

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 596 521**

51 Int. Cl.:

C07D 207/08 (2006.01)

C07D 207/10 (2006.01)

A61K 31/40 (2006.01)

A61P 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.05.2013 PCT/IB2013/053962**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.11.2013 WO13171687**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.05.2013 E 13731930 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.07.2016 EP 2850058**

54 Título: **Derivados de espiro[2.4]heptano sustituidos con puente 1-(p-tolil)ciclopropilo como agonistas de receptor de ALX**

30 Prioridad:

16.05.2012 EP 12168333

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

10.01.2017

73 Titular/es:

**ACTELION PHARMACEUTICALS LTD. (100.0%)
Gewerbstrasse 16
4123 Allschwil, CH**

72 Inventor/es:

**CORMINBOEUF, OLIVIER y
CREN, SYLVAIN**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 596 521 T3

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

DESCRIPCIÓN

Derivados de espiro[2.4]heptano sustituidos con puente 1-(p-tolil)ciclopropilo como agonistas de receptor de ALX

La presente invención se refiere a derivados de espiro[2.4]heptano con puentes sustituido con 1-(p-tolil)ciclopropilo de fórmula (I) y a su uso como productos farmacéuticos. La invención también se refiere a aspectos relacionados que incluyen procedimientos de preparación de los compuestos, composiciones farmacéuticas que contienen uno o más compuestos de fórmula (I) y, especialmente, a su uso como agonistas del receptor de ALX.

ALXR (alias Receptor de Lipoxina A4, FPRL1, FPR2; divulgado en el documento WO2003/082314 como la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 1 y la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2) es un miembro de familia de receptores acoplado a proteína G. Se ha descubierto que ALXR media en la movilización del calcio en respuesta a una elevada concentración del péptido formil-metionina-leucil-fenilalanina. Adicionalmente, se ha descubierto que un metabolito lipídico, lipoxina A4 (LXA4) y sus análogos se unen a ALLXR con elevada afinidad y aumentan la producción de ácido araquidónico y la activación de la proteína G en células transfectadas con ALXR (Chiang y col., *Pharmacol. Rev.*, 2006, 58, 463-487). Los efectos de LXA4 se han evaluado en diversos modelos animales de enfermedades y se ha demostrado que LXA4 tiene potentes actividades antiinflamatorias y pro-resolutivas. Los modelos de enfermedad en las que LXA4, o sus derivados o análogos estables demostraron actividades in vivo son, por ejemplo, inflamación dérmica, bolsa de aire dorsal, lesión isquémica/reperfusión, peritonitis, colitis, nefritis mesangioproliferativa, pleuritis, asma, fibrosis quística, sepsis, lesión en la córnea, angiogénesis, periodontitis, hiperalgia inducida por carragenano y enfermedad del injerto contra el huésped (EICH) (Schwab y Serhan, *Current Opin in Pharmacology*, 2006, 414-420). La lipoxina S4 inhibió la expresión de IL-6 en sinoviocitos similares a los fibroblastos humanos (Sodin-Semrl y col., *Int J Immunopathol Pharmacol* (2004) 17:15-25) y un agonista estable de FPR2, BML-111, redujo la gravedad de la artritis inducida por colágeno (Zhang y col., (2008) *Inflamm Res* 57:157-162), lo que demuestra un posible uso de los agonistas de FPR2 en el tratamiento de la artritis reumatoide. Se demostró una reducción de la inflamación pulmonar en ratones con lesión pulmonar aguda (LPA) cuando fueron tratados con lipoxina A4 estable (Jin y col., (2007) *Anesth Analg* 104:369-377). Se han descrito niveles menores de lipoxina A4 en el asma grave (Celik y col., (2007) *Clin Exp Allergy* 37:1494-1501; Planaguma y col., (2008) *Am J Respir Crit Care Med* 178:574-582) y mejora de las respuestas del asma en modelos animales mediante análogos estable de la lipoxina A4 (Levy y col., (2002) *Nat Med* 8:1018-1023; Levy y col., (2007) *FASEB J* 21:3877-3884). En la fibrosis quística se demostró que los niveles de lipoxina A4 pulmonar disminuyen tanto en el pulmón de pacientes con fibrosis quística como en modelos animales de la enfermedad (Karp y col., (2004) *Nat Immunol* 5:388-392); el tratamiento con análogo estable de la lipoxina mejoró la acumulación celular inflamatoria en el pulmón enfermo y reducción de la pérdida de peso corporal en los mismos animales (Karp y col., (2004) *Nat Immunol* 5:388-392). El tratamiento tópico con lipoxina A4 aumenta la reepitelización y disminuye la inflamación de la superficie corneal seca (Gronert, (2005) *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 73:221-229; Gronert y col., (2005) *J Biol Chem* 280:15267-15278), lo que demuestra un uso posible de agonistas de FPR2 en el tratamiento de la queratoconjuntivitis seca. La administración de los análogos de lipoxina A4 redujo la gravedad de la colitis en un modelo de ratón de enfermedad intestinal inflamatoria (Gewirtz y col., (2002) *Eicosanoids and other Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation, and Radiation Injury*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, 229-236). Asimismo, se identificó que el ALXR era un receptor funcional de un número variado de péptidos, incluyendo un fragmento de la proteína priónica, un péptido derivado de gp120 de la cepa (HIV)-1_{LA1} del virus de la inmunodeficiencia humana, y del amiloide-beta 1-42 (Ab42) (para una revisión, Le y col., *Protein Pept Lett.*, 2007, 14, 846-853), y se ha sugerido que participa en la patogenia de la enfermedad de Alzheimer (EAA) en varias vías cruciales (Yazawa y col., *FASEB J.*, 2001, 15, 2454-2462). La activación de ALXR en macrófagos y microglíocitos inicia una cascada de señalización intermediada por la proteína G que aumenta la migración celular direccional; la fagocitosis y la liberación del mediador. Estos acontecimientos pueden representar el reclutamiento de células mononucleares en la vecindad de las placas seniles en las áreas enfermas del cerebro con EA, en el que Ab42 se produce en exceso y se acumula. Aunque la acumulación de leucocitos en los emplazamientos de la lesión tisular se puede considerar una respuesta innata del huésped destinada al aclaramiento de agentes perjudiciales, los fagocitos mononucleares activados también liberan diversas sustancias, tales como aniones superóxido, que pueden ser tóxicos para las neuronas. Por lo tanto, ALXR puede mediar en las respuestas proinflamatorias producidas por Ab42 en cerebros con EA y exacerbar el avance de la enfermedad. Adicionalmente, la humana es un ligando de actividad elevada para ALXR y es neuroprotector en modelos de enfermedad de Alzheimer (Mamiya y col., (2001) *Br J Pharmacol* 134:1597-1599; Ying y col., (2004) *J Immunol* 172:7078-7085; Miao y col., (2008) *Neuropeptides* 42:557-567).

Las propiedades biológicas de los agonistas de ALXR incluyen, pero no están limitadas a, migración/activación de monocitos/macrófagos/microglíocitos/dendríticas, migración/activación de neutrófilos, regulación de la activación de linfocitos, proliferación y diferenciación, regulación de la inflamación, regulación de la producción y/o liberación de citocinas, regulación de la producción y/o liberación de mediadores proinflamatorios, regulación de la reacción inmunitaria.

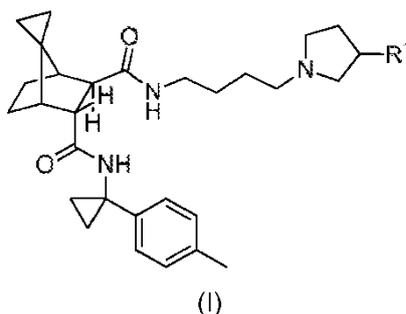
La presente invención provee derivados de espiro[2.4]heptano en puente sustituidos con 1-(p-tolil)ciclopropilo, que son agonistas no peptídicos del receptor ALX humano. Derivados de espiro[2.4]heptano en puente sustituidos con 1-(p-tolil)ciclopropilo con actividad agonista en el receptor de ALX humano se han divulgado en los documentos WO 2010/134014, WO2011/163502, WO2012/066488 y WO2013/009543. Diferentes derivados de espiro[2.4]heptano en puente se han divulgado en el documento WO95/02587. Los compuestos son útiles para la prevención o tratamiento

de enfermedades que responden a la modulación del receptor de ALX, tales como enfermedades inflamatorias, enfermedades obstructivas de las vías respiratorias, estados alérgicos, infecciones retrovirales mediadas por el VIH, trastornos cardiovasculares, neuroinflamación, trastornos neurológicos, dolor, enfermedades mediadas por priones y trastornos mediados por amiloides (especialmente la enfermedad de Alzheimer); además son útiles en la prevención o tratamiento de enfermedades autoinmunitarias y para la modulación de respuestas inmunitarias (especialmente las provocadas por vacunación).

