenyl)-7-

10

azabisyklo[2.2.1]heptan **25** (500 mg, 1,683 mmol), Pd(PPh₃)₂Cl₂ (59 mg, 0,08 mmol) og kuprusjodd (9,616 mg, 1,708 µL, 0,05049 mmol) ble det tilsatt en oppløsning av N,N-dimetylprop-2-yn-1-amin (420 mg, 538 µl, 5,05 mmol) i avgasset DMF (5 ml) og trietylamin (5 ml). Reaksjonsblandingen ble mikrobølgebehandlet under N₂ i 10 min. ved 100. Reaksjonen ble fortynnet med etylacetat, vasket med 50 % mettet natriumbikarbonatoppløsning (2 X 20 ml), vann og saltvannsløsning. Oppløsningen ble tørket over vannfri Na₂SO₄ og filtrert, for å gi et rødt fast stoff. Rensing på silikagelkromatografi (0 - 50 % diklormetan i etylacetat) ga 3-[5-(7-azabisyklo[2.2.1]heptan-7-yl)-2-nitro-fenyl]-N,N-dimetyl-pro-2-yn-1-amin **26** (400 mg, 79 % avkastning). LC/MS *m/z* 300,5 [M+H]⁺, retensjonstid 1,11 min. (RP-C₁₈, 10 - 99 % CH₃CN/0,05 % TFA over 3 min.).

15

20

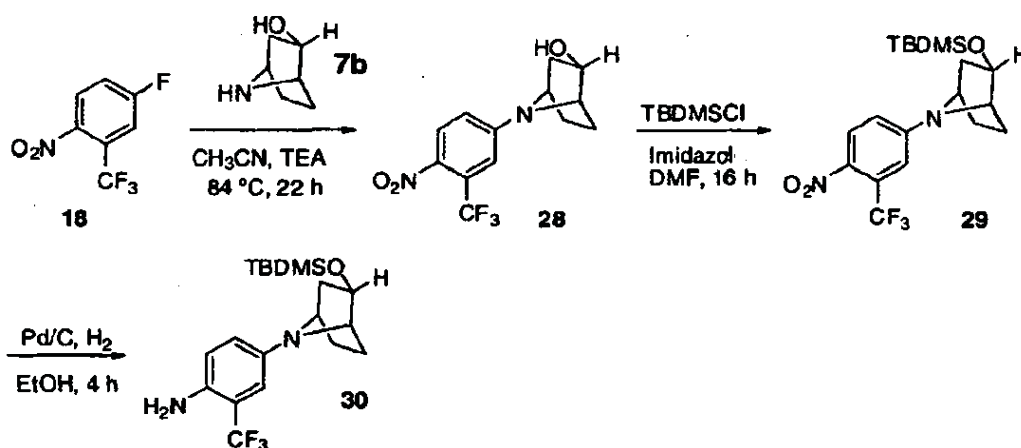
Tilberedning av 4-(7-azabisyklo[2.2.1]heptan-7-yl)-2-(3-(dimetylaminoprop-1-ynyl)anilin (27). 3-[5-(7-Azabisyklo[2.2.1]heptan-7-yl)-2-nitro-fenyl]-N,N-dimetyl-prop-2-yn-1-amin **26** (340 mg, 1,14 mmol), jern (634 mg, 11,36 mmol) og jernholdig sulfathetpahydrat (316 mg, 1,136 mmol) ble suspendert i vann (1 ml) og refluksert i 20 min. Reaksjonen ble filtrert og det faste stoffet vasket med metanol og diklormetan. Filtratet ble konsentrert og rensset på silikagelkromatografi ved bruk av (0 - 5 % metanol i diklormetan) for å gi 4-(7-azabisyklo[2.2.1]heptan-7-yl)-2-(3-dimetylaminoprop-1-ynyl)anilin **27** (148 mg, 48 % avkastning). LC/MS *m/z* 270,3 [M+H]⁺, retensjonstid 0,25 min. (RP-C₁₈, 10 - 99 % CH₃CN/0,05 % TFA over 3 min.).

25

30

Mellomstadium 5: ekso-4-(2-(tert-butyldimetylsilyloksy)-7-azabisyklo[2.2.1]heptan-7-yl)-2-(trifluorometyl)anilin (30). Syntesen av tittelforbindelsen beskrives i skjema 8.

Skjema 8



Fremstilling av **ekso-7-[4-nitro-3-(trifluormetyl)fenyl]-7-**

azabisyklo[2.2.1]heptan-5-ol (28). Til en kolbe inneholdende *ekso*-7-azabisyklo[2.2.1]heptan-2-ol **7b** (0,86 g, 5,74 mmol), ble det tilsatt under en nitrogenatmosfære en oppløsning av 4-fluoro-1-nitro-2-(trifluorometyl)benzen **18** (1 g, 4,78 mmol) og trietylamin (1,45 g, 2,0 ml, 14,35 mmol) acetonitril (8 ml). Reaksjonskolben ble varmet opp ved 84 °C under en nitrogenatmosfære i 22 t. Reaksjonsblandingen fikk kjøles ned og ble deretter delt i vann og etyl. Sjøktene ble separert, og det vandige sjiktet ble ekstrahert to ganger til med etylacetat. De kombinerte organiske lagene ble tørket over Na₂SO₄, filtrert og konsentrert til tørt. Rensing på silikagelkromatografi (0 - 50 % etylacetat i heksaner) ga *ekso*-7-[4-nitro-3-(trifluormetyl) fenyl]-7-azabisyklo[2.2.1]heptan-5-ol **28** (7,2 g, 88 % utbytte) som et gult faststoff (0,67 g, 46 % avkastning). LC/MS *m/z* 303,3 [M+H]⁺, retensjonstid 1,51 min. (RP-C₁₈, 10 - 99 % CH₃CN/0,05 % TFA over 3 min.).

Tilberedning av **ekso-tert-butyl-dimetyl-[[7-[4-nitro-3-(trifluorometyl)fenyl]-7-azabisyklo[2.2.1]heptan-5-yl]oksy]silan 29.**

Tert-butyl-kloro-dimetyl-silan (197 mg, 1,267 mmol) ble tilsatt en løsning med 4H-imidazol (144 mg, 2,11 mmol) i DMF (0,5. ml). Etter at løsningen sluttet å boble, ble *ekso*-7-[4-nitro-3-(trifluorometyl)phenyl]-7-azabisyklo[2.2.1]heptan-5-ol **28** (255 mg, 0,84 mmol) tilsatt som en oppløsning i DMF (0,6 ml) og omrørt ved romtemperatur i 14 t. Reaksjonen ble bråkjølt med vann og ekstrahert to ganger med dietyleter, tørket over MgSO₄, filtrert og konsentrert til en fargeløs olje. Rensing på silikagelkromatografi (0 - 40 % diklormetan i heksaner) ga *ekso*-tert-butyl-dimetyl-[[7-[4-nitro-3-(trifluorometyl)fenyl]-7-azabisyklo[2.2.1]heptan-5-yl]oksy]silan **29** (318 mg, 90 % avkastning) som en gul olje. ¹H NMR (400,0 MHz, DMSO- d₆) δ 8,01 (d, *J* = 9,2 Hz, 1H), 7,29 (d, *J*

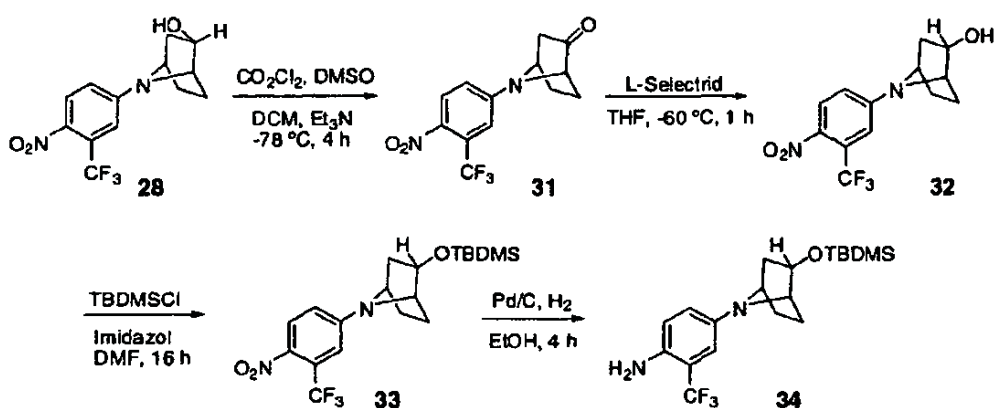
= 2,4 Hz, 1H), 7,19 (dd, J = 2,6; 9,2 Hz, 1H), 4,60 (t, J = 4,4 Hz, 1H), 4,47 (d, J = 5,2 Hz, 1H), 4,07 (dd, J = 2,0; 6,8 Hz, 1H), 1,94 (dd, J = 6,4, 12,8 Hz, 1H), 1,71 - 1,47 (m, 3H), 1,39 - 1,32 (m, 2H), 0,65 (s, 9H), 0,03 (s, 6H).

5 **Tilberedning av ekso-4-[5-[tert-butyl(dimetyl)silyl]oksy-7-azabisyklo[2.2.1]heptan-7-yl]-2-(trifluorometyl)anilin (30).** En kolbe inneholdende palladium på aktivert karbon (10 vektprosent, 30 mg, 0,28 mmol) ble evakuert, renses med N₂ og ladet med en oppløsning med ekso-tert-butyl-dimetyl-
10 [[7-[4-nitro-3-(trifluorometyl)fenyl]-7-azabisyklo[2.2.1]heptan-5-yl]oksy]silyl **29** (301 mg, 0,72 mmol) i etanol (3 ml). Kolben ble evakuert og deretter utstyrt med en ballong med H₂ og omrørt i 4 t. ved romtemperatur. Blandingen ble filtrert og konsentrert til tørr for å gi ekso-4-[5-[tert-butyl(dimetyl)silyl]oksy-7-azabisyklo[2.2.1]heptan-7-yl]-2-(trifluorometyl)anilin **30** (268 mg, 96 %
15 avkastning) som et off-white fast stoff. ¹H NMR (400,0 MHz, DMSO-d₆) δ 6,92 (dd, J = 2,4; 8,8 Hz, 1H), 6,77 (d, J = 2,6 Hz, 1H), 6,70 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 4,84 (s, 2H), 4,11 (t, J = 4,4 Hz, 1H), 3,91 - 3,89 (m, 2H), 1,82 (dd, J = 7,1; 12,3 Hz, 1H), 1,54 - 1,39 (m, 3H), 1,20 - 1,16 (m, 2H), 0,79 (s, 9H), 0,02 (s, 6H).

20 **Mellomstadium 6: endo-4-(2-(tert-butyldimetylsilyloksy)-7-azabisyklo[2.2.1]heptan-7-yl)-2-(trifluorometyl)anilin (34).**

Fremstillingen av tittelforbindelsen beskrives i skjema 9.

Skjema 9



25 **Tilberedelse av 7-azabisyklo[2.2.1]heptan-5-on (31).** Til en oppløsning med oksalyldiklor (165 mg, 113 µL, 1,27 mmol) i diklormetan (3 ml) under en nitrogenatmosfære ved -78 °C ble det tilsatt en oppløsning med DMSO (199 mg, 180 µL, 2,54 mmol) i diklormetan (0,7 ml) dråpevis. Reaksjonsblandingen ble omrørt i 30 min. og deretter ble en oppløsning med ekso-7-[4-nitro-3-

(trifluorometyl)fenyl]-7-azabisyklo[2.2.1]heptan-5-ol **28** (320 mg, 1,06 mmol) i diklormetan (2,5 ml) tilsatt dråpevis. Reaksjonen ble omrørt i enda 1 time ved -78 °C og deretter ble det tilsatt trietylamin (536 mg, 738 µL, 5,30 mmol) dråpevis og reaksjonen ble varmet opp til romtemperatur. Reaksjonsblandingen ble fortynnet med diklormetan, delt opp i diklormetan og vann og sjiktene separert. Det vandige laget ble ekstrahert én gang til med diklormetan. De kombinerte organiske lagene ble tørket over Na₂SO₄, filtrert og konsentrert til en gul olje. Rensing ved hjelp av silikagelkromatografi (0 - 30 % etylacetat i heksaner) ga 7-[4-nitro-3-(trifluormetyl)fenyl]-7-azabisyklo[2.2.1]heptan-5-on **31** (266 mg, 84 % avkastning) som et gult faststoff. ¹H NMR (400,0 MHz, DMSO- d₆) δ 8,06 (d, *J* = 9,1 Hz, 1H), 7,47 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H), 7,39 (dd, *J* = 2,6; 9,1 Hz, 1H), 4,98 (t, *J* = 4,5 Hz, 1H), 4,84 (d, *J* = 5,4 Hz, 1H), 2,44 (d, *J* = 3,1 Hz, 1H), 2,23 (d, *J* = 16 Hz, 1H), 2,00 - 1,92 (m, 1H), 1,88 - 1,70 (m, 2H), 1,66 - 1,60 (m, 1H),

Fremstilling av endo-7-[4-nitro-3-(trifluormetyl)fenyl]-7-azabisyklo[2.2.1]heptan-5-ol (32). Til en oppløsning av 7-[4-nitro-3-(trifluorometyl)fenyl]-7-azabisyklo[2.2.1]heptan-5-on **31** (261 mg, 0,87 mmol) i THF (11 ml) ved -55 °C under en nitrogenatmosfære ble det tilsatt en oppløsning av litiumhydrido-trisek-butyl-boron (1,04 ml med 1 M, 1,04 mmol) dråpevis. Etter 30 min. ble reaksjonsblandingen overført til et isvannbad og omrøringen fortsatte. Reaksjonsblandingen ble bråkjølt med metanol (1,2 ml) ved 0 °C. Reaksjonsblandingen ble delt opp i diklormetan/vann, separert og det vandige sjiktet ble ekstrahert to ganger til med diklormetan. De kombinerte organiske lagene ble tørket over Na₂SO₄, filtrert og konsentrert til tørt. Rensing ved hjelp av silikagelkromatografi (0 - 50 % etylacetat i heksaner) ga endo-7-[4-nitro-3-(trifluormetyl)fenyl]-7-azabisyklo[2.2.1]heptan-5-on **32** (222 mg, 84 % avkastning) som et gult faststoff. ¹H NMR (400,0 MHz, DMSO- d₆) δ 8,01 (d, *J* = 9,1 Hz, 1H), 7,27 (d, *J* = 3,0 Hz, 1H), 7,22 (dd, *J* = 2,6; 9,1 Hz, 1H), 5,17 (d, *J* = 4,4 Hz, 1H), 4,49 (t, *J* = 4,9 Hz, 1H), 4,44 (t, *J* = 4,5 Hz, 1H), 4,16 - 4,10 (m, 1H), 2,20 - 2,06 (m, 2H), 1,67 - 1,44 (m, 3H), 1,09 (dd, *J* = 3,5, 12,4 Hz, 1H).