En comparación con los compuestos más cercanos de la técnica anterior divulgados en el documento WO2010/134014, los compuestos de la presente invención muestran una actividad agonista sorprendentemente superior.

10 A continuación se presentan diversas realizaciones de la invención:

1) La presente invención se refiere a compuestos de fórmula (I),



en la que

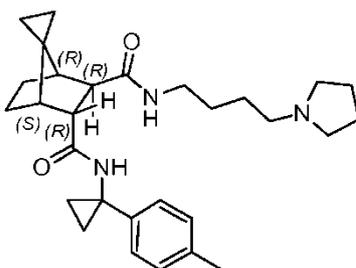
R^1 es hidrógeno o flúor,

15 y a sales (en particular sales farmacéuticamente aceptables) de dichos compuestos.

La configuración de los compuestos de fórmula (I) de acuerdo con la realización 1) es tal que los dos sustituyentes amida están en disposición *trans* y que el resto ciclopropilo del resto espiro[2.4]heptano en puente está en proximidad relativa a la amida sustituida con pirrolidino (posición *exo*).

Para evitar cualquier duda, los compuestos de fórmula (I) se denominan en analogía con el ejemplo siguiente:

20 el estereoisómero puro de estructura

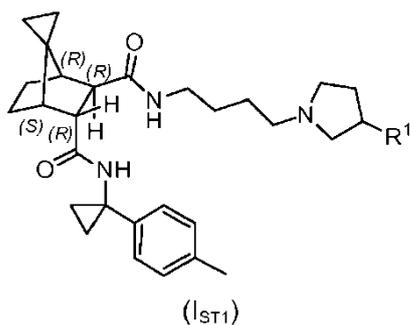


se denomina

25 (1*R*,2*R*,3*R*,4*S*)-*N*²-(4-(pirrolidin-1-il)butil)-*N*³-(1-(*p*-tolil)ciclopropil)espiro[biciclo[2.2.1]heptano-7,1'-ciclopropano]-2,3-dicarboxamida; o (5*R*)-*N*⁶-(1-(*p*-tolil)ciclopropil)-(6*R*)-*N*⁶-(4-(pirrolidino)butil)-(4*S*,7*R*)-[4,7-etilen-espiro[2.4]heptano]-5,6-dicarboxamida.

Los compuestos de fórmula (I) de acuerdo con la realización 1) pueden contener uno o más centros estereogénicos o asimétricos, tal como uno o más átomos de carbono asimétricos. A menos que se indique lo contrario los sustituyentes en un doble enlace pueden estar presentes en la configuración (*Z*) - o (*E*) -. Por tanto, los compuestos de fórmula (I) pueden estar presentes como mezclas de estereoisómeros o, preferiblemente, como estereoisómeros puros. Las mezclas de estereoisómeros pueden estar separadas de manera conocida por un experto en la técnica.

2) Una realización preferente de la invención se refiere a compuestos de fórmula (I) de acuerdo con la realización 1), que también son compuestos de fórmula (I_{ST1}),



en la que

R^1 es hidrógeno o flúor,

y a sales (en particular sales farmacéuticamente aceptables) de dichos compuestos.

- 5 3) Una realización adicional de la invención se refiere a compuestos de fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1) o 2), en la que

R^1 representa hidrógeno;

y a sales (en particular sales farmacéuticamente aceptables) de dichos compuestos.

- 10 4) Una realización adicional de la invención se refiere a compuestos de fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1) o 2), en la que

R^1 representa flúor;

y a sales (en particular sales farmacéuticamente aceptables) de dichos compuestos.

- 5) Una realización adicional de la invención se refiere a compuestos de fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1) o 2), en la que

- 15 R^1 representa flúor y el átomo de carbono unido a R^1 está en configuración (S);

y a sales (en particular sales farmacéuticamente aceptables) de dichos compuestos.

- 6) Una realización adicional de la invención se refiere a compuestos de fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1) o 2), en la que

R^1 representa flúor y el átomo de carbono unido a R^1 está en configuración (R);

- 20 y a sales (en particular sales farmacéuticamente aceptables) de dichos compuestos.

- 7) Un compuesto preferente de fórmula (I) como se define en la realización 1) es:

(5R)- N^5 -(1-(*p*-tolil)ciclopropil)-(6R)- N^6 -(4-(pirrolidino)butil)-(4S,7R)-[4,7-etilen-espiro[2.4]heptano]-5,6-dicarboxamida;

o una sal (en particular, la sal farmacéuticamente aceptable) de un compuesto de este tipo;

- 25 Es bien entendido que la invención se refiere a compuestos de acuerdo con la realización 1); o de acuerdo con la realización 1) limitada por las características de una forma de realización dependiente de la realización 1); o de acuerdo con la realización 1) limitada por las características de una cascada de realizaciones dependientes, por ejemplo en forma de "realización 3) en función de la realización 2) en función de la realización 1)". En caso de una forma de realización en función de más de una u otra realización, se entiende que cada combinación se divulga específicamente. Los ejemplos de realizaciones que son posibles en función de las dependencias de las realizaciones 1) a 7) como se ha divulgado anteriormente en el presente documento y que, por lo tanto, están destinados y se divulgan específicamente en el presente documento en forma individualizada son:

1, 2+1, 3+1, 3+2+1, 4+1, 4+2+1, 5+1, 5+2+1, 6+1, 6+2+1 y 7+1;

- 35 en los que en la lista anterior, los números hacen referencia a las realizaciones de acuerdo con su numeración proporcionada en el presente documento anteriormente, mientras que "+" indica la dependencia de otra realización. Las diferentes realizaciones individualizadas están separadas por comas. En otras palabras, "3 + 2 + 1", por ejemplo, se refiere a la realización 3) en función de la realización 2) en función de la realización 1), es decir, la realización "3 + 2 + 1" corresponde a la realización 1) aún más limitada por las características de las realizaciones 2)

y 3).

La presente invención también incluye compuestos de fórmula (I) marcados isotópicamente, especialmente marcados con ^2H (deuterio), dichos compuestos son idénticos a los compuestos de fórmula (I), excepto en que uno o más átomos se han sustituido, cada uno de ellos, por un átomo que tiene el mismo número atómico pero diferente número másico con respecto al número másico que se encuentra habitualmente en la naturaleza. Los compuestos de fórmula (I) marcados isotópicamente, especialmente marcados con ^2H (deuterio) y sales de los mismos están dentro del ámbito de la presente invención. La sustitución del hidrógeno por su isótopo pesado ^2H (deuterio) puede conducir a una estabilidad metabólica mayor, que da como resultado, por ejemplo, un aumento de la semivida *in vivo* o una reducción en los requisitos de dosificación, o puede conducir a una reducción en la inhibición de las enzimas del citocromo P450, lo que da como resultado, por ejemplo, un perfil de seguridad mejorado. En una realización de la invención, los compuestos de fórmula (I) no están marcados isotópicamente o solo están marcados con uno o más átomos de deuterio. En una realización secundaria, los compuestos de fórmula (I) no están marcados isotópicamente en absoluto. Los compuestos de fórmula (I) marcados isotópicamente se pueden preparar de manera análoga a los procedimientos descritos más adelante en el presente documento, pero usando la variación isotópica apropiada de los reactivos y materiales de partida.

La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales no tóxicas de adición de ácidos o bases orgánicos y/o inorgánicos, por ejemplo, "Salt selection for basic drugs", *Int. J. Pharm.* (1986), 33, 201-217.

Cuando se utiliza la forma plural para los compuestos, las sales, composiciones farmacéuticas, enfermedades y similares, también se quiere decir un solo compuesto, sal, o similar.

Los compuestos de fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1) a 7) o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, son adecuados como medicamentos. En particular, los compuestos de fórmula (I) modulan el receptor de ALX, es decir, actúan como agonistas del receptor de ALX, y son útiles en la prevención o el tratamiento de enfermedades que responden a la activación del receptor de ALX, tales como enfermedades inflamatorias, enfermedades obstructivas de las vías respiratorias, afecciones alérgicas, infecciones por retrovirus mediadas por el VIH, trastornos cardiovasculares, neuroinflamación, trastornos neurológicos, dolor, enfermedades mediadas por priones y trastornos mediados por el amiloide (especialmente, enfermedad de Alzheimer); además, son útiles para la modulación de respuestas inmunitarias (especialmente, las producidas por la vacunación). Especialmente, los compuestos de fórmula (I) son útiles en la prevención o el tratamiento de enfermedades tales como enfermedades inflamatorias, enfermedades obstructivas de las vías respiratorias, afecciones alérgicas, trastornos cardiovasculares, neuroinflamación, trastornos neurológicos, dolor, enfermedades mediadas por priones y trastornos mediados por el amiloide (especialmente, enfermedad de Alzheimer).

En particular, los compuestos de fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1) a 7), o sales terapéuticamente aceptables de los mismos, son adecuados para la prevención o el tratamiento de enfermedades seleccionadas entre enfermedades inflamatorias, enfermedades obstructivas de las vías respiratorias y afecciones alérgicas.

Las enfermedades inflamatorias, enfermedades obstructivas de las vías respiratorias y afecciones alérgicas incluyen, pero no se limitan a, una, varias o todas de los siguientes grupos de enfermedades y trastornos:

1) Lesión pulmonar aguda (LPA); síndrome de dificultad respiratoria del adulto/agudo (SDRA); enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad de las vías respiratorias o de los pulmones (EPOC, COAD o COLD), incluyendo bronquitis crónica o disnea asociada con los anteriores; enfisema; así como agravamiento de la hiperreactividad de las vías respiratorias consecuencia del tratamiento farmacológico, en particular el tratamiento con otros fármacos inhaladores. Especialmente, las enfermedades inflamatorias, enfermedades obstructivas de las vías respiratorias y afecciones alérgicas incluyen EPOC, COAD y COLD.

2) Otras enfermedades inflamatorias, enfermedades obstructivas de las vías respiratorias y afecciones alérgicas incluyen bronquitis de cualquier tipo u origen.

3) Otras enfermedades inflamatorias, enfermedades obstructivas de las vías respiratorias y afecciones alérgicas incluyen bronquioectasia y neumoconiosis de cualquier tipo u origen.

4) Otras enfermedades inflamatorias, enfermedades obstructivas de las vías respiratorias y afecciones alérgicas incluyen asma de cualquier tipo u origen, incluyendo asma intrínseca (no alérgica) y asma extrínseca (alérgica), asma leve, asma moderada, asma grave, asma bronquítica, asma inducida por el ejercicio, asma laboral y asma inducida tras infección bacteriana.

5) En una realización adicional, los compuestos de fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1) a 7), o sales terapéuticamente aceptables de los mismos, son particularmente adecuados en la prevención o el tratamiento de enfermedades inflamatorias. Las enfermedades inflamatorias incluyen una, varias o todas de los siguientes grupos de enfermedades y trastornos:

5a) En particular, las enfermedades inflamatorias se refieren a trastornos relacionados con los neutrófilos, especialmente los trastornos de las vías respiratorias relacionados con los neutrófilos, entre los que se incluyen la hiperneutrofilia, ya que afecta a las vías respiratorias y/o a los pulmones. Otros trastornos relacionados con los neutrófilos también incluyen periodontitis, glomerulonefritis y fibrosis quística.

5b) Otras enfermedades inflamatorias incluyen enfermedades de la piel, tales como psoriasis, dermatitis de contacto, dermatitis atópica, dermatitis herpetiforme, esclerodermia, angitis hipersensible, urticaria, lupus eritematoso y epidermolisis.

5c) Otras enfermedades inflamatorias también están relacionadas con enfermedades o afecciones que tienen un componente inflamatorio. Las enfermedades o afecciones que tienen un componente inflamatorio incluyen, pero no se limitan a, enfermedades y afecciones que afectan al ojo, tales como la uveítis (anterior, intermedia y posterior), uveítis por el síndrome de Behçet, conjuntivitis, queratoconjuntivitis seca, queratoconjuntivitis seca por el síndrome de Sjögren, y conjuntivitis primaveral (y, especialmente, conjuntivitis, queratoconjuntivitis seca y conjuntivitis primaveral); enfermedades que afectan a la nariz, incluyendo rinitis y rinitis alérgica (y especialmente rinitis alérgica); y enfermedades inflamatorias en la que están implicadas reacciones autoinmunes, o que tienen un componente o etiología autoinmune, tales como lupus eritematoso sistémico, espondilitis anquilosante, síndrome de Behçet, síndrome de Sjögren, policondritis, esclerodermia, granulomatosis de Wegener, dermatomiositis, hepatitis crónica activa, miastenia grave, síndrome de Stevens-Johnson, esteatorrea idiopática, enfermedad intestinal inflamatoria autoinmune (por ejemplo, colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn), oftalmopatía endocrina, neumonitis hipersensible crónica, cirrosis biliar primaria, queratoconjuntivitis seca y queratoconjuntivitis primaveral, fibrosis pulmonar intersticial, artritis psoriásica y glomerulonefritis.

5d) Otras enfermedades inflamatorias en la que están implicadas reacciones autoinmunes, o que tienen un componente o etiología autoinmune, incluyen artritis reumatoide, tiroides de Hashimoto y diabetes tipo I o II.

Además, los compuestos de fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1) a 31), o sales terapéuticamente aceptables de los mismos, son adecuados en la prevención o el tratamiento del rechazo del trasplante de órganos o tejidos, por ejemplo para el tratamiento de receptores de trasplante de corazón, pulmón, pulmón y corazón combinado, hígado, riñón, de páncreas, de piel o de córnea, y en la prevención de la enfermedad de injerto contra el huésped, tal como sucede a veces después de un trasplante de médula ósea, especialmente en el tratamiento agudo o crónico del rechazo de aloinjerto o xenoinjerto o en el trasplante de células productoras de insulina, por ejemplo, células de islotes pancreáticos.

Adicionalmente, los compuestos de fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1) a 7) o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, son adecuados en la prevención o el tratamiento de infecciones por retrovirus mediadas por el VIH. Las infecciones por retrovirus mediadas por el VIH incluyen, pero no se limitan a, una, varias o todas de los grupos de enfermedades y trastornos causados por las cepas de VIH-1 y VIH-2 tales como GUN-4v, GUN-7wt, AG204, AG206, AG208, HCM305, HCM308, HCM342, mSTD104 y HCM309.

Adicionalmente, los compuestos de fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1) a 7) o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, son adecuados en la prevención o el tratamiento de trastornos cardiovasculares. Los trastornos cardiovasculares se refieren a uno o más estados de enfermedad del árbol cardiovascular (que incluye al corazón) y a las enfermedades de órganos dependientes. Los estados patológicos del árbol cardiovascular y las enfermedades de los órganos dependientes incluyen, pero no se limitan a, trastornos del músculo cardíaco (miocardiopatía o miocarditis), tales como miocardiopatía idiopática, miocardiopatía metabólica que incluye miocardiopatía diabética, miocardiopatía alcohólica, miocardiopatía inducida por fármacos, miocardiopatía isquémica, y miocardiopatía hipertensora; trastornos ateromatosos de los vasos sanguíneos principales (enfermedad macrovascular) tales como la aorta, las arterias coronarias, las arterias carótidas, las arterias cerebrovasculares, las arterias renales, las arterias ilíacas, las arterias femorales, las arterias poplíteas; trastornos inducidos por sustancias tóxicas, fármacos y metabólicos (incluyendo hipertensores y/o diabéticos) de los vasos sanguíneos pequeños (enfermedad microvascular) tales como las arteriolas retinianas, las arteriolas glomerulares, los vasos vasculares, las arteriolas cardíacas, y los lechos capilares asociados del ojo, riñón, corazón, y los sistemas nerviosos central y periférico; y, la ruptura de placa en lesiones ateromatosas de los vasos sanguíneos principales, tales como la aorta, las arterias coronarias, las arterias carótidas, las arterias cerebrovasculares, las arterias renales, las arterias ilíacas, las arterias femorales y las arterias poplíteas.

Adicionalmente, los compuestos de fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1) a 7) o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, son adecuados en la prevención o el tratamiento de la neuroinflamación. La neuroinflamación se refiere a la producción de moléculas de señalización celular, activación de la glía o de las rutas de activación gliales, así como sus respuestas, de citocinas o quimiocinas proinflamatorias, activación de astrocitos o de las rutas de activación de astrocitos, así como sus respuestas, activación de la microglía o de las rutas de activación microgliales, así como sus respuestas, respuestas relacionadas con el estrés oxidativo tales como la producción de la óxido nítrico sintasa y la acumulación de óxido nítrico, proteínas en fase aguda, pérdida de sinaptofisina y proteína postsináptica con densidad 95 (PSD-95), componentes de la cascada del complemento, pérdida o reducción de la función sináptica, actividad proteína quinasa (por ejemplo, muerte asociada a la actividad de la proteína quinasa), deficiencias conductuales, daño celular (por ejemplo, daño neuronal), muerte celular (por ejemplo, muerte neuronal), y/o deposición del β -amiloide en placas amiloides.