Tilberedning av endo-tert-butyl-dimetyl-[[7-[4-nitro-3-(trifluorometyl)fenyl]-7-azabisyklo[2.2.1]heptan-5-yl]oksy]silan (33). Tert-butylklorodimetylsilan (168 mg, 1,08 mmol) ble tilsatt en oppløsning med 4*H*-imidazol (122 mg, 1,80 mmol) i DMF (425,3 µl). Etter at oppløsningen sluttet å boble, ble endo-7-[4-nitro-3-(trifluorometyl)fenyl]-7-azabisyklo[2.2.1]heptan-5-ol **32** (217 mg, 0,72 mmol) tilsatt som en

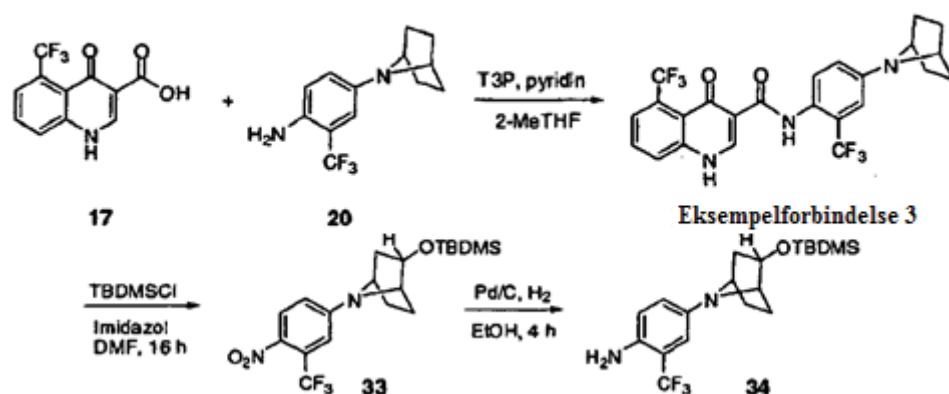
oppløsning i DMF (1 ml) og omrørt ved romtemperatur i 14 t. Reaksjonen ble bråkjølt med vann og ekstrahert to ganger med dietyleter, tørket over MgSO₄, filtrert og konsentrert til en fargeløs olje. Rensing på silikagelkromatografi (0 - 40 % diklormetan i heksaner) ga *endo*-tert-butyl-dimetyl-[[7-[4-nitro-3-(trifluorometyl)fenyl]-7-azabisyklo[2.2.1]heptan-5-yl]oksy]silan **33** (251 mg, 84 % avkastning) som en gul olje. ¹H NMR (400,0 MHz, DMSO- d₆) δ 8,01 (d, *J* = 9,1 Hz, 1H), 7,32 (d, *J* = 2,3 Hz, 1H), 7,26 (dd, *J* = 2,5; 9,1 Hz, 1H), 4,54 - 4,51 (m, 2H), 4,29 - 4,26 (m, 1H), 2,20 - 2,11 (m, 2H), 1,67 - 1,45 (m, 3H), 1,08 (dd, *J* = 3,2; 12,4 Hz, 1H), 0,88 (s, 9H), 0,07 (d, *J* = 2,6 Hz, 6H).

Tilberedning av *endo*-4-[5-[tert-butyl(dimetyl)silyl]oksy-7-azabisyklo[2.2.1]heptan-7-yl]-2-(trifluorometyl)anilin (34). En kolbe inneholdende palladium på aktivert karbon (10 vektprosent, 24 mg, 0,23 mml) ble evakuert og deretter rensset under en nitrogenatmosfære. Til dette ble tilsatt en oppløsning av *endo*-tert-butyl-dimetyl-[[7-[4-nitro-3-(trifluorometyl)fenyl]-7-azabisyklo[2.2.1]heptan-5-yl]oksy]silan (**33**) (24 mg, 0,58 mmol) i etanol (5 ml). Reaksjonsblandingen ble evakuert og deretter utstyrt med en ballong med H₂ og omrørt i 4 t. ved romtemperatur. Blandingen ble filtrert og konsentrert til tørr for å gi *endo*-4-[5-[tert-butyl(dimetyl)silyl]oksy-7-azabisyklo[2.2.1]heptan-7-yl]-2-(trifluorometyl)anilin **34** (222 mg, 100 % avkastning) som et off-white fast stoff. ¹H NMR (400,0 MHz, DMSO- d₆) δ 6,95 (dd, *J* = 2,4; 8,8 Hz, 1H), 6,79 (d, *J* = 2,6 Hz, 1H), 6,72 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H), 4,91 (s, 2H), 4,24 - 4,19 (m, 1H), 4,06 - 4,03 (m, 2H), 2,12 - 1,99 (m, 2H), 1,55 - 1,53 (m, 1H), 1,42 - 1,36 (m, 2H), 0,96 (dd, *J* = 3,2; 12,2 Hz, 1H), 0,87 (s, 9H), 0,05 (s, 6H).

Eksempelforbindelse 3: N-(4-(7-azabisyklo[2.2.1]heptan-7-yl)-2-(trifluormetyl)fenyl)-4-okso-5-(trifluormetyl)-1,4-dihydrokinolin-3-karboksamid

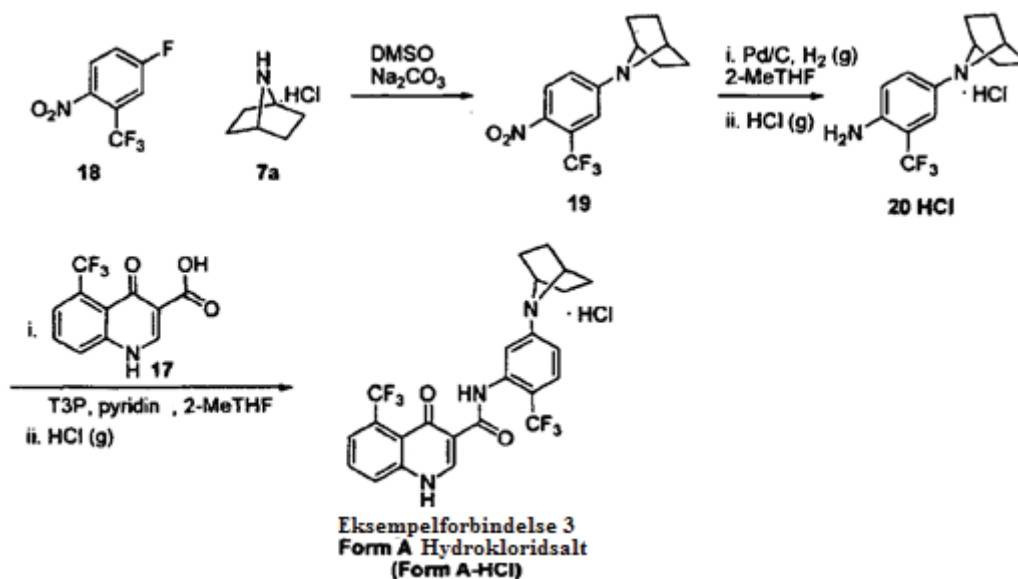
Fremstillingen av tittelforbindelsen beskrives i skjema 10.

Skjema 10



Til en løsning av 4-okso-5-(trifluormetyl)-1H-kinolin-3-karboksylsyre 17 (9,1 g, 35,39 mmol) og 4-(7-azabisyklo[2.2.1]heptan-7-yl)-2-(trifluormetyl)anilin 20 (9,2 g, 35,74 mmol) i 2-metyltetrahydrofuran (91,00 ml) ble det tilsatt syklisk propylfosfonsyreanhydrid (50 % løsning i etylacetat, 52,68 ml, 88,48 mmol) og pyridin (5,6 g, 5,73 ml, 70,78 mmol) ved romtemperatur. Reaksjonskolben ble varmet opp ved 65 °C i 10 t under nitrogenatmosfære. Etter kjøling til romtemperatur ble reaksjonen deretter fortynnet med etylacetat og bråkjølt med mettet Na₂CO₃-løsning (50 ml). Sjøktene ble separert, og det vandige sjiktet ble ekstrahert to ganger til med etylacetat. De kombinerte organiske lagene ble vasket med vann, tørket over Na₂SO₄, filtrert og konsentrert til et lærfarget faststoff. Det ubehandlede faste produktet ble blandet til slurry i etylacetat/dietyleter (2 : 1), samlet inn ved vakuumfiltrering og vasket to ganger til med etylacetat/dietyleter (2 : 1) for å tilveiebringe produktet som et lett, gult krystallinsk pulver. Pulveret ble oppløst i varmt etylacetat og absorbert på Celite. Rensing ved hjelp av silikagelkromatografi (0 - 50 % etylacetat i diklormetan) tilveiebrakte N-(4-(7-azabisyklo[2.2.1]heptan-7-yl)-2-(trifluormetyl)fenyl)-okso-5-(trifluormetyl)-1,4-dihydrokinolin-3-karboksamid som et hvitt, krystallinsk faststoff (13,5 g, 76 % avkastning). LC/MS *m/z* 496,0 [M+H]⁺, retensjonstid 1,48 min. (RP-C₁₈, 10 - 99 % CH₃CN/0,05 % TFA over 3 min.). ¹H NMR (400,0 MHz, DMSO-d₆) δ 13,08 (s, 1H), 12,16 (s, 1H), 8,88 (s, 1H), 8,04 (dd, *J* = 2,1, 7,4 Hz, 1H), 7,95 - 7,88 (m, 3H), 7,22 (dd, 2,5; 8,9 Hz, 1H), 7,16 (d, *J* = 2,5 Hz, 1H), 4,33 (s, 2H), 1,67 (d, *J* = 6,9 Hz, 4H), 1,44 (d, *J* = 6,9 Hz, 4H).

Eksempelforbindelse 3, Form A, HCl-salt N-(4-(7-azabisyklo[2.2.1]heptan-7-yl)-2-(trifluormetyl)fenyl)-4-okso-5-(trifluormetyl)-1,4-dihydrokinolin-3-karboksamidhydroklorid (form A-HCl).

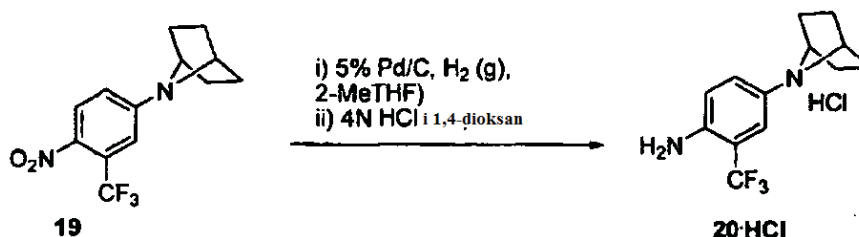


Fremstilling av 7-[4-nitro-3-(trifluorometyl)fenyl]-7-azabisyklo[2.2.1]heptan (19). 4-fluor-1-nitro-2-(trifluorometyl)benzen (18) (901 g) ble tilsatt til en 30 l overtrukket beholder. Natriumkarbonat (959,1 g) og 5 l dimetylsulfoksid (DMSO) ble tilsatt og blandingen ble omrørt under en nitrogenatmosfære. 7-azabisyklo[2.2.1]heptanhydroklorid (7a) (633,4 g) ble tilsatt beholderen i porsjoner. Temperaturen på blandingen ble økt gradvis til 55 °C og reaksjonen ble overvåket av HPLC. Da substratet var mindre enn 1 % AUC, ble reaksjonen ansett fullført. Blandingen ble deretter fortynnet med 10 vol. 2-metyltetrahydrofuran og vasket med 5,5 vol. vann tre ganger inntil det ikke var DMSO igjen i det vandige laget som determinert av HPLC, for å gi 7-[4-nitro-3-(trifluorometyl)fenyl]-7-azabisyklo[2.2.1]heptan (19) i 2-metyltetrahydrofuran (ca. 95 % avkastning).

Fremstilling av hydrokloridsalt av 4-(7-azabisyklo[2.2.1]heptan-7-yl)-2-(trifluorometyl)aniline (20 HCl). Palladium på karbon (150 g, 5 % vektprosent) ble laget i en Büchi-hydrogenerator (20 l kapasitet) under en nitrogenatmosfære etterfulgt av tilsetning av 7-[4-nitro-3-(trifluorometyl)fenyl]-7-azabisyklo[2.2.1]heptan (19) (1500 g) og 2-metyltetrahydrofuran (10,5 l, 7 vol.). Hydrogengass ble ladet inn i den lukkede hydrogeneratoren til et trykk på 0,5 bar. Det ble anvendt vakuum i ca. 2 min. etterfulgt av introduksjonen av hydrogengass til et trykk på 0,5 bar. Denne prosessen ble gjentatt 2 ganger. Hydrogengass ble deretter kontinuerlig ladet til blandingen ved et trykk på 0,5 bar. Blandingen ble deretter omrørt ved en temperatur på mellom 18 og 23 °C ved nedkjøling av beholdermuffen. Et vakuum ble anvendt på beholderen når det ikke lenger ble

konsumert noen hydrogengass og det ikke var videre eksoterm. Nitrogengass ble deretter ladet inn i beholderen ved 0,5 bar og et vakuum ble på nytt anvendt, etterfulgt av en andre ladning på 0,5 bar nitrogengass. Når HPLC-en for en filtrert alikvot viste at ingen 7-[4-nitro-3-(trifluorometyl)fenyl]-7-azabisyklo[2.2.1]heptan (**19**) var igjen (f.eks., $\leq 0,5\%$), ble reaksjonsblandingen overført til en mottaksflaske under nitrogenatmosfære via en filtertrakt ved bruk av et kelittfilter. Kelittfilterkaken ble vasket med 2-metyltetrahydrofuran (3 l, 2 vol.). Vaskevannet og filtratet ble lastet inn i en beholder utstyrt med visp, temperaturkontroll og en nitrogenatmosfære. 4 M HCl i 1,4-dioksan (1 vol.) ble tilsatt fortløpende over 1 t. inn i beholderen ved 20 °C. Blandingen ble omrørt i ytterligere 10 t. (eller over natten), filtrert og vasket med 2-metyltetrahydrofuran (2 vol.) og tørket for å generere 1519 g av hydrokloridsaltet av 4-(7-azabisyklo[2.2.1] heptan-7-yl)-2-(trifluorometyl)anilin (**20·HCl**) som et hvitt, fast krystallinsk stoff (ca. 97 % avkastning).

Alternativ tilberedning av hydrokloridsalt av 7-[4-amino-3-(trifluorometyl)fenyl]-7-azabisyklo[2.2.1]heptan (**20·HCl**).



Palladium på karbon (5 vektprosent) i en Büchi-hydrogenator (20 l kapasitet) ble introdusert under nitrogen etterfulgt av tilsetning av 7-[4-nitro-3-(trifluorometyl)fenyl]-7-azabisyklo[2.2.1]heptan **19** (1500 g) og 2-metyltetrahydrofuran (10,5 l, 7 vol.). Hydrogengass ble ladet inn i beholderen til et trykk på 0,5 bar. Det ble anvendt vakuum (2 min.) etterfulgt av introduksjonen av hydrogengass til et trykk på 0,5 bar. Denne prosessen ble gjentatt to ganger til og deretter ble hydrogengass ladet til hydrogenatoren fortløpende ved 0,5 bar, og omrøring begynte. Temperaturen på reaksjonsblandingen ble opprettholdt ved 18 til 23 °C ved nedkjøling av beholdermuffen. Et vakuum ble anvendt på beholderen når det ikke lenger ble konsumert noen hydrogengass og det ikke var videre eksoterm. Nitrogengass ble deretter ladet til beholderen, og det ble på nytt anvendt vakuum etterfulgt av en nitrogengassladning på 0,5 bar. Reaksjonen ble ansett fullført når en HPLC for en filtrert alikvot viste at 7-[4-nitro-3-(trifluorometyl) fenyl]-7-

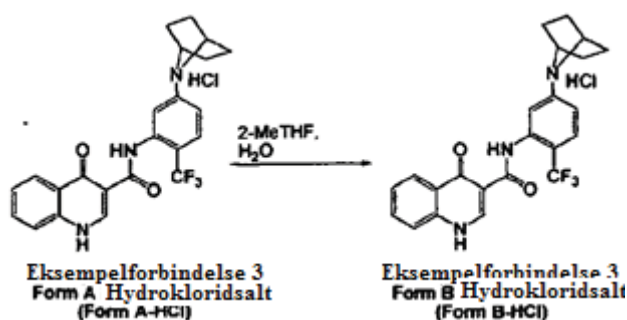
azabisyklo[2.2.1]heptan ikke ble registrert ($\leq 0,5\%$). Reaksjonsblandingen ble deretter filtrert gjennom kelitt. Den gjenværende slurryen ble overført til en mottaksflaske under nitrogengass via en filtertrakt inneholdende et kelittfilter. Kelittkaken ble vasket med 2-metyltetrahydrofuran (3 l, 2 vol.). Filtratet og vaskevannet ble overført til en beholder utstyrt med en røremekanisme, temperaturkontroll og en nitrogenatmosfære. 4 M HCl i 1,4-dioksan (1 vol.) ble tilsatt fortløpende over 1 t. inn i beholderen ved 20 °C. Den resulterende blandingen ble omrørt i ytterligere 10 t., filtrert og vasket med 2-metyltetrahydrofuran (2 vol.) og tørket for å generere 1519 g 7-[4-amino-3-(trifluorometyl) fenyl]-7-azabisyklo[2.2.1]heptanhydroklorid (**20·HCl**) som et hvitt krystallinsk faststoff.