Adicionalmente, los compuestos de fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1) a 7) o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, son adecuados en la prevención o el tratamiento de trastornos neurológicos. En particular, los trastornos neurológicos incluyen, pero no se limitan a, epilepsia, ictus, isquemia cerebral, parálisis cerebral, esclerosis múltiple remitente recidivante, esclerosis múltiple progresiva, neuromielitis

5 óptica, síndrome clínicamente aislado, enfermedad de Alpers, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), demencia senil, demencia con cuerpos de Lewy, síndrome de Rett, traumatismo médula espinal, lesión cerebral traumática, neuralgia del trigémino, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome de Guillain-Barré, neuralgia glossofaríngea, parálisis de Bell, miastenia grave, distrofia muscular; atrofia muscular progresiva, atrofia muscular heredada bulbar progresiva, síndromes de discos vertebrales herniados, rotos o protuberantes, espondilosis cervical, trastornos del plexo, síndromes de destrucción de la salida torácica, neuropatías periféricas, declive cognitivo leve, declive cognitivo, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, y corea de Huntington (y especialmente epilepsia, ictus, isquemia cerebral, parálisis cerebral, esclerosis múltiple remitente recidivante, esclerosis múltiple progresiva, enfermedad de Alpers, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), demencia senil, demencia con cuerpos de Lewy, síndrome de Rett, traumatismo en la médula espinal, lesión cerebral traumática, neuralgia del trigémino, neuralgia glossofaríngea, parálisis de Bell, miastenia grave, distrofia muscular; atrofia muscular progresiva, atrofia muscular heredada bulbar progresiva, síndromes de discos vertebrales herniados, rotos o protuberantes, espondilosis cervical, trastornos del plexo, síndromes de destrucción de la salida torácica, neuropatías periféricas, declive cognitivo leve, declive cognitivo, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, y corea de Huntington).

Adicionalmente, los compuestos de fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1) a 7) o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, son adecuados en la prevención o el tratamiento del dolor. El dolor incluye, pero sin limitaciones, dolor neuropático ilustrado por afecciones tales como neuropatía diabética, neuralgia postherpética, neuralgia del trigémino, polineuropatía diabética dolorosa, dolor posterior a ictus, dolor posterior a amputación, dolor mielopático o radiculopático, dolor facial atípico o síndromes análogos a causalgia.

Adicionalmente, los compuestos de fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1) a 7) o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, son adecuados en la prevención o el tratamiento de enfermedades mediadas por priones. Las enfermedades mediadas por priones, también conocidas como encefalopatías espongiiformes transmisibles (EET) incluyen, pero no se limitan a, kuru, síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (SGS), insomnio familiar fatal (IFF) y enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ).

Adicionalmente, los compuestos de fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1) a 7) o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, son adecuados en la prevención o el tratamiento de trastornos mediados por amiloides. Los trastornos mediados por amiloide se han definido como enfermedades y trastornos que están causados, o asociados con, proteínas amiloide o de tipo amiloide. Las enfermedades y trastornos que están causados o asociados con proteínas amiloides o de tipo amiloide incluyen, pero no se limitan a, enfermedad de Alzheimer (EA), incluyendo enfermedades o afecciones caracterizadas por una pérdida de la capacidad de la memoria cognitiva, tales como, por ejemplo, afectación cognitiva leve (MCI); demencia con cuerpos de Lewy; síndrome de Down; hemorragia cerebral con amiloidosis. En otra realización, las enfermedades y trastornos que están causados o asociados con proteínas amiloides o de tipo amiloide incluyen parálisis supranuclear progresiva, amiloidosis de la cadena ligera del amiloide, neuropatías amiloides familiares, esclerosis múltiple, enfermedad de Creutzfeldt Jakob, enfermedad de Parkinson, demencia asociada a VIH, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), miositis por cuerpos de inclusión (IBM), inicio de diabetes en el adulto, y amiloidosis cardiaca senil (y especialmente, parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple, enfermedad de Creutzfeldt Jakob, enfermedad de Parkinson, demencia asociada a VIH, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), miositis por cuerpos de inclusión (IBM), inicio de diabetes en el adulto, y amiloidosis cardiaca senil).

Adicionalmente, los compuestos de fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1) a 7) o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, son adecuados en la modulación de las respuestas inmunitarias. La modulación de respuestas inmunes incluye, pero sin limitaciones, procedimientos basados en la administración a un sujeto de una composición de al menos un antígeno y al menos un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1) a 7), o sus sales terapéuticamente aceptables de los mismos. En algunos casos, la composición que contiene antígenos se administra en primer lugar, seguido de la administración de una composición de al menos uno de los compuestos de fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1) a 7), o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. En otros casos, la composición que contiene antígenos se administra en último lugar. Las diferentes composiciones se pueden administrar simultáneamente, en una secuencia próxima, o separadas en el tiempo. Dichos procedimientos y composiciones se proporcionan para una inmunización terapéutica y profiláctica (es decir, la provocación, potenciación, intensificación o modulación deliberada de una respuesta inmune adaptativa y/o innata). Las ventajas concretas pueden incluir una o más de las siguientes:

- 1) Una respuesta inmune acelerada tras la administración de al menos un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1) a 7), o sales terapéuticamente aceptables del mismo, y el antígeno, comparado con la administración del antígeno en solitario;
- 2) Una mayor sensibilidad a pequeñas cantidades del antígeno (por ejemplo, toxina o patógeno) o antígenos que no inducen de forma habitual fuertes respuestas inmunitarias; y
- 3) Tratamientos antineoplásicos más eficaces.

Además, los compuestos de fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1) a 7), o sales terapéuticamente aceptables de los mismos, son adecuados en la prevención o el tratamiento de la fibrosis quística,

la fibrosis pulmonar, la hipertensión pulmonar, la cicatrización de heridas, la nefropatía diabética, la reducción de la inflamación del tejido trasplantado, las enfermedades inflamatorias causadas por organismos patógenos.

Especialmente, los compuestos de fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1) a 7), o sales terapéuticamente aceptables de los mismos, son adecuados para la prevención o el tratamiento de enfermedades seleccionadas entre una, varias o todas de los siguientes grupos de enfermedades y trastornos:

- 5 1) enfermedades inflamatorias, enfermedades obstructivas de las vías respiratorias y afecciones alérgicas tales como lesión pulmonar aguda (LPA); síndrome de dificultad respiratoria del adulto/aguda (SDRA); enfermedad pulmonar obstructiva crónica, de las vías aéreas o de los pulmones (EPOC, COAD o GOLD), incluyendo bronquitis crónica o disnea asociadas con los anteriores; y asma de cualquier tipo u origen, incluyendo asma intrínseca (no alérgica) y asma extrínseca (alérgica), asma leve, asma moderada, asma grave, asma bronquítica, asma inducida por el ejercicio, asma laboral y asma inducida tras una infección bacteriana (y, especialmente, lesión pulmonar aguda (LPA) síndrome de dificultad respiratoria del adulto/aguda (SDRA) y asma de cualquier tipo u origen, incluyendo asma intrínseca (no alérgica) y asma extrínseca (alérgica), asma leve, asma moderada, asma grave, asma bronquítica, asma inducida por el ejercicio, asma laboral y asma inducida tras una infección bacteriana);
- 10 2) enfermedades inflamatorias, tales como trastornos relacionados con los neutrófilos, especialmente los trastornos relacionados con los neutrófilos de las vías respiratorias, entre los que se incluyen la hiperneutrofilia, ya que afecta a las vías respiratorias y/o los pulmones; periodontitis; glomerulonefritis; fibrosis quística; y enfermedades de la piel, tales como psoriasis, dermatitis de contacto, dermatitis atópica, dermatitis herpetiforme, esclerodermia, angitis hipersensible, urticaria, lupus eritematoso, y epidermolisis;
- 15 3) enfermedades que tienen un componente inflamatorio, tales como enfermedades o afecciones que afectan al ojo, tales como conjuntivitis, queratoconjuntivitis seca, y conjuntivitis primaveral; enfermedades inflamatorias en la que están implicadas reacciones autoinmunes o que tienen un componente o etiología autoinmune; y enfermedades intestinales inflamatorias autoinmunes (por ejemplo, colitis ulcerativa y enfermedad de Crohn);
- 20 4) Infecciones por retrovirus mediadas por el VIH, tales como enfermedades y trastornos causados por cepas de VIH-1 y VIH-2 tales GUN-4v, GUN-7wt, AG204, AG206, AG208, HCM305, HCM308, HCM342, mSTD104, y HCM309;
- 25 5) neuroinflamación, que se refiere a la producción de moléculas de señalización celular, activación de la glía o de las rutas de activación gliales, así como sus respuestas, citocinas o quimiocinas proinflamatorias, activación de astrocitos o de las rutas de activación de astrocitos, así como sus respuestas, respuestas relacionadas con el estrés oxidativo tales como la deposición de β -amiloide y deposición de placas amiloides;
- 30 6) trastornos neurológicos tales como ictus, isquemia cerebral, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson;
- 35 7) enfermedades mediadas por priones, también conocidas como encefalopatías espongiiformes transmisibles (EET), tales como kuru, síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (SGS), insomnio familiar fatal (IFF) y enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ);
- 8) trastornos mediados por el amiloide;
- 9) fibrosis quística, cicatrización de heridas y enfermedades inflamatorias causadas por organismos patógenos.

40 Lo más preferentemente, los compuestos de fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1) a 7), o sales terapéuticamente aceptables de los mismos, son adecuados para la prevención o el tratamiento de enfermedades seleccionadas del grupo que consiste en lesión pulmonar aguda (LPA), fibrosis quística, queratoconjuntivitis seca; enfermedad intestinal inflamatoria, artritis reumatoide y enfermedad de Alzheimer.

45 La invención también se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1) a 7) en la preparación de composiciones farmacéuticas para el tratamiento y/o la profilaxis de las enfermedades mencionadas anteriormente.

La presente invención se refiere también a sales farmacéuticamente aceptables y a composiciones y formulaciones farmacéuticas de los compuestos de fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1) a 7).

50 Una composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención contiene al menos un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1) a 7) (o una sal farmacéuticamente aceptable de del mismo) como el principio activo y, opcionalmente, vehículos y/o diluyentes y/o adyuvantes.

Los compuestos de fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1) a 7) y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos se pueden utilizar como medicamentos, por ejemplo en forma de composiciones farmacéuticas para administración enteral (tal como especialmente oral) o parenteral (incluyendo aplicación tópica o

inhalación).

La producción de las composiciones farmacéuticas se puede llevar a cabo de una forma que sea conocida de cualquier persona experta en la técnica (véase, por ejemplo, Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 21^a Edición (2005), Parte 5, "Pharmaceutical Manufacturing" [publicada por Lippincott Williams & Wilkins]) poniendo los compuestos descritos de fórmulas o sus sales farmacéuticamente aceptables, opcionalmente combinados con otras sustancias valiosas desde el punto de vista terapéutico, en una forma de administración galénica junto con materiales vehículos adecuados, no tóxicos, inertes, terapéuticamente compatibles sólidos o líquidos y, si se desea, con los adyuvantes farmacéuticos habituales.

La aplicación ilustra además un procedimiento para la prevención o tratamiento de una enfermedad o trastorno mencionado en el presente documento, que comprende administrar a un sujeto una cantidad farmacéuticamente activa de un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1) a 7), o una sal farmacéuticamente sal aceptable del mismo.

Cualquier referencia a un compuesto de fórmula I o I_{ST1} en este texto se ha de entender que se refiere también a las sales (y especialmente a las sales farmacéuticamente aceptables) de tales compuestos, según sea apropiado y conveniente. Las preferencias indicadas para los compuestos de fórmula I, por supuesto, se aplican *mutatis mutandis* a los compuestos de fórmula I_{ST1}, así como a las sales y las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de fórmula I o de fórmula I_{ST1}. Lo mismo se aplica a dichos compuestos y medicamentos, a las composiciones farmacéuticas que contienen dichos compuestos como principio activo o a los usos de dichos compuestos en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de las enfermedades de acuerdo con la presente invención.

Salvo que se use con respecto a las temperaturas, el término "aproximadamente" (o "alrededor de", de forma alternativa) situado antes de un valor numérico "X" se refiere, en la solicitud actual, a un intervalo que se extiende desde X menos 10 % de X hasta X más 10 % de X, y, preferiblemente, a un intervalo que se extiende desde X menos 5 % de X hasta X más 5 % de X. En el caso particular de las temperaturas, el término "aproximadamente" (o alrededor de, de forma alternativa) situado antes de una temperatura "Y" se refiere, en la solicitud actual, a un intervalo que se extiende desde Y menos 10 °C hasta Y más 10 °C, y, preferiblemente, a un intervalo que se extiende desde Y menos 5 °C hasta Y más 5 °C. Además, el término "temperatura ambiente" (ta) tal como se usa en el presente documento se refiere a una temperatura de aproximadamente 25 °C.

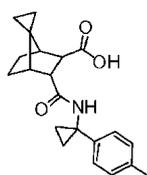
Cada vez que la palabra "entre" se utilice para describir un rango numérico, debe entenderse que los puntos extremos de la gama indicada se incluyen explícitamente en el intervalo. Por ejemplo: si se describe que un intervalo de temperatura está entre 40 °C y 80 °C, significa que los extremos 40 °C y 80 °C están incluidos en el intervalo; o si una variable se define como un número entero entre 1 y 4, esto significa que la variable es el número entero 1, 2, 3 o 4.

Los compuestos de Fórmula I se pueden fabricar según los procedimientos indicados a continuación, según los procedimientos indicados en los Ejemplos o según procedimientos análogos. Las condiciones óptimas de la reacción pueden variar con los reactantes o disolventes particulares utilizados, pero dichas condiciones las puede determinar un experto en la materia mediante procedimientos rutinarios de optimización.

Si no se indica de otra forma, el grupo genérico R¹ es como se han definido en la fórmula (I). Otras abreviaturas utilizadas se han definido en la sección experimental.

40 A. Síntesis de los productos finales

Los compuestos de fórmula (I) pueden prepararse a partir del ácido carboxílico de estructura 1 mediante reacción con una amina apropiada utilizando condiciones de acoplamiento tales como EDC/HOBt, o DCC/HOAt, o PyBOP, o HATU en presencia de una base tal como DIPEA o DMAP o una combinación de ambos a una temperatura que varía desde la ta a aproximadamente 60 °C en un disolvente apropiado tal como CH₂Cl₂ o THF/DMF. Como alternativa, los compuestos de fórmula (I) se pueden preparar por acoplamiento del ácido carboxílico de estructura 1 con una amina apropiada usando POCl₃ en un disolvente adecuado tal como DCE/piridina (1:1). Como alternativa, los compuestos de fórmula (I) se pueden preparar por acoplamiento del ácido carboxílico de estructura 1 a través de la formación del cloruro de acilo (utilizando condiciones estándar tales como cloruro de oxalilo y una cantidad catalítica de DMF en un disolvente tal como tolueno o CH₂Cl₂).



50

Estructura 1

El ácido carboxílico de estructura 1 se puede preparar según el procedimiento dado en la parte experimental.

Las aminas adecuadas están disponibles comercialmente o pueden sintetizarse por los procedimientos dados en la parte experimental.

5 Siempre que los compuestos de fórmula (I) se obtienen en forma de mezclas de enantiómeros o diastereoisómeros, los enantiómeros o diastereoisómeros se pueden separar usando procedimientos conocidos para un experto en la técnica. por ejemplo, mediante la formación y separación de sales diastereoméricas o por HPLC sobre una fase estacionaria quiral, tal como una columna Daicel ChiralPak AD-H (5 μm), una columna Daicel ChiralCel OD-H columna (5 μm), una columna Daicel Chiralcel OD (10 μm), una columna Daicel ChiralPak IA (5 μm), una columna Daicel ChiralPak IB (5 μm), una columna Daicel ChiralPak IC (5 μm) o (R, R) -Whelk-01 (5 μm). Las condiciones típicas de HPLC quiral son en mezcla isocrática de eluyente A (EtOH), en presencia o ausencia de una base como NEt₃ y/o dietilamina o de un ácido como TFA) y eluyente B (heptano).

Parte experimental

Abreviaturas (tal como se usan en el presente documento y en la descripción anterior)

15	ac.	acuoso
	pe	punto de ebullición
	(n-)Bu	butilo
	aprox.	aproximadamente
	COAD	enfermedad obstructiva crónica de las vías respiratorias
	COLD	enfermedad obstructiva crónica de los pulmones
20	EPOC	enfermedad pulmonar obstructiva crónica
	DAD	matriz de detección de diodos
	DCC	<i>N,N'</i> -diciclohexilcarbodiimida
	DCE	1,2 dicloroetano
	DIPEA	diisopropiletilamina
25	DMAP	4- <i>N,N'</i> -dimetilaminopiridina
	DMEM	medio Eagle modificado de Dulbecco
	DMF	dimetilformamida
	DMSO	dimetilsulfóxido
	EA	acetato de etilo
30	CE ₅₀	concentración eficaz semimáxima
	EDC	<i>N</i> -(3-dimetilaminopropil)- <i>N'</i> -etilcarbodiimida
	ELSD	detección de evaporación por dispersión de luz
	equiv.	equivalente(s)
	Et	etilo
35	Éter o Et ₂ O	Éter dietílico
	Et ₃ N	trietilamina
	EtOH	etanol
	FC	cromatografía instantánea en columna de gel de sílice
	FLIPR	lector de placas mediante formación de imagen de fluorescencia
40	FPRL1	análogo al receptor péptido formilo-1
	FPRL2	análogo al receptor péptido formilo-2
	GSH	glutación
	h	hora(s)
	HATU	hexafluorofosfato de 2- (7-aza-1H-benzotriazol-1-il) -1,1,3,3-tetrametiluronio
45	HBSS	solución de sales equilibrada de Hank
	HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico
	Hept	heptano
	VIH	virus de la inmunodeficiencia humana
	HOBt	hidroxibenzotriazol
50	HOAt	7-aza-1-hidroxibenzotriazol
	HPLC	cromatografía de líquidos de alto rendimiento.
	CL-EM	cromatografía de líquidos con espectroscopia de masas
	Lem	longitud de onda de emisión
	Lex	lex longitud de onda de excitación
55	Me	metilo
	MeOH	metanol
	min	minuto(s)
	mM	milimolar
	μM	micromolar
60	EM	espectrometría de masas
	Ms	metanosulfonilo
	Nm	nanómetro

	nM	nanomolar
	RMN	resonancia magnética nuclear
	org.	orgánico
	<i>p</i>	<i>para</i>
5	PyBOP	benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidino-fosfonio-hexafluoro-fosfato
	R _f	factor de retención
	Rpm	revoluciones por minuto
	ta	temperatura ambiente
	sat.	saturado
10	<i>t</i> -Bu	<i>terc</i> -butilo
	TFA	ácido trifluoroacético
	THF	tetrahidrofurano
	TLC	cromatografía en capa fina
	TMS	trimetilsililo
15	t _R	tiempo de retención
	UV	ultravioleta
	Vis	visible

I Química

20 General. Todas las temperaturas se expresan en grados centígrados (°C). Salvo que se indique de otra forma, las reacciones tienen lugar a ta.