***N*-(4-(7-azabisyklo[2.2.1]heptan-7-yl)-2-(trifluorometyl)fenyl)-4-okso-5-(trifluorometyl)-1,4-dihydrokinolin-3-karboksamidhydroklorid (form A·HCl).**

2-metyltetrahydrofuran (0,57 l, 1,0 vol.) ble ladet inn i en 30 l muffekledd reaksjonsbeholder, etterfulgt av tilsetning av hydrokloridsalt av 4-(7-azabisyklo[2.2.1]heptan-7-yl)-2-(trifluorometyl)anilin (**20·HCl**) (791 g, 2,67 mol) og 4-okso-5-(trifluorometyl)-1,4-dihydrokinolin-3-karboksylsyre (**17**) (573 g, 2,23 mol) og ytterligere 5,2 l (9,0 vol.) av 2-metyltetrahydrofuran. Omrøring tok til og T3P i 2-metyltetrahydrofuran (2,84 kg, 4,46 mol) ble tilsatt til reaksjonsblandingen over 15 min. Pyridin (534,0 g, 546,0 ml, 6,68 mol) ble deretter tilsatt dråpevis via en tilsetningstrakt over 30 min. Blandingen ble varmet opp til 45 °C over ca. 30 min. og omrørt i 12 – 15 t. HPLC-analyse indikerte at 4-okso-5-(trifluorometyl)-1,4-dihydrokinolin-3-karboksylsyre forekom i en mengde på mindre enn 2 %. Blandingen ble avkjølt til romtemperatur. 2-metyltetrahydrofuran (4 vol, 2,29 l) ble tilsatt etterfulgt av vann (6,9 vol, 4 l), mens temperaturen ble holdt under 30 °C. Vannlaget ble fjernet og det organiske laget ble forsiktig vasket to ganger med NaHCO₃-mettet vandig løsning. Det organiske laget ble deretter vasket med 10 vektprosent sitronsyre (5 vol) og endelig med vann (7 vol). Blandingen ble polert, filtrert og overført til en annen tørr beholder. Såkrystaller for *N*-(4-(7-azabisyklo[2.2.1]heptan-7-yl)-2-(trifluorometyl)fenyl)-4-okso-5-(trifluorometyl)-1,4-dihydrokinolin-3-karboksamidhydroklorid (**form A·HCl**) (3,281 g, 5,570 mmol) fra et tidligere parti ble tilsatt. HCl (g) (10 ekv) ble boblet over 2 t. og blandingen ble omrørt over natten. Den resulterende suspensjonen ble filtrert, vasket med 2-metyltetrahydrofuran (4 vol), suksjonstørket og ovnstørket ved 60 °C inntil konstant vektgenerering 868 g

av *N*-(4-(7-azabisyklo[2.2.1]heptan-7-yl)-2-(trifluorometyl)fenyl)-4-okso-5-(trifluorometyl)-1,4-dihydrokinolin-3-karboksamidhydroklorid (form A-HCl).

Eksempelforbindelse 3, Form B, HCl-salt *N*-(4-(7-azabisyklo[2.2.1]heptan-7-yl)-2-(trifluorometyl)fenyl)-4-okso-5-(trifluorometyl)-1,4-dihydrokinolin-3-karboksamidhydroklorid (form B-HCl).

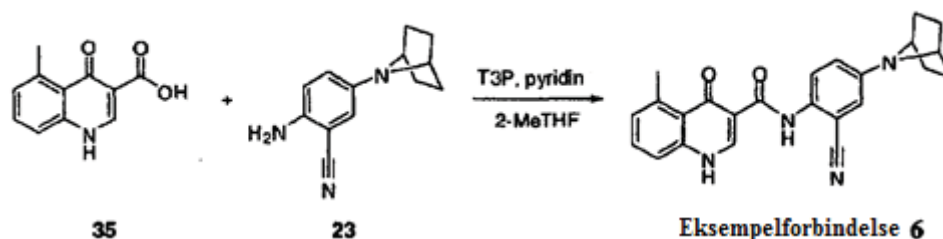


2-metyltetrahydrofuran (100 ml) ble lastet inn i en 3-halset flaske med en nitrogenatmosfære utstyrt med en omrører. Eksempelforbindelse 3 form A-HCl (eksempel 3B, 55 g, 0,103 mol) ble tilsatt flasken etterfulgt av 349 ml av 2-metyltetrahydrofuran og omrøring begynte. 28 ml vann ble tilsatt i flasken og flasken ble varmet opp til en indre temperatur på 60 °C og omrørt i 48 t. Flasken ble nedkjølt til romtemperatur og omrørt i 1 t. Reaksjonsblandingen ble vakuumfiltrert inntil filterkaken var tørr. Den faste filterkaken ble vasket med 2-metyltetrahydrofuran (4 l, 2 vol) to ganger. Den faste filterkaken ble værende under vakuumsug i en periode på ca. 30 minutter og ble overført til et tørkebrett. Filterkaken ble tørket til en konstant vekt under vakuum ved 60 °C for å gi eksempelforbindelse 3 form B-HCl som et hvitt krystallisk fast stoff (49 g) (ca. 90 % avkastningen).

Eksempelforbindelse 6: Tilberedning av *N*-(4-(7-azabisyklo[2.2.1]heptan-7-yl)-2-cyanofenyl)-5-metyl-4-okso-1,4-dihydrokinolin-3-karboksamid.

Fremstillingen av tittelforbindelsen beskrives i skjema 11.

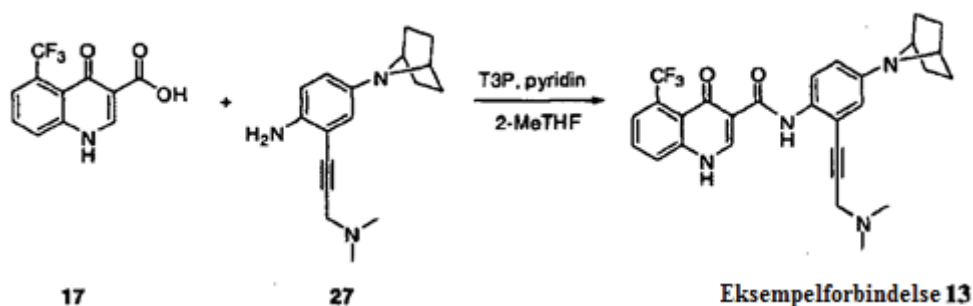
Skjema 11



Til en løsning av 5-metyl-4-okso-1,4-dihydrokinolin-3-karboksytsyre **35** (162 mg, 0,80 mmol) og 2-amino-5-(7-azabisyklo[2.2.1]heptan-7-yl)benzonitril **23** (170 mg, 0,80 mmol) i 2-metyltetrahydrofuran (1,5 ml) ble tilsatt propylfosfonsyre syklisk vannfri (50 % løsning i etylacetat, 949,5 µl, 1,605 mmol) og pyridin (126 mg, 129 µL, 1,60 mmol). Reaksjonen ble avbrutt og varmet opp ved 100 °C i 65 min. med mikrobølgestråling. Reaksjonen ble nedkjølt til romtemperatur, fortynnet med etylacetat (10 ml) og bråkjølt med mettet Na₂CO₃-løsning (6 ml). Det organiske laget ble tørket over Na₂SO₄, filtrert og konsentrert. Rensing på silikagelkromatografi (0 - 35 % etylacetat i diklormetan) ga N-(4-(7-azabisyklo[2.2.1]heptan-7-yl)-2-cyanofenyl)-5-metyl-4-okso-1,4-dihydrokinolin-3-karboksamid (157 mg, 49 % avkastning). LC/MS *m/z* 399,3 [M+H]⁺, retensjonstid 1,47 min. (RP-C₁₈, 10 - 99 % CH₃CN/0,05 % TFA over 3 min.). ¹H NMR (400,0 MHz, DMSO-d₆) δ 12,77 (s, 1H), 12,75 (s, 1H), 8,77 (s, 1H), 8,11 (d, *J* = 9,1 Hz, 1H), 7,64 - 7,60 (m, 1H), 7,55 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7,34 (d, *J* = 2,8 Hz, 1H), 7,27 (dd, *J* = 2,8, 9,1 Hz, 1H), 7,23 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H), 4,32 (s, 2H), 2,91 (s, 3H), 1,65 (d, *J* = 7,2 Hz, 4H), 1,42 (d, *J* = 6,8 Hz, 4H).

Eksempelforbindelse 13: N-[4-(7-azabisyklo[2.2.1]heptan-7-yl)-2-(3-dimetylamino-1-ynyl)fenyl]-4-okso-5-(trifluorometyl)-1H-kinolin-3-karboksamid. Fremstillingen av tittelforbindelsen beskrives i skjema 12.

Skjema: 12

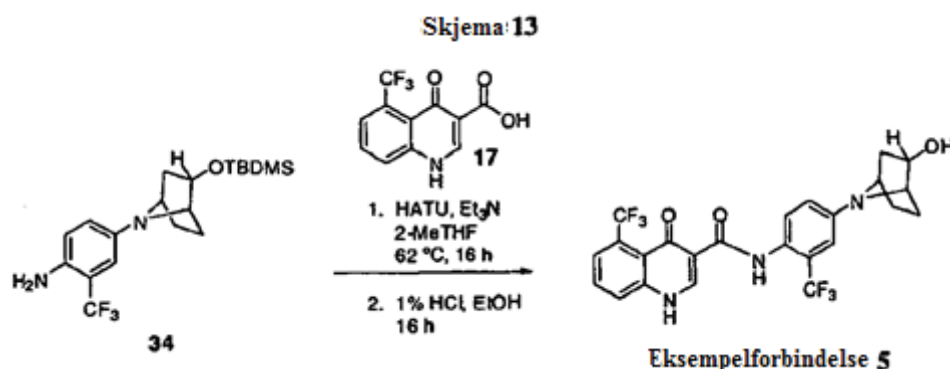


Til en løsning av 4-okso-5-(trifluorometyl)-1H-kinolin-3-karboksytsyre **17** (19 mg, 0,07 mmol) og 4-(7-azabisyklo[2.2.1]heptan-7-yl)-2-(3-dimetylamino-1-ynyl)anilin **27** (20 mg, 0,07 mmol) i 2-metyltetrahydrofuran (190,9 µl) ble tilsatt T3P (118 mg, 0,19 mmol) og pyridin (12 mg, 12 µl, 0,15 mmol). Reaksjonen ble varmet opp ved 100 °C i 30 min. under mikrobølgestråling. Reaksjonen ble fortynnet med EtOAc og bråkjølt med mettet, vandig NaHCO₃ (50 ml). Sjøktene ble separert og det vandige sjiktet ble ekstrahert to ganger med EtOAc. De

kombinerte organiske materialene ble vasket én gang med vann, tørket over Na_2SO_4 , filtrert og konsentrert. Resten ble rensert ved reversfase-HPLC (0 - 99 % $\text{CH}_3\text{CN}/0,05\%$ TFA) for å gi N-[4-(7-azabisyklo[2.2.1]heptan-7-yl)-2-(3-

dimetylaminoprop-1-ynyl)fenyl]-4-okso-5-(trifluorometyl)-1H-kinolin-3-karboksamid (8 mg, 17 % avkastning). LC/MS m/z 509,7 $[\text{M}+\text{H}]^+$, retensjonstid 1,06 min. (RP- C_{18} , 10 - 99 % $\text{CH}_3\text{CN}/0,05\%$ TFA over 3 min.). ^1H NMR (400,0 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 13,23 (d, $J = 6,8$ Hz, 1H), 12,40 (s, 1H), 10,31 (s, 1H), 8,96 (d, $J = 6,6$ Hz, 1H), 8,40 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H), 8,08 - 8,06 (m, H), 8,07 (dd, $J = 1,5$ Hz, 8,1 Hz, 1H), 8,00 - 7,95 (m, 2H), 7,15 - 7,09 (m, 2H), 4,49 (s, 2H), 4,29 (s, 2H), 2,94 (s, 6H), 1,67 (d, $J = 7,2$ Hz, 4H), 1,44 (d, $J = 7,0$ Hz, 4H).

Eksempelforbindelse 5: *Endo-N-(4-[(5S)-5-[tert-butyl(dimetyl)silyl]oksy-7-azabisyklo[2.2.1]heptan-7-yl]-2-(trifluorometyl)fenyl]-4-okso-5-(trifluorometyl)-1H-kinolin-3-karboksamid.* Fremstillingen av tittelforbindelsen beskrives i skjema 13.



Tilberedning av *endo-N-(4-[(5S)-5-[tert-butyl(dimetyl)silyl]oksy-7-azabisyklo[2.2.1]heptan-7-yl]-2-(trifluorometyl)fenyl]-4-okso-5-(trifluorometyl)-1H-kinolin-3-karboksamid.* Til en løsning av 4-okso-5-(trifluorometyl)-1H-kinolin-3-karbosylsyre 17 (148 mg, 0,58 mmol), O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetrametyluroniumheksafluorofosfat (HATU) (306 mg, 0,81 mmol) i 2-metyltetrahydrofuran (2,2 ml) ble det tilsatt *endo*-4-[5-[tert-butyl(dimetyl)silyl]oksy-7-azabisyklo[2.2.1]heptan-7-yl]-2-(trifluorometyl)anilin 34 (222 mg, 0,58 mmol) etterfulgt av trietylamin (146 mg, 201 μl , 1,44 mmol). Reaksjonsblandingen ble varmet opp ved 62 °C i 16 t. Reaksjonsblandingen fikk kjøles ned til romtemperatur og ble delt mellom 2-metyltetrahydrofuran/vann, separert og det vandige sjiktet ble ekstrahert en gang til med 2-metyltetrahydrofuran, de organiske lagene ble kombinert, tørket over Na_2SO_4 , filtrert og konsentrert til tørt. Rensing på silikagelkromatografi (0 - 30 %

etylacetat i diklormetan) ga *endo*-N-(4-[(5S)-5-[tert-butyl(dimetyl)silyl]oksy-7-azabisyklo[2.2.1]heptan-7-yl]-2-(trifluorometyl)fenyl]-4-okso-5-(trifluorometyl)-1H-kinolin-3-karboksamid (285 mg, 79 % avkastning). ¹H NMR (400,0 MHz, DMSO-d₆) δ 13,07 (s, 1H), 12,16 (s, 1H), 8,88 (s, 1H), 8,04 (dd, J = 2,2, 7,3 Hz, 1H), 7,95 - 7,89 (m, 3H), 7,22 (dd, J = 2,4; 8,9 Hz, 1H), 7,16 (d, J = 2,6 Hz, 1H), 4,29 (m, 3H), 2,16 - 2,07 (m, 2H), 1,62 - 1,43 (m, 3H), 1,05 - 1,01 (m, 1H), 0,89 (s, 9H), 0,08 (d, J = 1,4 Hz, 6H).

Tilberedning av *endo*-N-(4-[(5S)-5-hydroksy-7-azabisyklo[2.2.1]heptan-7-yl]-2-(trifluorometyl)fenyl]-4-okso-5-(trifluorometyl)-1H-kinolin-3-karboksamid. *Endo*-N-[4-[(5S)-5-[tert-butyl(dimetyl)silyl]oksy-7-azabisyklo[2.2.1]heptan-7-yl]-2-(trifluorometyl)fenyl]-4-okso-5-(trifluorometyl)-1H-kinolin-3-karboksamid (281 mg, 0,45 mmol) ble oppløst i 1 % HCl/Etanol (2 ml av 1 vektprosent) løsning og omrørt ved en romtemperatur i 16 t., resulterende i et hvitt bunnfall. Reaksjonen ble tynnet med dietyleter og filtrert. Det oppsamlede faste stoffet ble løst opp i etylacetat/mettet vandig NaHCO₃ løsning. Sjiktene ble separert, og det vandige sjiktet ble ekstrahert én gang til med etylacetat. De organiske sjiktene ble vasket to ganger med vann, tørket over Na₂SO₄, filtrert og konsentrert til tørt for å gi *endo*-N-[4-[(5S)-5-hydroksy-7-azabisyklo[2.2.1]heptan-7-yl]-2-(trifluorometyl)fenyl]-4-okso-5-(trifluorometyl)-1H-kinolin-3-karboksamid (190 mg, 83 %). ¹H NMR (400,0 MHz, DMSO-d₆) δ 13,07 (s, 1H), 12,15 (s, 1H), 8,88 (s, 1H), 8,04 (dd, J = 2,2, 7,4 Hz, 1H), 7,95 - 7,88 (m, 3H), 7,19 (dd, J = 2,4; 9,0 Hz, 1H), 7,12 (d, J = 2,6 Hz, 1H), 5,00 (d, J = 4,2 Hz, 1H), 4,25 - 4,13 (m, 1H), 4,21 - 4,19 (m, 1H), 4,16 - 4,13 (m, 1H), 2,15 - 2,08 (m, 2H), 1,61 - 1,55 (m, 1H), 1,47 - 1,44 (m, 2H) og 1,03 (dd, J = 3,4, 12,3 Hz, 1H).

Analytiske data for forbindelsene i tabell 1 vises nedenfor:

30

Tabell 2

Eksempelfor bindelse nr.	LC/MS M+1	LC/RT ^a minutter	NMR
1	456,50	1,76	¹ H NMR (400,0 MHz, DMSO-d ₆) δ 12,94 (d, J = 6,1 Hz, 1H), 12,36 (s, 1H), 8,80 (d, J = 6,8 Hz,

Eksempelfor bindelse nr.	LC/MS M+1	LC/RT ^a minutter	NMR
			1H), 8,13 (s, 1H), 7,98 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H), 7,68-7,63 (m, 2H), 7,10 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H), 7,01 (s, 1H), 4,28 (s, 2H), 2,48 (s, 3H), 2,02 - 2,00 (m, 2H), 1,86 - 1,77 (m, 5H), 1,45 - 1,42 (m, 1H), 1,31 (d, $J = 11,1$ Hz, 2H).
2	458,20	1,20	¹ H NMR (400,0 MHz, DMSO-d ₆) δ 12,89 (s, 1H), 12,43 (s, 1H), 8,79 (s, 1H), 8,00 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H), 7,72 - 7,68 (m, 2H), 7,44 (dd, $J = 2,9, 9,0$ Hz, 1H), 7,22 (dd, $J = 2,5, 9,0$ Hz, 1H), 7,15 (d, $J = 2,6$ Hz, 1H), 4,33 (s, 2H), 3,91 (s, 3H), 1,67 (d, $J = 6,9$ Hz, 4H), 1,43 (d, $J = 6,9$ Hz, 4H).
3	496,0	1,48	¹ H NMR (400,0 MHz, DMSO-d ₆) δ 13,08 (s, 1H), 12,16 (s, 1H), 8,88 (s, 1H), 8,04 (dd, $J = 2,1, 7,4$ Hz, 1H), 7,95 - 7,88 (m, 3H), 7,22 (dd, 2,5; 8,9 Hz, 1H), 7,16 (d, $J = 2,5$ Hz, 1H), 4,33 (s, 2H), 1,67 (d, $J = 6,9$ Hz, 4H), 1,44 (d, $J = 6,9$ Hz, 4H).
4	458,50	1,22	¹ H NMR (400,0 MHz, DMSO-d ₆) δ 13,12 (d, $J = 6,7$ Hz, 1H), 12,50 (s, 1H), 8,78 (d, $J = 6,8$ Hz, 1H), 8,10 (d, $J = 9,1$ Hz, 1H), 7,78 - 7,72 (m, 3H), 7,65 (d, $J = 7,7$ Hz, 1H), 7,39 (d, $J = 7,3$ Hz, 1H), 7,33 (s, 1H), 5,20 (s, 2H), 4,47 (s, 2H), 1,74 (d, $J = 6,7$ Hz, 4H), 1,51 (d, $J = 7,1$ Hz, 4H).
5	512,50	1,55	¹ H NMR (400,0 MHz, DMSO-d ₆) δ 13,07 (s, 1H), 12,15 (s, 1H), 8,88 (s, 1H), 8,04 (dd, $J = 2,2, 7,4$ Hz, 1H), 7,95 - 7,88 (m, 3H), 7,19 (dd, $J = 2,4, 9,0$ Hz, 1H), 7,12 (d, $J = 2,6$ Hz, 1H), 5,00 (d, $J = 4,2$ Hz, 1H), 4,25 - 4,13 (m, 1H), 4,21 - 4,19 (m, 1H),
			4,16 - 4,13 (m, 1H), 2,15 - 2,08 (m, 2H),

Eksempelfor bindelse nr.	LC/MS M+1	LC/RT ^a minutter	NMR
			1,61 - 1,55 (m, 1H), 1,47 - 1,44 (m, 2H) og 1,03 (dd, $J = 3,4, 12,3$ Hz, 1H).
6	399,30	1,47	¹ H NMR (400,0 MHz, DMSO-d ₆) δ 12,77 (s, 1H), 12,75 (s, 1H), 8,77 (s, 1H), 8,11 (d, $J = 9,1$ Hz, 1H), 7,64 - 7,60 (m, 1H), 7,55 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H), 7,34 (d, $J = 2,8$ Hz, 1H), 7,27 (dd, $J = 2,8, 9,1$ Hz, 1H), 7,23 (d, $J = 7,2$ Hz, 1H), 4,32 (s, 2H), 2,91 (s, 3H), 1,65 (d, $J = 7,2$ Hz, 4H), 1,42 (d, $J = 6,8$ Hz, 4H).
7	453,0	1,62	¹ H NMR (400,0 MHz, DMSO-d ₆) δ 13,28 (d, $J = 6,4$ Hz, 1H), 12,07 (s, 1H), 8,95 (d, $J = 6,5$ Hz, 1H), 8,69 (s, 1H), 8,16 (dd, $J = 1,5, 8,7$ Hz, 1H), 8,01 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H), 7,91 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H), 7,28 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H), 7,22 (s, 1H), 4,38 (s, 2H), 1,69 (d, $J = 6,4$ Hz, 4H), 1,46 (d, $J = 6,9$ Hz, 4H).
8	512,10	1,35	¹ H NMR (400,0 MHz, DMSO- d ₆) δ 13,07 (s, 1H), 12,13 (s, 1H), 8,88 (s, 1H), 8,05 - 8,02 (m, 1H), 7,95 - 7,86 (m, 3H), 7,18 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H), 7,12 (d, $J = 2,5$ Hz, 1H), 4,74 (d, $J = 5,2$ Hz, 1H), 4,33 (m, 1H), 4,11 (m, 1H), 3,77 (m, 1H), 1,82 (dd, $J = 7,3, 12,5$ Hz, 1H), 1,56 - 1,48 (m, 3H), 1,25 (m, 2H).
9	442,10	1,20	¹ H NMR (400,0 MHz, DMSO-d ₆) δ 12,84 (s, 1H), 12,43 (s, 1H), 8,81 (s, 1H), 8,12 (s, 1H), 8,00 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H), 7,64 (m, 2H), 7,21 (dd, $J = 2,5; 9,0$ Hz, 1H), 7,15 (d, $J = 2,6$ Hz, 1H), 4,32 (s, 2H), 2,47 (s, 3H), 1,67 (d, $J = 7,4$ Hz, 4H), 1,43 (d, $J = 6,9$ Hz, 4H).
10	442,10	1,40	¹ H NMR (400,0 MHz, DMSO-d ₆) δ 12,68 (s, 1H), 12,41 (s, 1H), 8,75 (s, 1H), 7,94 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H), 7,63 - 7,60 (m, 1H), 7,54 (d, $J =$

Eksempelfor bindelse nr.	LC/MS M+1	LC/RT ^a minutter	NMR
			7,8 Hz, 1H), 7,23 - 7,20 (m, 2H), 7,15 (d, $J = 2,7$ Hz, 1H), 4,33 (s, 2H), 2,89 (s, 3H), 1,67 (d, $J = 6,7$ Hz, 4H), 1,44 (d, $J = 6,9$ Hz, 4H).
11	444,0	1,30	¹ H NMR (400,0 MHz, DMSO-d ₆) δ 13,55 (s, 1H), 13,31 (d, $J = 7,2$ Hz, 1H), 11,58 (s, 1H), 8,86 (d, $J = 6,9$ Hz, 1H), 8,01 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H), 7,66 (t, $J = 8,2$ Hz, 1H), 7,29 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H), 7,23 (s, 1H), 7,17 (d, $J = 7,7$ Hz, 1H), 6,80 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H), 4,39 (s, 2H), 1,69 (d, $J = 7,3$ Hz, 4H), 1,46 (d, $J = 7,0$ Hz, 4H).
12	510,5	1,95	¹ H NMR (400,0 MHz, DMSO-d ₆) δ 13,16 (d, $J = 5,7$ Hz, 1H), 12,07 (s, 1H), 8,87 (d, $J = 6,6$ Hz, 1H), 8,05 (dd, $J = 2,1, 7,3$ Hz, 1H), 7,96 - 7,92 (m, 2H), 7,87 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H), 7,09 (d, $J = 9,1$ Hz, 1H), 7,00 (s, 1H), 4,28 (s, 2H), 2,02 - 2,00 (m, 2H),
			1,88 - 1,73 (m, 5H), 1,45 - 1,42 (m, 1H), 1,31 (d, $J = 11,6$ Hz, 2H).
13	509,7	1,06	¹ H NMR (400,0 MHz, DMSO-d ₆) δ 13,23 (d, $J = 6,8$ Hz, 1H), 12,40 (s, 1H), 10,31 (s, 1H), 8,96 (d, $J = 6,6$ Hz, 1H), 8,40 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H), 8,08 - 8,06 (m, H), 8,07 (dd, $J = 1,5$ Hz, 8,1 Hz, 1H), 8,00 - -7,95 (m, 2H), 7,15 - 7,09 (m, 2H), 4,49 (s, 2H), 4,29 (s, 2H), 2,94 (s, 6H), 1,67 (d, $J = 7,2$ Hz, 4H), 1,44 (d, $J = 7,0$ Hz, 4H).
14	455,7	1,04	¹ H NMR (400,0 MHz, DMSO-d ₆) δ 12,63 (s, 2H), 8,75 (s, 1H), 8,38 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H), 7,62 - 7,58 (m, 1H), 7,52 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H), 7,21 (d, $J = 7,2$ Hz, 1H), 6,96 - 6,93 (m, 2H), 4,24 (s, 2H), 3,70 (s, 2H), 2,92 (s,

Eksempelfor bindelse nr.	LC/MS M+1	LC/RT^a minutter	NMR
			3H), 2,28 (s, 6H), 1,65 (d, $J = 7,0$ Hz, 4H), 1,39 (d, $J = 6,8$ Hz, 4H).

^a Retensjonstid

Assayer for detektering og måling av $\Delta F508$ -CFTR potenensieringsegenskaper for forbindelser

5

Optiske membranpotensialfremgangsmåter for analyse av $\Delta F508$ -CFTR-moduleringsegenskaper ved forbindelser

10

Assayet anvender fluoriserende spenningsregistreringsfargestoffer for måling av endringer i membranpotensiale ved bruk av en fluoriserende plateavleser (f.eks., FLIPR III, Molecular Devices, Inc.), som en avlesning for økning av funksjonelle $\Delta F508$ -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 forbindelser og deretter fylt med et spennings sensitivt fargemiddel.

15

Identifisering av potensiatorforbindelser

20

For å identifisere potensiatorer av $\Delta F508$ -CFTR ble det utviklet et HTS-assayformat med dobbelttilsetning. Dette HTS-assayet benytter fluorescerende spennings sensitive 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.

25

Løsninger

Løsningsbad nr. 1: (i mM) NaCl 160, KCl 4,5, $CaCl_2$ 2, $MgCl_2$ 1, HEPES 10, pH 7,4 med NaOH.

30

Kloridfritt løsningsbad: Kloridsalter i løsningsbad nr. 1 substitueres med glukonatsalter.

Cellekultur

NIH3T3-fibroblaster fra mus med stabil $\Delta F508$ -CFTR-ekspresjon, anvendes for optiske målinger av membranpotensial. 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 alle optiske assayer ble cellene utsådd ved ~20 000/brønn i 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.

Ussing-kammerassay.

Ussing-kammerforsøk ble utført på polariserte epitelceller som uttrykker $\Delta F508$ -CFTR for videre å karakterisere $\Delta F508$ -CFTR-modulatoren identifisert i de optiske assayene. 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 platet på Costar® Snapwell™-filtre som var forhåndstrukket 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.

HBE dyrket på Costar® Snapwell™-cellekulturinnsatser ble plassert i et Ussing-kammer (Physiologic Instruments, Inc., San Diego, CA), og den transepitelliale resistensen og kortslutningsstrømmen i nærvær av en basolateral til apikal Cl⁻-gradient (I_{SC}), ble målt ved hjelp av et spenningsklemmesystem (Department of Bioengineering, University of Iowa, IA). I korthet ble HBE undersøkt under spenningsklemmeregistreringsbetingelser ($V_{bold} = 0$ mV) ved 37 °C. Den basolaterale løsningen inneholdt (i mM) 145 NaCl, 0,83 K₂HPO₄, 3,3 KH₂PO₄, 1,2 MgCl₂, 1,2 CaCl₂, 10 glukose, 10 HEPES (pH-justert til 7,35 med NaOH) og den apiske løsningen inneholdt (i mM) 145 NaGluconate, 1,2 MgCl₂, 1,2 CaCl₂, 10 glukose, 10 HEPES (pH-justert til 7,35 med NaOH).

Identifisering av potensiatorforbindelser

Den typiske protokollen benyttet en basolateral til apikal membrans Cl^- -konsentrasjonsgradient. For konfigurering av 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 høy Cl^- -konsentrasjonsgradient over epitelet. Den apikale siden av cellekulturinnsatsene ble tilsatt forskolin (10 μM) og alle testforbindelser. Virkningen av de antatte ΔF508 -CFTR-potensiatorene ble sammenlignet med den av den kjente potensiatoren, genistein.

Patch-clamp-registreringer

Samlet Cl^- -strøm i ΔF508 -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). Spenningsklemmeregistreringer ble utført ved 22 °C ved hjelp av en Axopatch 200B patch-klemme-forsterker (Axon Instruments Inc., Foster City, CA). Pipetteløsningen inneholdt (i mM) 150 *N*-metyl-D-glukamin (NMDG)-Cl, 2 MgCl_2 , 2 CaCl_2 , 10 EGTA, 10 HEPES og 240 $\mu\text{g/ml}$ amfoterisin-B (pH-justert til 7,35 med HCl). Det ekstracellulære mediet inneholdt (i mM) 150 NMDG-Cl, 2 MgCl_2 , 2 CaCl_2 , 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/spenningsforholdet ble overvåket hvert 30. sekund.

Identifisering av potensiatorforbindelser

ΔF508 -CFTR-potensiatorenes evne til å øke den makroskopiske ΔF508 -CFTR Cl^- -strømmen ($I_{\Delta\text{F508}}$) 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 $I_{\Delta\text{F508}}$ med lignende styrke 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 med stabil $\Delta F508$ -CFTR-ekspresjon, 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 potensiatores aktivitet, og inkubert med eller uten korreksjonsforbindelsen ved 37 °C for å måle korrektorenes aktivitet.

10 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 inhibering av proteinfosfataser, som hindret strømbrudd. Pipettepotensialet 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 anvendelse 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.

35 Cellekultur

NIH3T3-fibroblaster fra mus med stabil $\Delta F508$ -CFTR-ekspresjon, anvendes til patch-klemme-registreringer av det utskårne membranstykket. 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.

Forbindelser ifølge oppfinnelsen er nyttige som modulatorer av ATP-bindingskassettransportører. Eksempler på aktiviteter og virkninger av forbindelsene av formel (I) vises nedenfor i tabell 3. Forbindelsens aktivitet illustreres med «+++» hvis aktiviteten ble målt å være mindre enn 2,0 μM, «++» hvis aktiviteten ble målt til å være fra 2 μM til 5,0 μM, «+» hvis aktiviteten ble målt til å være større enn 5,0 μM og «-» hvis ingen data var tilgjengelige. Virkeevnen illustreres med «+++» hvis virkeevnen ble beregnet til å være større enn 100 %, «++» hvis virkeevnen ble beregnet til å være fra 100 % til 25 %, «+» hvis virkeevnen ble beregnet til å være mindre enn 25 % og «-» hvis ingen data var tilgjengelige. Det anføres at 100 % virkning er den høyeste responsen oppnådd med 4-metyl-2-(5-fenyl-1H-pyrazol-3-yl)fenol.