La cromatografía analítica en capa fina (TLC) se llevó a cabo en placas de 0, 2 mm: Merck, Gel de sílice 60 F₂₅₄. La cromatografía preparativa en capa fina (TLC) se llevó a cabo en placas de 0, 2 o 0, 5 mm: Merck, Gel de sílice 60 F₂₅₄. detección se llevó a cabo con UV o una disolución de KMnO₄ (3 g), K₂CO₃ (20 g), NaOH 5 % (3 ml) y H₂O (300 ml) con calentamiento posterior.

25 La cromatografía instantánea en columna (FC) y la filtración se llevaron a cabo usando gel de sílice 60 Merck (0,063-0,200 mm) o gel de sílice *Macherey-Nagel* (0,063-0,200 mm): elución con EA, Et₂O, hept, hexano, éter de petróleo, CH₂Cl₂, CHCl₃, MeOH, NH₄OH o mezclas de los mismos.

30 Condiciones de LC-MS 02 (si no se indica lo contrario): Analítica: Thermo Finnigan MSQ Plus MS con bomba binaria Agilent 1100 y DAD. Columna: Zorbax SB-AQ 5 μm, 4,6 x 50 mm de DI, de Agilent Technologies. Eluyentes: A: H₂O + 0,04 % de TFA; B: CH₃CN, Gradiente: 5 % DE B → 95 % DE B durante 1 min. Caudal: 4,50 ml/min; detección: UV/Vis y/o ELSD, y EM, el t_R se expresa en minutos.

35 Condiciones de LC-MS 07b (si no se indica lo contrario): Analytical. Bomba: Dionex HPG-3200RS, EM: Thermo MSQ Plus, DAD: Dionex DAD-3000RS, ELSD: Sedere Sedex 85. Columna: Zorbax SB-Aq 3,5 μm, 4,6 x 50 mm de DI de Agilent Technologies, termostatazada en el compartimento Dionex TCC-3200. Eluyentes: A: H₂O + 0,04 % de TFA; B: CH₃CN. Procedimiento: Gradiente: 5 % DE B → 95 % DE B durante 1,00 min. Caudal: 4,5 ml/min; detección: UV/Vis y/o ELSD, y EM, el t_R se expresa en minutos.

HPLC preparativa: X-Bridge C18 5 μm, 50 x 19 mm de DI, de Waters. Eluyentes: A: H₂O + 0,5 % de NH₄OH; B: CH₃CN, Gradiente: 10 % DE B → 90 % DE B durante 5 min. Caudal: 40,0 ml/min; detección: UV/Vis y/o ELSD, y EM, el t_R se expresa en minutos.

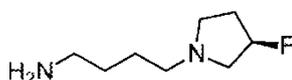
40 Condiciones de CG-EM 01: Thermo Trace GC Ultra, detector Thermo DSQ II MS, Thermo TriPlus Autosampler, columna: Zebtron ZB-5 MS, 15 m x 0,25 mm de DI, película de 0,25 μm, Caudal: 2,0 ml/min, gas portador: Helio, relación de separación: 20, temperatura de entrada SSL: 200 °C, gradiente de temperatura: 60 °C a 300 °C de 0,0 min a 4,0 min, 300 °C isoterma de 4,0 min a 5,0 min, Ionización: Ionización química con CH₄ como gas reactivo.

45 RMN: *Bruker Avance 400* (400 MHz); *Varian Mercury 300* (300 MHz); los desplazamientos químicos se proporcionan en ppm con respecto al disolvente utilizado; multiplicidades: s = singlete, d = doblete, t = triplete, q = cuadruplete, p = quintuplete, hex = hexete, hept == heptete, m = multipletes, a = ancho, las constantes de acoplamiento se proporcionan en Hz.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención, pero sin limitar el alcance de la misma.

Síntesis de los intermedios

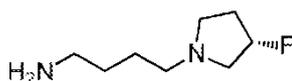
50 **(R)-4-(3-Fluoropirrolidin-1-il)butan-1-amina:**



En un matraz de fondo redondo secado a la llama equipado con un barra de agitación magnética y en atmósfera inerte (N₂), a una solución de clorhidrato de (R)-3-fluoropirrolidina (400 mg, 3,09 mmol) y 4-bromobutironitrilo (0,32 ml,

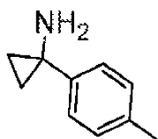
3,09 mmol) en CH₃CN (16 ml) seco se añadió K₂CO₃ (2,35 g, 16,99 mmol) a ta, seguido de KI (51 mg, 0,31 mmol). La mezcla de reacción se agitó a ta durante 15 horas. La mezcla se filtró y el filtrado se repartió entre agua y CH₂Cl₂. Las capas se separaron y la capa ac. se extrajo con CH₂Cl₂ (3x). Los extractos de las capas orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El nitrilo bruto se redisolvió en THF seco (23 ml) y se trató con LiAlH₄ (214 mg, 5,47 mmol) a 0 °C. La mezcla de reacción se calentó hasta temperatura ambiente y se agitó a esta temperatura hasta la finalización de la reacción. Después, se añadió NaOH ac. 1N (7 ml), se separaron las capas y la capa acuosa se extrajo con EA (3 x). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y los disolventes se retiraron a presión reducida para dar (R) -4-(3-fluoropirrolidin-1-il) butan-1-amina bruta en forma de un aceite incoloro. Condiciones de CG-EM 01: t_R = 1,71 min; [M+H]⁺ = 161,10.

(S)-4-(3-Fluoropirrolidin-1-il)butan-1-amina:



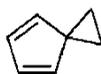
En un matraz de fondo redondo secado a la llama equipado con un barra de agitación magnética y en atmósfera inerte (N₂), a una solución de clorhidrato de (S)-3-fluoropirrolidina (200 mg, 1,54 mmol) y 4-bromobutironitrilo (0,16 ml, 1,54 mmol) en CH₃CN (8 ml) seco se añadió K₂CO₃ (1,17 g, 8,50 mmol) a ta, seguido de KI (26 mg, 0,15 mmol). La mezcla de reacción se agitó a ta durante 15 horas. La mezcla se filtró y el filtrado se repartió entre agua y CH₂Cl₂. Las capas se separaron y la capa ac. se extrajo con CH₂Cl₂ (3x). Los extractos de las capas orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El nitrilo bruto se redisolvió en THF seco (10 ml) y se trató con LiAlH₄ (92 mg, 2,35 mmol) a 0 °C. La mezcla de reacción se calentó hasta temperatura ambiente y se agitó a esta temperatura hasta la finalización de la reacción. Después, se añadió NaOH ac. 1N (3 ml), se separaron las capas y la capa acuosa se extrajo con EA (3 x). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y los disolventes se retiraron a presión reducida para dar (R) -4-(3-fluoropirrolidin-1-il) butan-1-amina bruta en forma de un aceite amarillo. Condiciones de CG-EM 01: t_R = 1,70 min; [M+H]⁺ = 161,10.