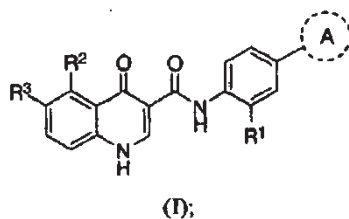
Tabell 3

Eksempelforbindelse nr.	Aktivitet EC ₅₀ (μm)	% virkeevne
1	+++	++
2	+++	++
3	+++	++
4	+++	++
5	+++	+++
6	+++	+++
7	+++	++
8	+++	++
9	+++	++
10	+++	+++

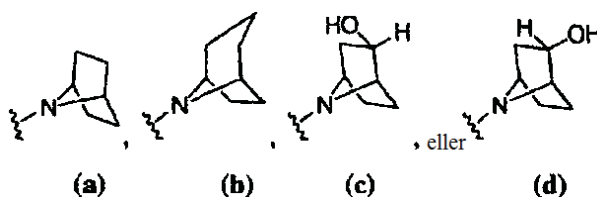
Eksempelforbindelse nr.	Aktivitet EC ₅₀ (µm)	% virkeevne
11	+++	++
12	+++	++
13	+++	++
14	+++	++

75

1. Forbindelse med formel (I):



- 5 eller farmasøytisk akseptable salter derav, der:
ring A velges fra:



- 10 der:

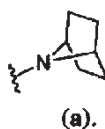
R^1 er $-\text{CF}_3$, $-\text{CN}$ eller $-\text{C}\equiv\text{CCH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$;

R^2 er hydrogen, $-\text{CH}_3$, $-\text{CF}_3$, $-\text{OH}$ eller $-\text{CH}_2\text{OH}$;

R^3 er hydrogen, $-\text{CH}_3$, $-\text{OCH}_3$ eller $-\text{CN}$; gitt at både R^2 og R^3 ikke samtidig er hydrogen.

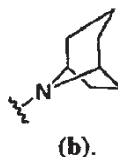
15

2. Forbindelsen ifølge klausul 1, hvor ring A er



20

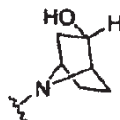
3. Forbindelsen ifølge klausul 1, hvor ring A er



4. Forbindelsen ifølge klausul 1, hvor ring A er

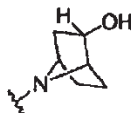
25

76



(c).

5. Forbindelsen ifølge klausul 1, hvor ring A er



(d).

5

6. Forbindelsen ifølge en hvilken som helst av klausul 2 - 5, der R^1 er $-\text{CF}_3$.

7. Forbindelsen ifølge en hvilken som helst av klausul 2 - 5, der R^1 er $-\text{CN}$.

10

8. Forbindelsen ifølge en hvilken som helst av klausul 2 - 5, der R^1 er $-\text{C}\equiv\text{CCH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$.

9. Forbindelsen ifølge en hvilken som helst av klausul 6 - 8, der R^2 er hydrogen.

15

10. Forbindelsen ifølge en hvilken som helst av klausul 6 - 8, der R^2 er $-\text{CH}_3$.

11. Forbindelsen ifølge en hvilken som helst av klausul 6 - 8, der R^2 er $-\text{CF}_3$.

20

12. Forbindelsen ifølge en hvilken som helst av klausul 6 - 8, der R er $-\text{OH}$.

13. Forbindelsen ifølge en hvilken som helst av klausul 6 - 8, der R^2 er $-\text{CH}_2\text{OH}$.

14. Forbindelsen ifølge en hvilken som helst av klausul 10 - 13, der R^3 er hydrogen.

25

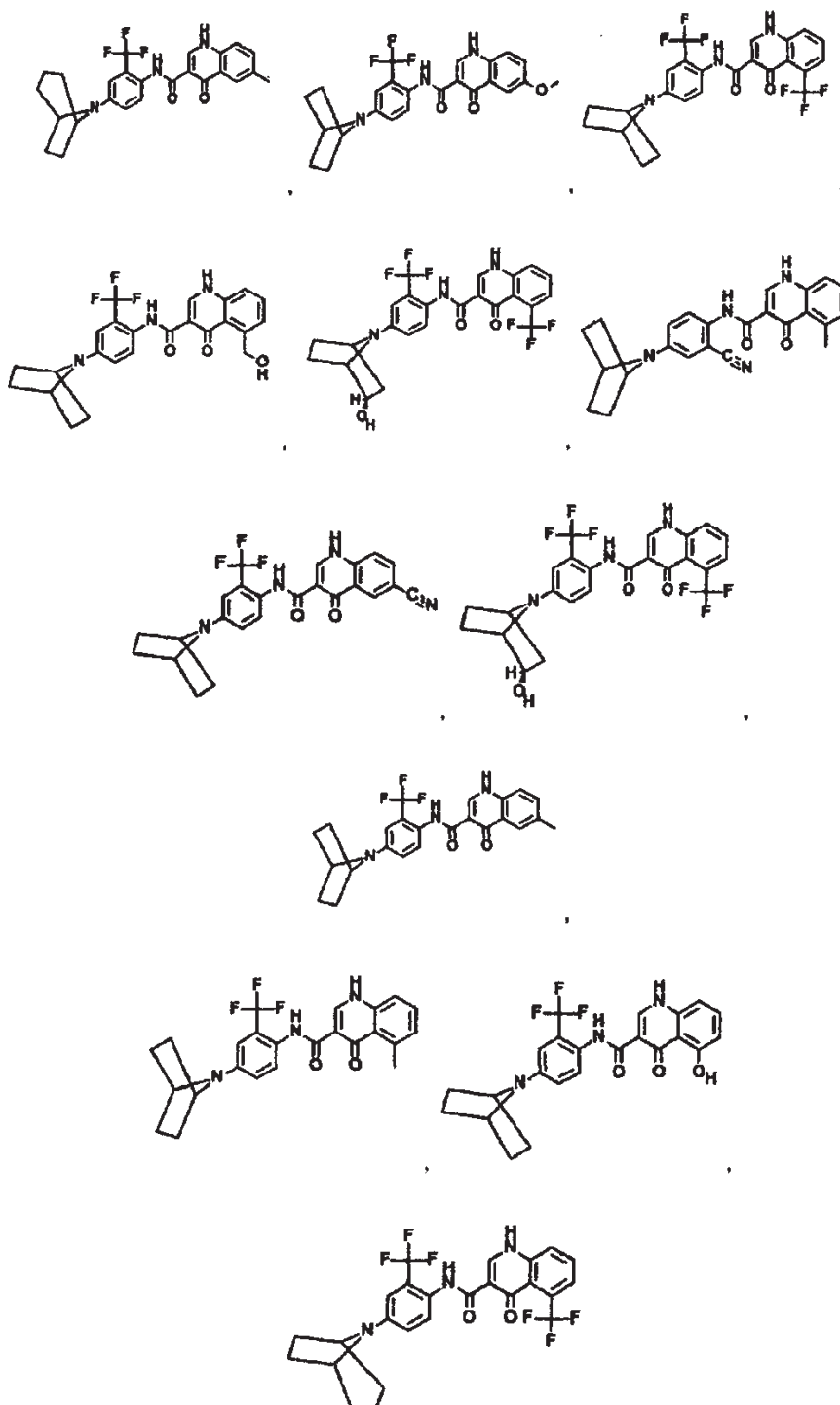
15. Forbindelsen ifølge en hvilken som helst av klausul 9 - 13, der R^3 er $-\text{CH}_3$.

16. Forbindelsen ifølge en hvilken som helst av klausul 9 - 13, der R^3 er $-\text{OCH}_3$.

30

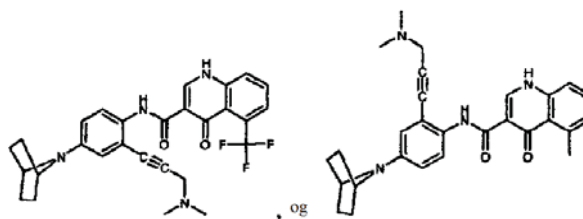
17. Forbindelsen ifølge en hvilken som helst av klausul 9 - 13, der R^3 er $-\text{CN}$.

18. En forbindelse valgt fra



5

10



19. Farmasøytisk sammensetning omfattende en forbindelse ifølge en hvilken som helst av klausul 1 - 18 og en farmasøytisk akseptabel bærer eller adjuvant.

5

20. Farmasøytisk sammensetning ifølge klausul 19, videre omfattende et ytterligere middel valgt fra et slimløsende middel, en bronkodilatator, et antibiotikum, et antiinfeksjonsmiddel, et antiinflammatorisk middel, en annen CFTR-modulator enn en forbindelse av formel (I) eller et næringsmiddel.

10

21. Farmasøytisk sammensetning ifølge klausul 20, der nevnte ytterligere middel er en CFTR-modulator annet enn en forbindelse av formel (I).

22. Fremgangsmåte for behandling eller lette av alvorlighetsgraden av en sykdom hos en pasient, hvor sykdommen velges fra cystisk fibrose, astma, røykindusert KOLS, kronisk bronkitt, rhinosinusitt, forstoppelse, pankreatitt, pankreatisk insuffisiens, sterilitet hos menn forårsaket av medfødt bilateralt fravær av vas deferens (CBAVD), mild lungesykdom, idiopatisk pankreatitt, allergisk bronkopulmonal aspergillose (ABPA), leversykdom, arvelig emfysem, arvelig hemokromatose, koagulering-fibrinolyse-mangler slik som protein C-mangel, arvelig angioødem type 1, lipidprosesseringsmangler slik som familiær hyperkolesterolemi, kylomikronemi type 1, abetalipoproteinemi, lysosomale lagringssykdommer slik som I-cellesykdom/pseudo-Hurler, mukopolysakkaridoser, Sandhof/Tay-Sachs, Crigler-Najjar type II, polyendokrinopati/hyperinsulinemi, diabetes mellitus, Laron-dvergvekst, myeloperoksidasemangel, primær hypoparatyroidisme, melanom, glykanose CDG type 1, medfødt hypertyroidisme, osteogenesis imperfecta, arvelig hypofibrinogenemi, ACT-mangel, diabetes insipidus (DI), nevrohypofyseal DI, nefrogen DI, Charcot-Marie-Tooths syndrom, Pelizaeus-Merzbachers sykdom, nevrodegenerative sykdommer slik som Alzheimers sykdom, Parkinsons sykdom, amyotrofisk lateral sklerose, progressiv supranukleær lammelse, Picks sykdom, flere nevrologiske polyglutaminlidelser slik som Huntingtons, spinocerebellar ataksi type I, spinal og bulbær muskelatrofi, dentatorubral pallidolusian atrofi og myoton dystrofi, og spongiforme encefalopatier slik som arvelig Creutzfeldt-

15

20

25

30

Jakobs sykdom (på grunn av mangel på prionproteinprosessering), Fabrys sykdom, Gerstmann-Sträussler-Scheinkers syndrom (på grunn av mangel på Prp-prosessering), sterilitet, osteoporose, osteopeni, Gorhams syndrom, kloridkanalopatier, myotonia congenita (Thomson og Becker-former), Bartters syndrom type III, Dents sykdom, hyperekpleksi, epilepsi, hyperekpleksi, lysosomal lagringssykdom, Angelmans syndrom, primær ciliær dyskinesi (PCD), PCD med situs inversus (også kjent som Kartageners syndrom), PCD uten situs inversus og cilær aplasi eller Sjøgrens sykdom, hvor nevnte fremgangsmåte omfatter trinnet med administrering til pasienten av en virkningsfull mengde av en forbindelse ifølge en hvilken som helst av klausul 1 til 18.

23. Fremgangsmåten ifølge klausul 22, hvor nevnte sykdom er cystisk fibrose.

24. Fremgangsmåte for behandling eller lette av alvorlighetsgraden av en sykdom hos en pasient, der nevnte sykdom er forbundet med redusert CFTR-funksjon på grunn av mutasjoner i genet som koder for CFTR, eller miljøfaktorer, hvor nevnte fremgangsmåte omfatter trinnet med administrering til nevnte pasient av en virkningsfull mengde av en forbindelse ifølge en hvilken som helst av klausul 1 - 18.

25. Fremgangsmåten ifølge klausul 24, hvor sykdommen er cystisk fibrose, kronisk bronkitt, tilbakevendende bronkitt, akutt bronkitt, sterilitet hos menn forårsaket av medfødt bilateralt fravær av vas deferens (CBAVD), sterilitet hos kvinner forårsaket av medfødt fravær av livmor og vagina (CAUV), idiopatisk kronisk pankreatitt (ICP), idiopatisk tilbakevendende pankreatitt, idiopatisk akutt pankreatitt, kronisk rhinosinussitt, primær skleroserende kolangitt, allergisk bronkopulmonal aspergillose, diabetes, keratoconjunctivitis sicca, forstoppelse, allergisk bronkopulmonal aspergillose (ABPA), bensykdommer og astma.

26. Fremgangsmåte for behandling eller lette av alvorlighetsgraden av en sykdom hos en pasient, der nevnte sykdom er forbundet med normal CFTR-funksjon, hvor nevnte fremgangsmåte omfatter trinnet med administrering til nevnte pasient av en virkningsfull mengde av en forbindelse ifølge en hvilken som helst av klausul 1 - 18.

27. Fremgangsmåten ifølge klausul 26, hvor sykdommen er kronisk obstruktiv lungesykdom (KOLS), kronisk bronkitt, tilbakevendende bronkitt,

akutt bronkitt, rhinosinusitt, forstoppelse, kronisk pankreatitt, tilbakevendende pankreatitt og akutt pankreatitt, pankreatisk insuffisiens, sterilitet hos menn forårsaket av medfødt bilateralt fravær av vas deferens (CBAVD), mild lungesykdom, idiopatisk pankreatitt, leversykdom, arvelig emfysem, gallestein, gastro-øsofageal reflukssykdom, gastrointestinale ondartetheter, inflammatorisk tarmsykdom, forstoppelse, diabetes, artritt, osteoporose og osteopeni.

28. Fremgangsmåten ifølge klausul 26, hvor sykdommen er arvelig hemokromatose, koagulering-fibrinolyse-mangler slik som protein C-mangel, arvelig angioødem type 1, lipidprosesseringsmangler slik som familiær hyperkolesterolemi, kylomikronemi type 1, abetalipoproteinemi, lysosomale lagringssykdommer slik som I-cellesykdom/pseudo-Hurler, mukopolysakkaridoser, Sandhof/Tay-Sachs, Crigler-Najjar type II, polyendokrinopati/hyperinsulemi, diabetes mellitus, Laron-dvergvekst, myleoperoksidasemangel, primær hypoparatyroidisme, melanom, glykanose CDG type 1, medfødt hypertyroidisme, osteogenesis imperfecta, arvelig hypofibrinogenemi, ACT-mangel, diabetes insipidus (DI), nevrofyseal DI, nefrogen DI, Charcot-Marie-Tooths syndrom, Perlizaeus-Merzbachers sykdom, nevrodegenerative sykdommer slik som Alzheimers sykdom, Parkinsons sykdom, amyotrofisk lateral sklerose, progressiv supranukleær lammelse, Picks sykdom, flere nevrologiske polyglutaminlidelser slik som Huntingtons, spinocerebellar ataksi type I, spinal og bulbær muskelastrofi, dentatorubal pallidoluysian dystrofi og myoton dystrofi og spongiforme encefalopatier slik som arvelig Creutzfeldt-Jakobs sykdom (på grunn av mangel på prionproteinprosessering), Fabrys sykdom, Gerstmann-Sträussler-Scheinkers syndrom, Gorhams syndrom, kloridkanalopatier, myotonia congenita (Thomson og Becker-former), Bartters syndrom type III, Dents sykdom, epilepsi, hyperekpleksi, lysosomal lagringssykdom, Angelmans syndrom, primær ciliær dyskinesi (PCD), PCD med situs inversus (også kjent som Kartageners syndrom), PCD uten situs inversus og cilær aplasi eller Sjögrens sykdom.

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

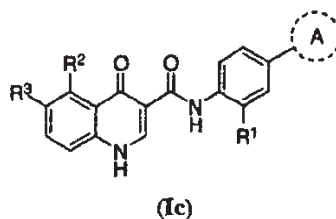
- (i) en sammensetning omfattende en forbindelse av formel (I) ifølge krav 1;
- (ii) instruksjoner for:
 - a) oppretting av kontakt mellom sammensetningen og den biologiske prøven;
 - b) måling av aktivitet for nevnte CFTR eller fragmentet derav.

30. Kittet ifølge klausul 29, videre omfattende instruksjoner for:

- a) oppretting av kontakt mellom en ytterligere forbindelse og den biologiske prøven;
- b) måling av aktiviteten av CFTR eller et fragment derav under nærvær av den ytterligere forbindelsen, og
- c) sammenligning av CFTR-aktiviteten i nærvær av den ytterligere forbindelsen med CFTR-tettheten i nærvær av en sammensetning av formel (I).

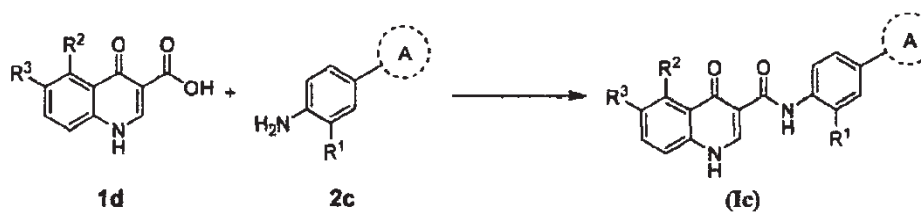
31. Fremgangsmåte for modulering av CFTR-aktivitet i en biologisk prøve omfattende trinnet med å sette nevnte CFTR i kontakt med en forbindelse ifølge en hvilken som helst av klausul 1 - 18.

32. Prosess for fremstilling av en forbindelse av formel (I):



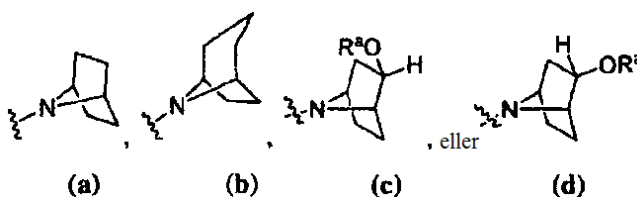
eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, der prosessen omfatter:

(a) reaksjon av syren i formel **1d** med et amin i formel **2c** for å gi en forbindelse av formel (I)



der:

ring A velges fra:



der

R^1 er $-\text{CF}_3$, $-\text{CN}$ eller $-\text{C}\equiv\text{CCH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$;

R^2 er hydrogen, $-\text{CH}_3$, $-\text{CF}_3$, $-\text{OH}$ eller $-\text{CH}_2\text{OH}$;

5 R^3 er hydrogen, $-\text{CH}_3$, $-\text{OCH}_3$ eller $-\text{CN}$; gitt at både R^2 og R^3 ikke samtidig er hydrogen, og

R^a er hydrogen eller en silylbeskyttende gruppe valgt fra gruppen bestående av trimetylsilyl (TMS), *tert*-butyldifenylsilyl (TBDPS), *tert*-butyldimetylsilyl (TBDMS), triisopropylsilyl (TIPS) og [2-(trimetylsilyl)etoksy]metyl (SEM).

10

33. Prosessen ifølge klausul 32, der reaksjonen av syren i formel **1d** med aminet i formel **2c** sted i en oppløsning i nærvær av *O*-(7-azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetrametyluroniumheksafluorofosfat (HATU) og triethylamin eller i en oppløsning i nærvær av propylfosfonsyre syklisk vannfri (T3P®) og pyridin.

15

34. Prosessen ifølge klausul 33, hvor løsningen omfatter *N,N*-dimetylformamid, etylacetate eller 2-metyltetrahydrofuran.

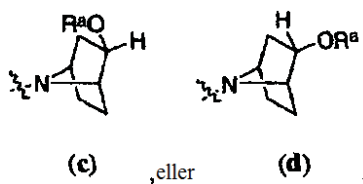
20

35. Prosessen ifølge klausul 32, der R^a er hydrogen eller TBDMS.

36. Prosessen ifølge klausul 32, der R^a er TBDMS.

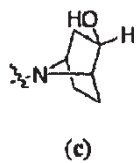
37. Prosessen ifølge klausul 32 videre omfattende et avbeskyttelsestrinn for fjerning av silylbeskyttelsesgruppen når ring A er

25

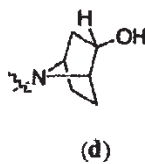


der R^a er en silyl-beskyttende gruppe, for generering av en forbindelse av formel (**I**), hvor ring A er

30



eller

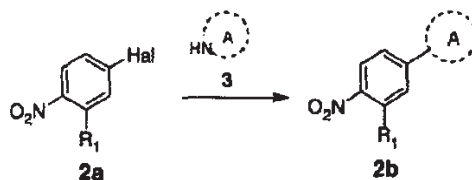


5

38. Prosessen ifølge klausul 32, hvor aminet i formel **2c** tilberedes fra en forbindelse av formel **2a** omfattende trinnene med:

- (a) reaksjon av forbindelsen i formel **2a** med et amin i formel 3 for å gi forbindelsen i formel **2b**

10

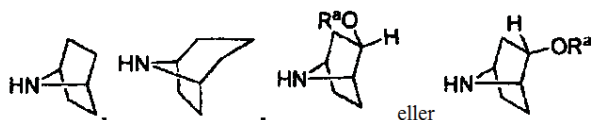


der:

Hal er F, Cl, Br eller I; og

aminet i formel **3** er

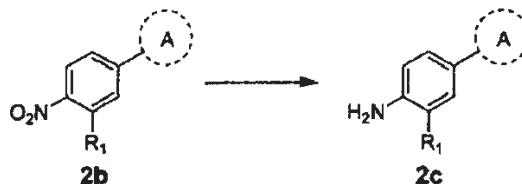
15



og

20

- (b) reduksjon av forbindelsen i formel **2b** til aminet i formel **2c**.

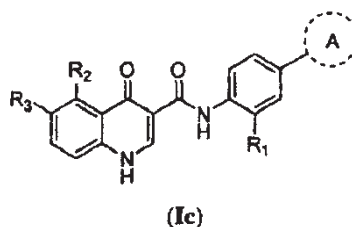


25

39. Prosessen ifølge klausul 38, der aminet i formel **3** i trinn (a) genereres in situ fra aminhydrokloridsaltet.

40. Prosessen ifølge klausul 38, der R^a er hydrogen eller TBDMS.

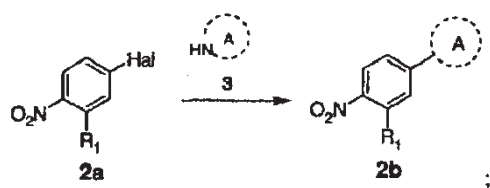
41. Prosessen ifølge klausul 38, der R^a er TBDMS.
42. Prosessen ifølge klausul 38, hvor trinn (a) finner sted i et polart aprotisk løsemiddel i nærvær av en tertiær aminbase.
43. Prosessen ifølge klausul 42, der trinn (a) finner sted i acetonitril i nærvær av trietylamin.
44. Prosessen ifølge klausul 38, der reaksjonstemperaturen i trinn (a) er mellom ca. 75 °C og ca. 85 °C.
45. Prosessen ifølge klausul 38, der reaksjonstiden er mellom ca. 2 og ca. 30 timer.
46. Prosessen ifølge klausul 38, der trinn (b) finner sted i et polart protisk løsemiddel i nærvær av en palladiumkatalysator.
47. Prosessen ifølge klausul 46, der løsemidlet i trinn (b) omfatter metanol eller etanol.
48. Prosessen ifølge klausul 38, der trinn (b) finner sted i et polart protisk løsemiddel i nærvær av Fe og FeSO₄ eller Zn og AcOH.
49. Prosessen ifølge klausul 48, der det passende polare protiske løsemidlet er vann.
50. Prosess for tilberedning av en forbindelse av formel (**Ic**),



eller farmasøytisk akseptable salter derav, omfattende trinnene med:

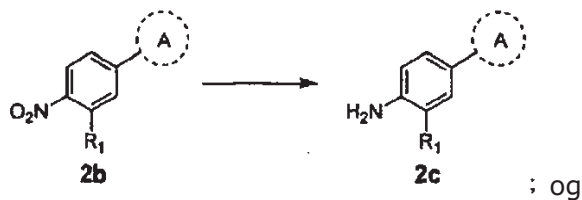
- (a) reaksjon av en forbindelse av formel **2a** med et amin i formel **3** for å gi en forbindelse av formel **2b**

85



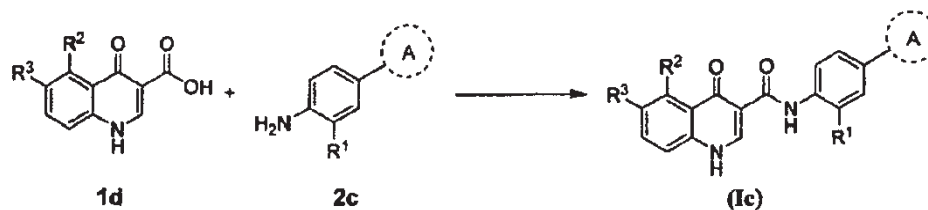
(b) konvertering av forbindelsen i formel **2b** til aminet i formel **2c** via reduksjon

5



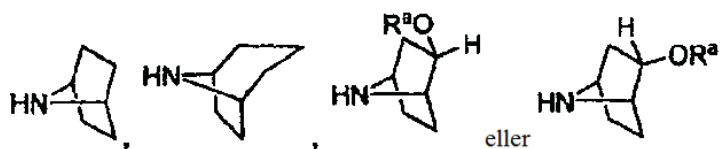
(c) reaksjon av aminet i formel **2c** med en syre i formel **1d** for å gi en forbindelse av formel (**1c**)

10



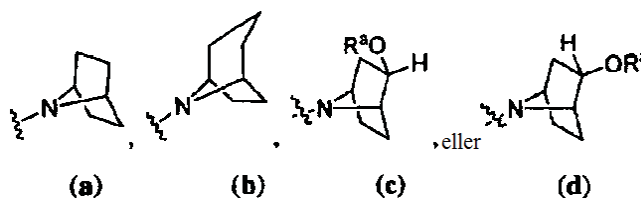
der Hal er F, Cl, Br eller I; aminet i formel 3 er

15



og

ring A velges fra:



20

der

R^1 er $-\text{CF}_3$, $-\text{CN}$ eller $-\text{C}\equiv\text{CCH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$;

R^2 er hydrogen, $-CH_3$, $-CF_3$, $-OH$ eller $-CH_2OH$;

R^3 er hydrogen, $-CH_3$, $-OCH_3$ eller $-CN$; gitt at både R^2 og R^3 ikke samtidig er hydrogen, og

R^a er hydrogen eller en silylbeskyttende gruppe valgt fra gruppen bestående av trimetylsilyl (TMS), *tert*-butyldifenylsilyl (TBDPS), *tert*-butyldimetylsilyl (TBDMS), triisopropylsilyl (TIPS) og [2-(trimetylsilyl)etoksy]metyl (SEM).

5

10

51. Prosessen ifølge klausul 50, der aminet i formel 3 i trinn (a) genereres *in situ* fra aminhydrokloridsaltet.

52. Prosessen ifølge klausul 51, der R^a er hydrogen eller TBDMS.

53. Prosessen ifølge klausul 52, der R^a er TBDMS.

15

54. Prosessen ifølge klausul 50, hvor trinn (a) finner sted i et polart aprotisk løsemiddel i nærvær av en tertiær aminbase.

20

55. Prosessen ifølge klausul 54, der trinn (a) finner sted i acetonitril i nærvær av trietylamin.

56. Prosessen ifølge klausul 50, der reaksjonstemperaturen i trinn (a) er mellom ca. 75 °C og ca. 85 °C.

25

57. Prosessen ifølge klausul 50, der reaksjonstiden er mellom ca. 2 og ca. 30 timer.

58. Prosessen ifølge klausul 50, der trinn (b) finner sted i et polart protisk løsemiddel i nærvær av en palladiumkatalysator.

30

59. Prosessen ifølge klausul 58, der løsemidlet i trinn (b) omfatter metanol eller etanol.

35

60. Prosessen ifølge klausul 50, der trinn (b) finner sted i et polart protisk løsemiddel i nærvær av Fe og $FeSO_4$ eller Zn og AcOH.

61. Prosessen ifølge klausul 50, der det passende polare protiske løsemidlet er vann.

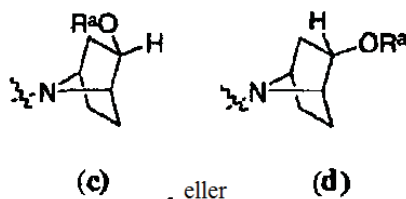
62. Prosessen ifølge klausul 50, der trinn (c) finner sted i et løsemiddel i nærvær av *O*-(7-azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetrametyluroniumheksafluorofosfat (HATU) og trietylamin eller i et løsemiddel i nærvær av propylfosfonsyre syklisk vannfri (T3P®) og pyridin.

63. Prosessen ifølge klausul 62, der løsningen i trinn (c) omfatter *N,N*-dimetylformamid (DMF), etylacetat eller 2-metyltetrahydrofuran.

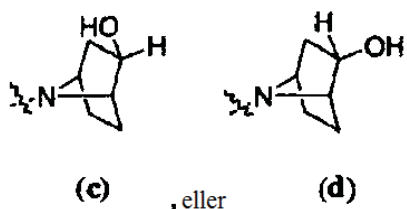
64. Prosessen ifølge klausul 62, der R^a er hydrogen eller TBDMS.

65. Prosessen ifølge klausul 64, der R^a er TBDMS.

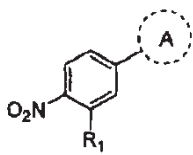
66. Prosessen ifølge klausul 50 videre omfattende en avbeskyttelsesreaksjon når ring A er



der R^a er en silyl-beskyttende gruppe, for generering av formel (I), der ring A er

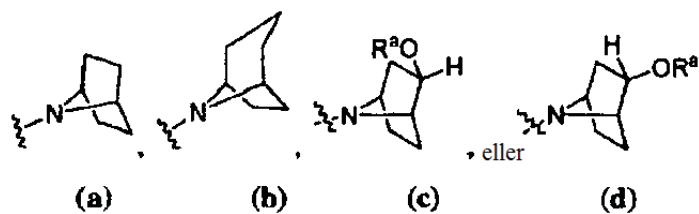


67. Forbindelse som er



når ring A er

88



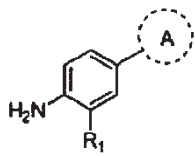
der

 R^1 er $-\text{CF}_3$, $-\text{CN}$ eller $-\text{C}\equiv\text{CCH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$, og

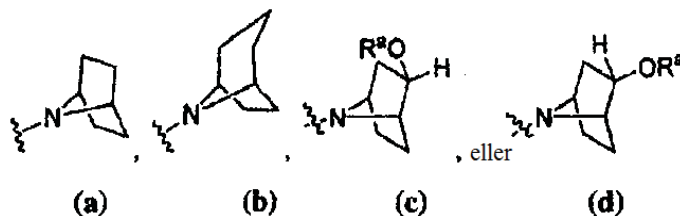
5 R^a er hydrogen eller en silylbeskyttende gruppe valgt fra gruppen bestående av trimetylsilyl (TMS), *tert*-butyldifenylsilyl (TBDPS), *tert*-butyldimetylsilyl (TBDMS), triisopropylsilyl (TIPS) og [2-(trimetylsilyl)etoksy]metyl (SEM).

68. Forbindelse som er

10



når ring A er



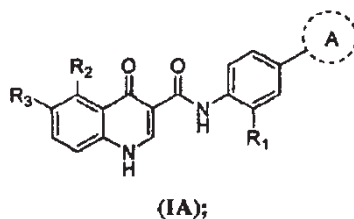
15

der

 R^1 er $-\text{CF}_3$, $-\text{CN}$ eller $-\text{C}\equiv\text{CCH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$, og

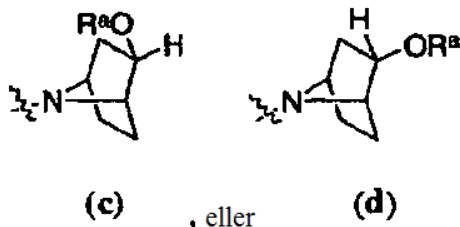
20 R^2 er hydrogen eller en silylbeskyttende gruppe valgt fra gruppen bestående av trimetylsilyl (TMS), *tert*-butyldifenylsilyl (TBDPS), *tert*-butyldimetylsilyl (TBDMS), triisopropylsilyl (TIPS) og [2-(trimetylsilyl)etoksy]metyl (SEM).