1-(p-Tolil)ciclopropanamina:

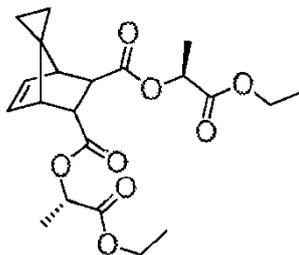


En un matraz de fondo redondo secado a la llama equipado con barra de agitación magnética y en atmósfera inerte (N₂), una solución de *p*-tolunitrilo (1195 mg, 10,00 mmol) en Et₂O (50 ml) seco se trató a -78 °C con Ti(O*i*-Pr)₄ (3,22 ml, 11,00 mmol) seguido de EtMgBr (7,33 ml de una solución 3,0 M en Et₂O, 22,00 mmol). La suspensión amarilla resultante se agitó a -78 °C durante 10 minutos, después se calentó hasta ta. Se añadió a la suspensión de color negro resultante BF₃·Et₂O (2,47 ml, 20,00 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a ta durante 1 hora. Se añadió cuidadosamente HCl acuoso 1 N (30 ml), seguido de Et₂O y después 10 % DE NaOH acuoso (100 ml). Las capas se separaron y la capa ac. se extrajo con Et₂O. Los extractos de las capas orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo bruto se purificó por FC (CH₂Cl₂/MeOH/NH₄OH, 1:0:0 -> 90:10:0,5) para obtener la amina del título como un aceite amarillo. TLC: fr (CH₂Cl₂/MeOH/NH₄OH, 95:5:0,5) = 0,46. Condiciones de CL-EM 07b: t_R = 0,49 min; [M+H]⁺ = 148,29.

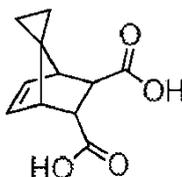
Espiro[2.4]hepta-4,6-dieno:



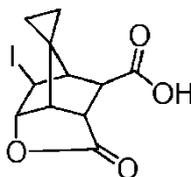
En un matraz de fondo redondo secado a la llama equipado con barra de agitación magnética y en atmósfera inerte (N₂), una mezcla de cloruro de benciltrietilamonio (18,0 g, 78 mmol) en 50 % de solución de NaOH acuoso (1,2 l) se calentó hasta 45 °C. A la solución agitada de NaOH se añadió una solución enfriada de ciclopentadieno (formado mediante craqueo del dímero de ciclopentadieno a 180 °C, 140 ml, 1,70 mol) en 1,2-dicloroetano (122 ml, 1,55 mol) manteniendo la temperatura interna por debajo de 55 °C. Tras la finalización de la adición (aproximadamente 1,75 h), la mezcla de reacción se agitó a 50 °C durante 2 h y se dejó enfriar a ta. Las capas se separaron, la capa orgánica se lavó con NaOH 1 M, se secó (Na₂SO₄) y se filtró. El líquido marrón bruto se destiló a presión reducida (8,5-9,5 MPa) y el compuesto del título se obtuvo como un líquido incoloro (punto de ebullición = 45 a 50 °C a 8 MPa). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 6,55 (m, 2H), 6,19 (m, 2H), 1,71 (s, 4H).

Reacción de Diels Alder - formación de (5R,6R)-5,6-bis-[(1-(1S)-etoxicarbonil)-etoxicarbonil]-(4S,7R)-[4,7-etenilen-espiro[2.4]heptano]:

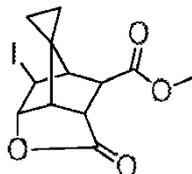
5 En un matraz de fondo redondo secado a la llama equipado con barra de agitación magnética y en atmósfera inerte (N_2), a una solución de (*E*)-1,2-bis-[(1-(1S)-1-etoxicarbonil)-etoxi-carbonil]-eteno (7,40 g, 22,69 mmol) en n-hexano (76 ml) se añadió espiro[2.4]hepta-4,6-dieno (3,14 g, 34,04 mmol) a ta. La mezcla de reacción se agitó a esta temperatura durante la noche. La mezcla se concentró a presión reducida y el residuo bruto se purificó por FC (hept/EA, 9: 1). El compuesto del título se obtuvo como un aceite amarillo claro. TLC: fr (hept/EA, 9:1) = 0,25. Condiciones de CL-EM 02: $t_R = 1,12$ min; $[M+H]^+ = 409,00$. RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 6,44 (dd, $J = 5,5, 3,0$ Hz, 1 H), 6,32 (dd, $J = 5,5, 2,8$ Hz, 1 H), 5,12 (q, $J = 7,1$ Hz, 1 H), 5,06 (q, $J = 7,1$ Hz, 1 H), 4,28-4,14 (m, 4 H), 3,76 (app. t, $J = 4,0$ Hz, 1 H), 2,92 (d, $J = 4,8$ Hz, 1 H), 2,86 (m, 1 H), 2,80 (m, 1 H), 1,55-1,47 (m, 6 H), 1,29 (t, $J = 7,3$ Hz, 3 H), 1,29 (t, $J = 7,3$ Hz, 3 H), 0,70 (m, 1 H), 0,56-0,44 (m, 3 H).

Saponificación - formación de ácido (4S,7R)-[4,7-etenilen-espiro[2.4]heptano]-(5R,6R)-5,6-bis-carboxílico:

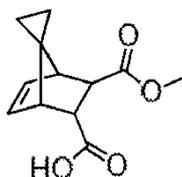
15 A una solución de (5R,6R)-5,6-bis-[(1-(1S)-etoxicarbonil)-etoxi-carbonil]-(4S,7R)-[4,7-etenilen-espiro[2.4]heptano] (9,51 g, 23,28 mmol) en THF/ H_2O (1:1, 232 ml) se añadió LiOH (3,91 g, 93,13 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se añadió HCl 1N con el fin de ajustar el pH de la mezcla de reacción a pH = 3, se separaron las capas y la capa acuosa se extrajo con EA (3 x). Los extractos de las capas orgánicas combinadas se secaron sobre $MgSO_4$, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo bruto se purificó por FC (CH_2Cl_2 /MeOH, 9:1) para dar el compuesto del título como un aceite incoloro. TLC: fr (CH_2Cl_2 /MeOH, 9:1) = 0,31. Condiciones de CL-EM 02: $t_R = 0,72$ min; $[M+CH_3CN+H]^+ = 250,18$.

Yodolactonización - Formación de ácido 6-yodo-2-oxohexahidroespiro[3,5-metanociclopenta[b]furan-4,1'-ciclopropano]-7-carboxílico (yodolactona 2):

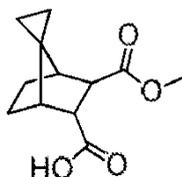
25 A una solución de ácido (4S,7R)-[4,7-etenilen-espiro[2.4]heptano]-(5R,6R)-5,6-bis-carboxílico (5,60 g, 22,32 mmol) en CH_2Cl_2 (33 ml) se añadieron $NaHCO_3$ (2,06 g, 24,56 mmol), agua (100 ml), KI (1,37 g, 82,60 mmol) y I_2 (6,80 g, 26,79 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. La reacción se inactivó mediante la adición de $Na_2S_2O_3$ acuoso saturado. Las capas se separaron y la capa ac. se extrajo con CH_2Cl_2 (3x). Los extractos de las capas orgánicas combinadas se secaron sobre $MgSO_4$, se filtraron y se concentraron a presión reducida. La espuma en bruto se purificó por FC (EA) para dar el compuesto del título como un sólido blanco. TLC: fr (EA) = 0,33.

Esterificación - Formación de ácido 6-yodo-2-oxohexahidroespiro[3,5-metanociclopenta[b]furan-4,1'-ciclopropano]-7-carboxilato de metilo:

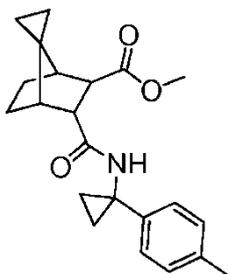
5 En un matraz de fondo redondo secado a la llama equipado con barra de agitación magnética y en atmósfera inerte (N_2), a una solución de yodolactona enantiopura 2 (5,00 g, 14,96 mmol) en MeOH seco (75 ml) se añadió $TMSCH_2N_2$ (2,0 M en hexanos, 37,0 ml, 74,00 mmol). La mezcla de reacción se agitó a ta durante la noche, se concentró a presión reducida y se purificó mediante FC (hept/EA, 4: 1) para dar el compuesto del título como un sólido blanco. TLC: fr (hept/EA, 4:1) = 0,18.

10 Retro-yodolactonización - formación de ácido (6R)-6-metoxicarbonil-(4S,7R)-[4,7-etenileno]-espiro[2.4]heptano]-(5R)-5-carboxílico:

15 En un matraz de fondo redondo secado a la llama equipado con barra de agitación magnética y en atmósfera inerte (N_2), a una solución de 6-yodo-2-oxohexahidroespiro[3,5-metanociclopenta[b]furan-4,1'-ciclopropano]-7-carboxilato de metilo (2,86 g, 8,21 mmol) en ácido acético (29 ml) se añadió polvo de cinc (8,06 g, 123,23 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 65 °C durante 4 horas, se enfrió hasta la ta, se filtró y se repartió entre agua y EA. Las capas se separaron y la capa ac. se extrajo con EA (3x). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron sobre $MgSO_4$, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo bruto se purificó por FC (hept/EA, 1:1)) y se obtuvo el compuesto del título como un aceite incoloro. TLC: fr (hept/EA, 1:1) = 0,41.