69. Forbindelse av formel (IA):



25

eller farmasøytisk akseptable salter derav, der:
ring A velges fra



der

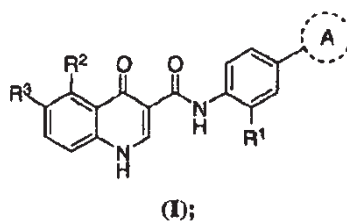
R^1 er $-\text{CF}_3$, $-\text{CN}$ eller $-\text{C}\equiv\text{CCH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$;

R^2 er hydrogen, $-\text{CH}_3$, $-\text{CF}_3$, $-\text{OH}$ eller $-\text{CH}_2\text{OH}$;

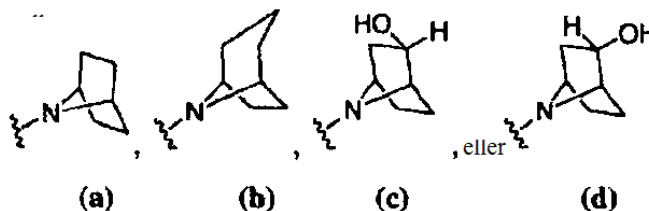
R^3 er hydrogen, $-\text{CH}_3$, $-\text{OCH}_3$ eller $-\text{CN}$; gitt at både R^2 og R^3 ikke samtidig er hydrogen, og

R^a er en silylbeskyttende gruppe valgt fra gruppen bestående av trimetylsilyl (TMS), *tert*-butyldifenylsilyl (TBDPS), *tert*-butyldimetylsilyl (TBDMS), triisopropylsilyl (TIPS) og [2-(trimetylsilyl)etoksy]metyl (SEM).

70. Forbindelse av formel (I)



eller farmasøytisk akseptable salter derav, der:
ring A velges fra:



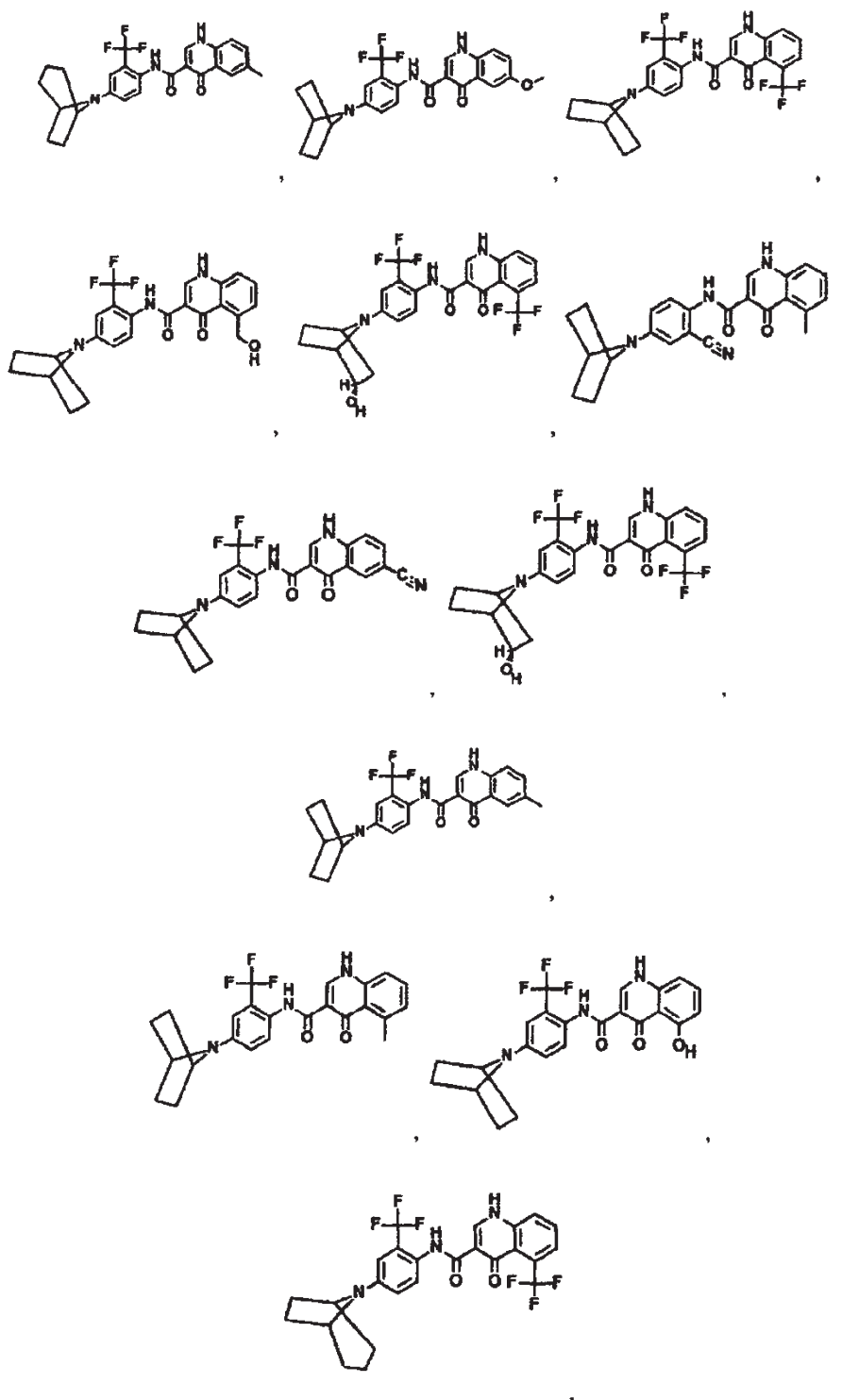
der

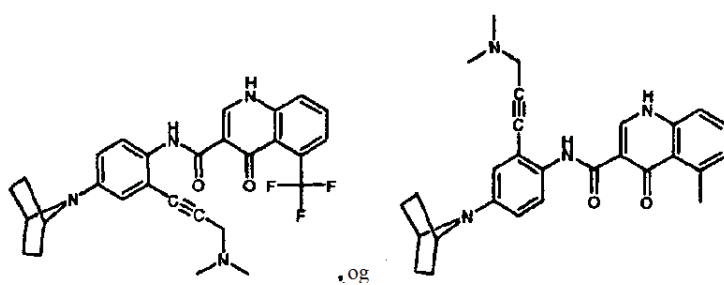
R^1 er $-\text{CF}_3$, $-\text{CN}$ eller $-\text{C}\equiv\text{CCH}_2(\text{CH}_3)_2$;

R^2 er hydrogen, $-\text{CH}_3$, $-\text{CF}_3$, $-\text{OH}$ eller $-\text{CH}_2\text{OH}$;

R^3 er hydrogen, $-CH_3$, $-OCH_3$ eller $-CN$; gitt at både R^2 og R^3 ikke samtidig er hydrogen; fremstilt ved prosessene i et hvilket som helst av kravene 45 - 61.

5 71. Forbindelse som velges fra gruppen bestående av

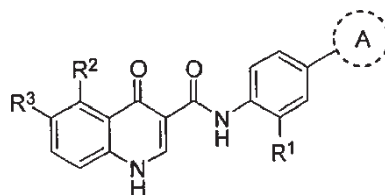




fremstilt ved prosessen ifølge en hvilken som helst av klausul 50 - 66.

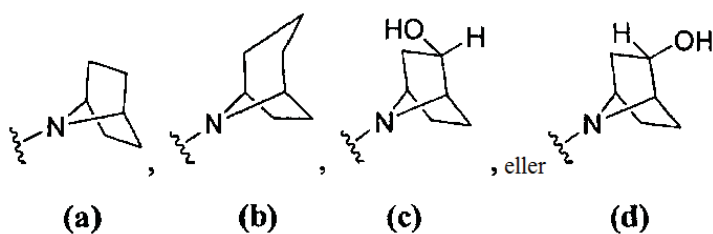
PATENTKRAV

1. Forbindelse med formel (I):



(I);

eller farmasøytisk akseptable salter derav, der:
ring A velges fra:



der:

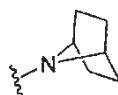
R¹ er -CF₃, -CN eller -C≡CCH₂N(CH₃)₂;

R² er hydrogen, -CH₃, -CF₃, -OH eller -CH₂OH;

R³ er hydrogen, -CH₃, -OCH₃ eller -CN;

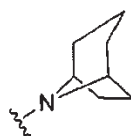
gitt at både R² og R³ ikke samtidig er hydrogen.

2. Forbindelsen ifølge krav 1, der ring A er



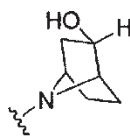
(a).

3. Forbindelsen ifølge krav 1, der ring A er



(b).

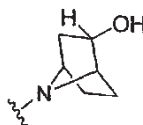
4. Forbindelsen ifølge krav 1, der ring A er



(c).

5

5. Forbindelsen ifølge krav 1, der ring A er



(d).

10

6. Forbindelsen ifølge et hvilket som helst av krav 2 - 5, der R^1 er $-\text{CF}_3$.

7. Forbindelsen ifølge et hvilket som helst av krav 2 - 5, der R^1 er $-\text{CN}$.

8. Forbindelsen ifølge et hvilket som helst av krav 2 - 5, der R^1 er $-\text{C}\equiv\text{CCH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$.

15

9. Forbindelsen ifølge et hvilket som helst av krav 6 - 8, der R^2 er hydrogen.

10. Forbindelsen ifølge et hvilket som helst av krav 6 - 8, der R^2 er $-\text{CH}_3$.

20

11. Forbindelsen ifølge et hvilket som helst av krav 6 - 5, der R^2 er $-\text{CF}_3$.

12. Forbindelsen ifølge et hvilket som helst av krav 6 - 8, der R^2 er $-\text{OH}$.

25

13. Forbindelsen ifølge et hvilket som helst av krav 6 - 8, der R^2 er $-\text{CH}_2\text{OH}$.

14. Forbindelsen ifølge et hvilket som helst av krav 10 - 13, der R^3 er hydrogen.

15. Forbindelsen ifølge et hvilket som helst av krav 9 - 13, der R^3 er $-\text{CH}_3$.

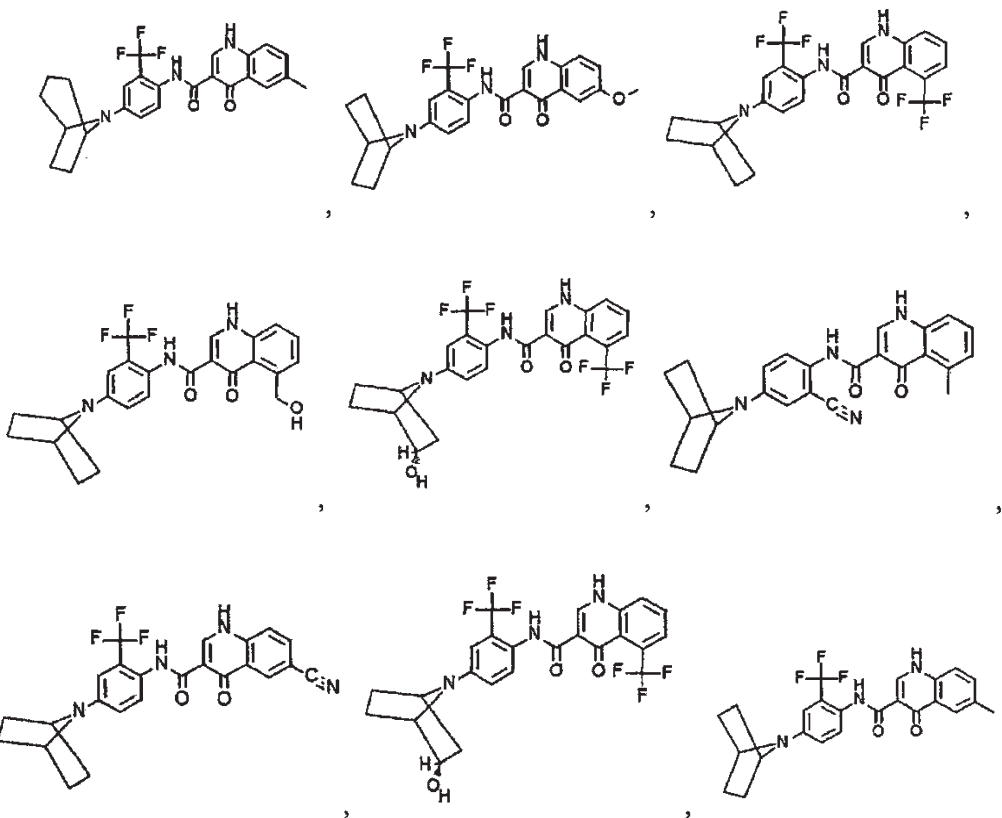
30

16. Forbindelsen ifølge et hvilket som helst av krav 9 - 13, der R^3 er $-\text{OCH}_3$.

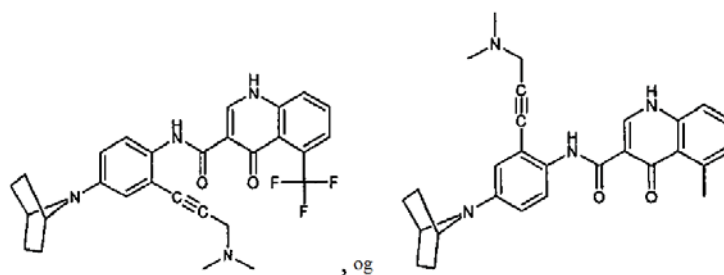
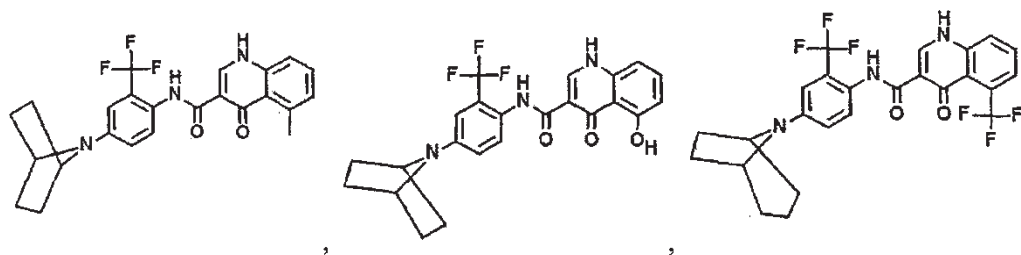
17. Forbindelsen ifølge et hvilket som helst av krav 9 - 13, der R³ er -CN.

18. Forbindelsen ifølge krav 1, der forbindelsen velges fra:

5

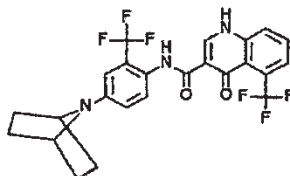


10



15

19. Forbindelse ifølge krav 18, der forbindelsen er:



5 20. Farmasøytisk sammensetning som omfatter en forbindelse ifølge et hvilket som helst av krav 1 - 19 og en farmasøytisk akseptabel bærer eller adjuvant.

10 21. Den farmasøytiske sammensetningen ifølge krav 20, som videre omfatter et ytterligere middel valgt fra et slimløsende middel, en bronkodilatator, et antibiotikum, et antiinfeksjonsmiddel, et antiinflammatorisk middel, en annen CFTR-modulator enn en forbindelse av formel (I) eller et næringsmiddel.

15 22. Den farmasøytiske sammensetningen ifølge krav 21, der det ytterligere middelet er en CFTR-modulator annet enn en forbindelse av formel (I).

20 23. Forbindelse ifølge et hvilket som helst av krav 1 - 19, for anvendelse i behandling eller lette av alvorlighetsgraden av en sykdom hos en pasient, der sykdommen velges fra cystisk fibrose, astma, røykindusert KOLS, kronisk bronkitt, rhinosinusitt, forstoppelse, pankreatitt, pankreatisk insuffisiens, sterilitet hos menn forårsaket av medfødt bilateralt fravær av vas deferens (CBAVD), mild lungesykdom, idiopatisk pankreatitt, allergisk bronkopulmonal aspergillose (ABPA), leversykdom, arvelig emfysem, arvelig hemokromatose, koaguleringsfibrinolyse-mangler slik som protein C-mangel, arvelig angioødem type 1, lipidprosesseringsmangler slik som familiær hyperkolesterolemi, kylomikronemi type 1, abetalipoproteinemi, lysosomale lagringssykdommer slik som I-cellesykdom/pseudo-Hurler, mukopolysakkaridoser, Sandhof/Tay-Sachs, Crigler-Najjar type II, polyendokrinopati/hyperinsulinemi, diabetes mellitus, Laron-dvergvekst, myeloperoksidase-mangel, primær hypoparatyroidisme, melanom, glykanose CDG type 1, medfødt hypertyroidisme, osteogenesis imperfecta, arvelig hypofibrinogenemi, ACT-mangel, diabetes insipidus (DI), nevrohypofyseal DI, nefrogen DI, Charcot-Marie-Tooths syndrom, Pelizaeus-Merzbachers sykdom, neurodegenerative sykdommer slik som Alzheimers sykdom, Parkinsons sykdom, amyotrofisk lateral sklerose, progressiv supranukleær lammelse, Picks sykdom,

25

30

flere nevrologiske polyglutaminlidelser slik som Huntingtons, spinocerebellar ataksi type I, spinal og bulbær muskelatrofi, dentatorubral pallidoluysian atrofi og myoton dystrofi, og spongiforme encefalopatier slik som arvelig Creutzfeldt-Jakobs sykdom (på grunn av mangel på prionproteinprosessering), Fabrys sykdom, Gerstmann-Sträussler-Scheinkers syndrom, KOLS, keratoconjunctivitis sicca, pankreatisk insuffisiens osteoporose, osteopeni, Gorhams syndrom, kloridkanalopatier, myotonia congenita (Thomson og Becker-former), Bartters syndrom type III, Dents sykdom, hyperekpleksi, epilepsi, hyperekpleksi, lysosomal lagringssykdom, Angelmans syndrom, primær cilær dyskinesi (PCD), PCD med situs inversus (også kjent som Kartageners syndrom), PCD uten situs inversus og cilær aplasi eller Sjögrens sykdom.

24. Forbindelsen for anvendelse ifølge krav 23, der sykdommen er cystisk fibrose.

25. Forbindelsen for anvendelse ifølge krav 23, der sykdommen er forbundet med redusert CFTR-funksjon på grunn av mutasjoner i genet som koder for CFTR eller miljøfaktorer, der sykdommen er cystisk fibrose, kronisk bronkitt, tilbakevendende bronkitt, akutt bronkitt, sterilitet hos menn forårsaket av medfødt bilateralt fravær av vas deferens (CBAVD), sterilitet hos kvinner forårsaket av medfødt fravær av livmor og vagina (CAUV), idiopatisk kronisk pankreatitt (ICP), idiopatisk tilbakevendende pankreatitt, idiopatisk akutt pankreatitt, kronisk rhinosinusitt, primær skleroserende kolangitt, allergisk bronkopulmonal aspergillose, diabetes, keratoconjunctivitis sicca, forstoppelse, allergisk bronkopulmonal aspergillose (ABPA), bensykdommer eller astma.

26. Forbindelsen for anvendelse ifølge krav 23, der sykdommen er forbundet med normal CFTR-funksjon.

27. Forbindelsen for anvendelse ifølge krav 26, der sykdommen er kronisk obstruktiv lungesykdom (KOLS), kronisk bronkitt, tilbakevendende bronkitt, akutt bronkitt, rhinosinusitt, forstoppelse, kronisk pankreatitt, tilbakevendende pankreatitt og akutt pankreatitt, pankreatisk insuffisiens, sterilitet hos menn forårsaket av medfødt bilateralt fravær av vas deferens (CBAVD), mild lungesykdom, idiopatisk pankreatitt, leversykdom, arvelig emfysem, gallestein,

gastro-øsofageal reflukssykdom, gastrointestinale ondartetheter, inflammatorisk tarmsykdom, forstoppelse, diabetes, artritt, osteoporose eller osteopeni.

28. Forbindelsen for anvendelse ifølge krav 26, der sykdommen er arvelig hemokromatose, koagulering-fibrinolyse-mangler slik som protein C-mangel, arvelig angioødem type 1, lipidprosesseringsmangler slik som familiær hyperkolesterolemi, kylomikronemi type 1, abetalipoproteinemi, lysosomale lagringssykdommer slik som I-cellesykdom/pseudo-Hurler, mukopolysakkaridoser, Sandhof/Tay-Sachs, Crigler-Najjar type II, polyendokrinopati/hyperinsulemi, diabetes mellitus, Laron-dvergvekst, myleoperoksidase-mangel, primær hypoparatyroidisme, melanom, glykanose CDG type 1, medfødt hypertyroidisme, osteogenesis imperfecta, arvelig hypofibrinogenemi, ACT-mangel, diabetes insipidus (DI), nevrofyseal DI, nefrogen DI, Charcot-Marie-Tooths syndrom, Perlizaeus-Merzbachers sykdom, nevrodegenerative sykdommer slik som Alzheimers sykdom, Parkinsons sykdom, amyotrofisk lateral sklerose, progressiv supranukleær lammelse, Picks sykdom, flere nevrologiske polyglutaminlidelser slik som Huntingtons, spinocerebellar ataksi type I, spinal og bulbær muskelastofi, dentatorubal pallidolusyan dystrofi og myoton dystrofi og spongiforme encefalopatier slik som arvelig Creutzfeldt-Jakobs sykdom (på grunn av mangel på prionproteinprosessering), Fabrys sykdom, Gerstmann-Sträussler-Scheinkers syndrom, Gorhams syndrom, kloridkanalopatier, myotonia congenita (Thomson og Becker-former), Bartters syndrom type III, Dents sykdom, epilepsi, hyperekpleksi, lysosomal lagringssykdom, Angelmans syndrom, primær ciliær dyskinesi (PCD), PCD med situs inversus (også kjent som Kartageners syndrom), PCD uten situs inversus og cilær aplasi eller Sjögrens sykdom.

29. Kit til anvendelse ved måling av CFTR-aktiviteten eller et fragment derav i en biologisk prøve *in vitro* eller *in vivo*, som omfatter:

- (i) en sammensetning som omfatter en forbindelse av formel (I) ifølge et hvilket som helst av krav 1 - 19;
- (ii) instruksjoner for:
 - a) oppretting av kontakt mellom sammensetningen og den biologiske prøven;
 - b) måling av aktivitet for CFTR eller et fragment derav.

30. Kittet ifølge krav 29, som videre omfatter instruksjoner for:

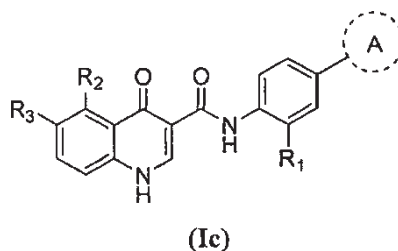
- a) oppretting av kontakt mellom en ytterligere forbindelse og den biologiske prøven;

- b) måling av aktiviteten for CFTR eller et fragment derav under nærvær av den ytterligere forbindelsen, og
- c) sammenligning av aktiviteten for CFTR eller fragmentet derav under nærvær av den ytterligere forbindelsen med aktiviteten for CFTR eller fragmentet derav under nærvær av en forbindelse av formel (**I**) ifølge et hvilket som helst av krav 1 - 18.

31. Kittet ifølge krav 30, der trinnet for sammenligning av aktiviteten for CFTR eller fragmentet derav tilveiebringer en måling av densiteten av CFTR eller fragmentet derav.

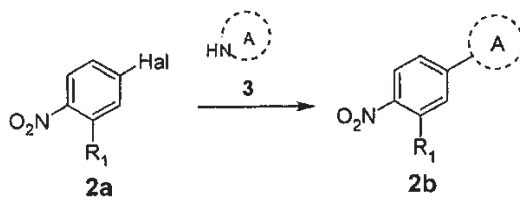
32. In vitro-fremgangsmåte for modulering av CFTR-aktivitet i en biologisk prøve som omfatter trinnet med å sette CFTR i kontakt med en forbindelse ifølge et hvilket som helst av krav 1 - 19.

33. Prosess for tilberedning av en forbindelse av formel (**Ic**),



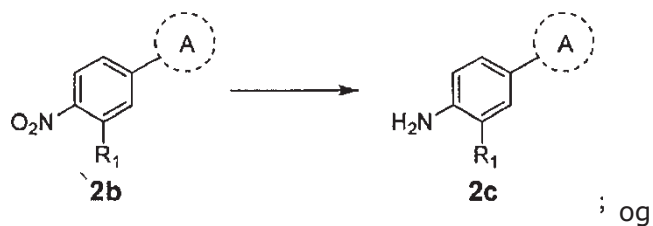
eller farmasøytisk akseptable salter derav, omfattende trinnene med:

- (a) reaksjon av en forbindelse av formel **2a** med et amin i formel **3** for å gi en forbindelse av formel **2b**



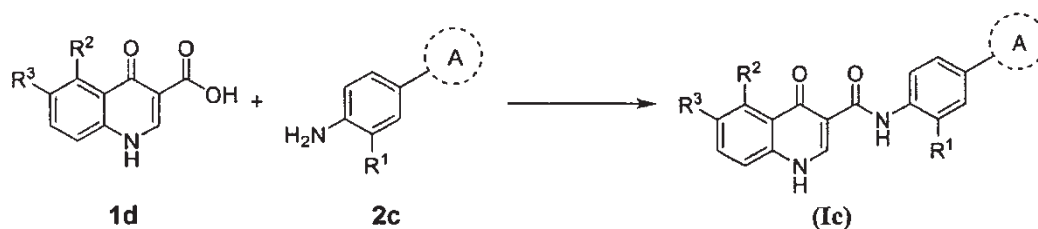
- (b) konvertering av forbindelsen i formel **2b** til aminet i formel **2c** via reduksjon

99

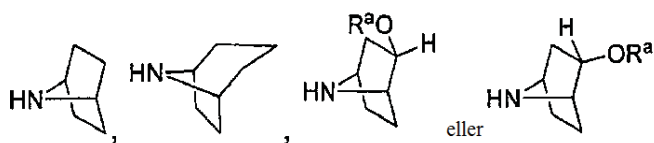


(c) reaksjon av aminet i formel **2c** med en syre i formel **1d** for å gi en forbindelse av formel (**1c**)

5



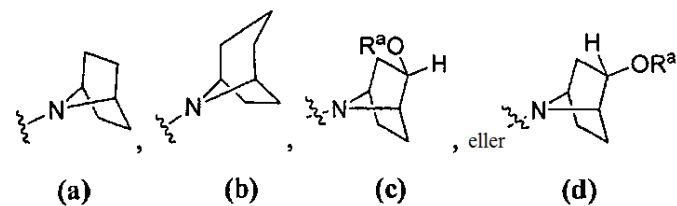
der Hal er F, Cl, Br eller I; aminet i formel 3 er



10

og

ring A velges fra:



15

der

R^1 er $-\text{CF}_3$, $-\text{CN}$ eller $-\text{C}\equiv\text{CCH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$;

R^2 er hydrogen, $-\text{CH}_3$, $-\text{CF}_3$, $-\text{OH}$ eller $-\text{CH}_2\text{OH}$;

R^3 er hydrogen, $-\text{CH}_3$, $-\text{OCH}_3$ eller $-\text{CN}$;

gitt at både R^2 og R^3 ikke samtidig er hydrogen, og

R^a er hydrogen eller en silylbeskyttende gruppe valgt fra gruppen bestående av trimetylsilyl (TMS), *tert*-butyldifenylsilyl (TBDPS), *tert*-butyldimetylsilyl (TBDMS), triisopropylsilyl (TIPS) og [2-(trimetylsilyl)etoksy]metyl (SEM).

20

34. Prosessen ifølge krav 33, der aminet i formel **3** i trinn (a) genereres in situ fra aminhydrokloridsaltet.

5 35. Prosessen ifølge krav 34, der R^a er TBDMS.

36. Prosessen ifølge krav 35, der trinn (a) finner sted i acetonitril i nærvær av trietylamin.

10 37. Prosessen ifølge klausul 33, der trinnet (b) finner sted i nærvær av en palladiumkatalysator, der løsemidlet omfatter metanol eller etanol.

38. Prosessen ifølge klausul 33, der trinn (b) finner sted i nærvær av Fe og FeSO₄ eller Zn og AcOH.

15

39. Prosessen ifølge krav 33, der trinn (c) finner sted i et løsemiddel i nærvær av O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetrametyluroniumheksafluorofosfat (HATU) og trietylamin eller i et løsemiddel i nærvær av propylfosfonsyre syklisk vannfri (T3P®) og pyridin.

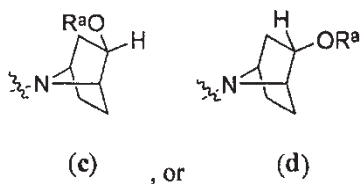
20

40. Prosessen ifølge krav 39, der løsningen i trinn (c) omfatter N,N-dimetylformamid (DMF), etylacetat eller 2-metyltetrahydrofuran.

41. Prosessen ifølge krav 40, der R^a er TBDMS.

25

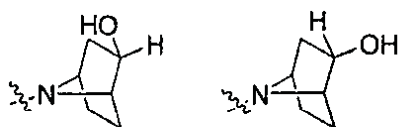
42. Prosessen ifølge krav 33 som videre omfatter en avbeskyttelsesreaksjon når ring A er



30

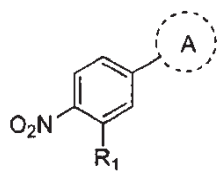
der R^a er en silyl-beskyttende gruppe, for generering av formel (I), der ring A er

101



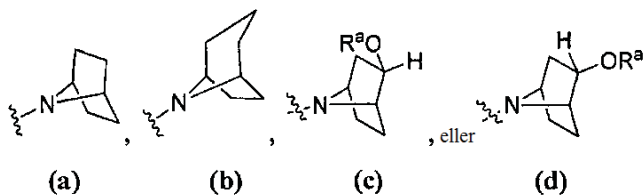
(c) , eller (d) .

43. Forbindelse som er



5

der ring A er



10

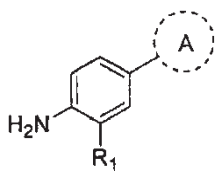
der

 R^1 er $-\text{CF}_3$, $-\text{CN}$ eller $-\text{C}\equiv\text{CCH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$, og

R^a er hydrogen eller en silylbeskyttende gruppe valgt fra gruppen bestående av trimetylsilyl (TMS), *tert*-butyldifenylsilyl (TBDPS), *tert*-butyldimetylsilyl (TBDMS), triisopropylsilyl (TIPS) og [2-(trimetylsilyl)etoksy]metyl (SEM).

15

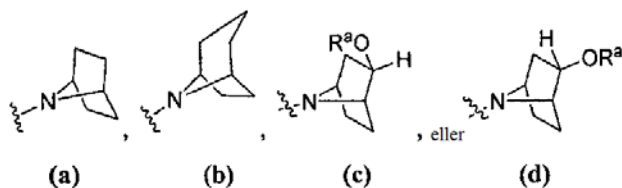
44. Forbindelse som er



20

der ring A er

102



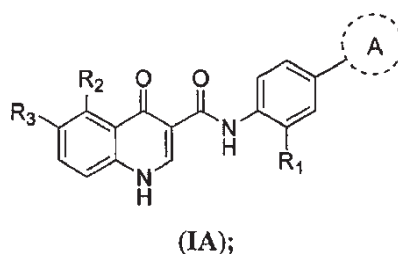
der

R^1 er $-\text{CF}_3$, $-\text{CN}$ eller $-\text{C}\equiv\text{CCH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$, og

5 R^a er hydrogen eller en silylbeskyttende gruppe valgt fra gruppen bestående av trimetylsilyl (TMS), *tert*-butyldifenylsilyl (TBDPS), *tert*-butyldimetylsilyl (TBDMS), triisopropylsilyl (TIPS) og [2-(trimetylsilyl)etoksy]metyl (SEM).

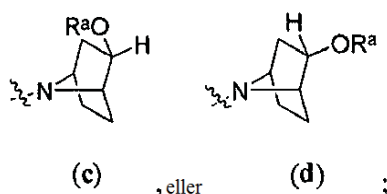
45. Forbindelse av formel (IA):

10



eller farmasøytisk akseptable salter derav, der:
ring A velges fra

15



der

R^1 er $-\text{CF}_3$, $-\text{CN}$ eller $-\text{C}\equiv\text{CCH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$;

20

R^2 er hydrogen, $-\text{CH}_3$, $-\text{CF}_3$, $-\text{OH}$ eller $-\text{CH}_2\text{OH}$;

R^3 er hydrogen, $-\text{CH}_3$, $-\text{OCH}_3$ eller $-\text{CN}$;

gitt at både R^2 og R^3 ikke samtidig er hydrogen, og

R^a er en silylbeskyttende gruppe valgt fra gruppen bestående av trimetylsilyl (TMS), *tert*-butyldifenylsilyl (TBDPS), *tert*-butyldimetylsilyl (TBDMS), triisopropylsilyl (TIPS) og [2-(trimetylsilyl)etoksy]metyl (SEM).

25