20 Reducción del doble enlace - formación de ácido (6R)-6-metoxicarbonil-(4S,7R)-[4,7-etenileno]-espiro[2.4]heptano]-(5R)-5-carboxílico (WO2010/134014):

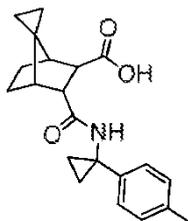
25 En un matraz de fondo redondo secado a la llama equipado con barra de agitación magnética y en atmósfera inerte (N_2), una suspensión de ácido (6R) -6-metoxicarbonil-(4S,7R)-[4,7-etenileno]-espiro [2,4] heptano]-(5R)-5-carboxílico (220 mg, 0,99 mmol), 10 % de Pd/C (44 mg) y ciclohexeno (0,20 ml, 1,98 mmol) en THF seco (2,5 ml) se agitó a reflujo durante 2 horas. La mezcla de reacción se filtró a través de celite y la torta del filtro se lavó con THF. El filtrado se concentró a presión reducida y el compuesto del título se obtuvo en forma de un sólido blanco. TLC: fr (hept/EA, 2:3) = 0,48.

Acoplamiento de amida con 1-(p-tolil)ciclopropanamina - formación de (5R)-N⁵-(1-(p-tolil)ciclopropil)-(6R)-6-metoxicarbonil-(4S,7R)-[4,7-etileno]-espiro[2.4]heptano]-5-carboxamida:

30 En un matraz de fondo redondo secado a la llama equipado con barra de agitación magnética y en atmósfera inerte (N_2), a una solución de ácido (6R)-6-metoxicarbonil-(4S,7R)-[4,7-etileno]-espiro[2.4]heptano]-(5R)-5-carboxílico (1565

mg, 6,98 mmol) en CH₂Cl₂ seco (24 ml) se añadieron unas gotas de DMF y cloruro de oxalilo (0,74 ml, 8,38 mmol). La mezcla de reacción se agitó a ta durante 30 minutos, se concentró a presión reducida y el residuo se secó a alto vacío. A una suspensión agitada de 1-(p-tolil)ciclopropilamina (1,028 mg, 6,98 mmol) en piridina (1,68 ml, 20,94 mmol) se añadió una solución del cloruro de acilo anterior en acetona seca (24 ml). La mezcla de reacción se agitó a ta durante 45 min, se diluyó con EA y se lavó sucesivamente con HCl 1N acuoso, NaHCO₃ acuoso saturado y salmuera. La capa orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo bruto se purificó por FC (hept/EA, 1:0 -> 3:1) y se obtuvo el compuesto del título como un sólido amarillo. CL-EM- Condiciones 07b: t_R = 0,93 min; [M+H]⁺ = 353,82.

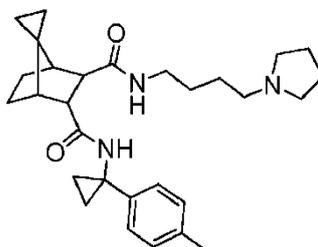
Saponificación - formación de (5R)-N⁵-(1-(p-tolil)ciclopropil)-(6R)-6-hidroxicarbonil-(4S,7R)-[4,7-etilen-espiro[2.4]heptano]-5-carboxamida



A una solución de (5R)-N⁵-(1-(p-tolil)ciclopropil)-(6R)-6-metoxicarbonil-(4S,7R)-[4,7-etilen-espiro[2.4]heptano]-5-carboxamida (1540 mg, 4,36 mmol) en THF (23 ml) se añadió NaOH 2N acuoso (12 ml, 24,00 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 0°C hasta la finalización de la reacción. Después, la mezcla se lavó con Et₂O, la capa acuosa se acidificó y se extrajo con EA (3 x). Los extractos orgánicas combinados se lavaron con salmuera, se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida, para dar el compuesto del título como un sólido amarillo claro. CL-EM- Condiciones 07b: t_R = 0,84 min; [M+H]⁺ = 340,46.

Preparación de ejemplo

Acoplamiento de amida con 4-(pirrolidin-1-il)butan-1-amina - formación de (5R)-N⁵-(1-(p-tolil)ciclopropil)-(6R)-N⁶-(4-(pirrolidino)butil)-(4S,7R)-[4,7-etilen-espiro[2.4]heptano]-5,6-dicarboxamida:



En un matraz de fondo redondo secado a la llama equipado con barra de agitación magnética y en atmósfera inerte (N₂), a (5R)-N⁵-(1-(p-tolil)ciclopropil)-(6R)-6-hidroxicarbonil-(4S,7R)-[4,7-etilen-espiro[2.4]heptano]-5-carboxamida (52 mg, 0,15 mmol) en CH₂Cl₂ (3 ml) se añadieron sucesivamente 4-(pirrolidin-1-il)butan-1-amina (45 mg, 0,31 mmol), EDC.HCl (60 mg, 0,31 mmol), HOBt (29 mg, 0,18 mmol) y DIPEA (0,13 ml, 0,77 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 0°C hasta la finalización de la reacción. Después se añadió agua, se separaron las capas y la capa orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo bruto se purificó mediante HPLC preparativa para obtener el compuesto del título como un sólido amarillo. TLC: fr (CH₂Cl₂/MeOH/NH₄OH, 95:5:0,5) = 0,37. Condiciones de CL-EM 07b: t_R = 0,72 min; [M+H]⁺ = 464,65.

II. Ensayos biológicos

Ensayo *in vitro*

La actividad agonista del receptor de ALX de los compuestos de fórmula (I) se determinó de acuerdo con el siguiente procedimiento experimental.

Procedimiento experimental:

Determinaciones del calcio intracelular:

Células que expresaban el receptor de ALX recombinante humano y de la proteína G Gα16 (HEK293-hALXR-Gα16) se cultivaron hasta un 80 % de confluencia en medio de crecimiento (MC). Las células se separaron de las placas de cultivo con un tampón de disociación celular (Invitrogen, 13151-014), y se recogieron mediante centrifugación a 1.000 rpm a ta durante 5 min en tampón de ensayo (TE) (partes iguales de BSS de Hank (Gibco, 14065-049) y DMEM sin rojo fenol (Gibco, 11880-028)). Tras 60 min de incubación a 37 °C en CO₂ al 5 % en AB suplementado

con 1 μM de Fluo-4 (AM) (Invitrogen, F14202) y HEPES 20 mM (Gibco, 15630-056), las células se lavaron y se volvieron a suspender en AB. A continuación, se sembraron en placas de ensayo FLIPR de 384 pocillos (Greiner, 781091) a 50.000 células en 70 μl por pocillo y sedimentaron por centrifugación a 1.000 rpm durante 1 min. Se prepararon las soluciones madre de los compuestos de ensayo hasta una concentración de 10 mM en DMSO y se diluyeron en serie en AB hasta las concentraciones necesarias para activar las curvas dosis-respuesta. Se utilizó WKYVMm (Phoenix Peptides) como agonista de referencia. Se hizo funcionar un equipo FLIPR Tetra (Molecular Devices) de acuerdo con las instrucciones convencionales del fabricante, añadiendo 4 μl de compuesto de ensayo disuelto a 10 mM en DMSO y diluido antes del experimento en tampón de ensayo para obtener la concentración final deseada. Se hizo un seguimiento del cambio en los valores de la fluorescencia antes y después de la adición de los compuestos de ensayo a $\lambda_{\text{ex}}=488$ nm y $\lambda_{\text{em}}=540$ nm. Los valores de los máximos de emisión por encima del nivel basal se exportaron tras restar la línea basal. Los valores se normalizaron al compuesto control de alto nivel (WKYMV), concentración final 10 nM) tras restar el valor de la línea basal (adición de AB).

Las actividades agonísticas con respecto al receptor de ALX (valores de la CE_{50}) de los compuestos ilustrativos y los compuestos de referencia se presentan en la Tabla 1.

15

Tabla 1

Compuesto	CE_{50} [nM]
<i>Ejemplo 1:</i> (5R)- N^5 -(1-(<i>p</i> -tolil)ciclopropil)-(6R)- N^6 -(4-(pirrolidino)butil)-(4S,7R)-[4,7-etilen-espiro[2.4]heptano]-5,6-dicarboxamida	4,0
<i>Ejemplo de referencia:</i> Ejemplo 123 del documento WO2010/134014 (5R*)- N^5 -[(4-Metil-fenil)-metil]-(6R*)- N^6 -(4-pirrolidin-1-il-butyl)-(4S*,7R*)-[4,7-etenilen-espiro[2.4]heptano]-5,6-dicarboxamida	46

Ensayo de adición de GSH

A una solución de sustrato (0,05 mmol) en 0,5 ml de CH_3CN se añadió una solución de GSH (10,0-20,0 equiv.) en 0,5 ml de tampón fosfato (0,1 M, pH 7,4). La solución turbia resultante se agitó a 40 °C durante 2 h y se analizó mediante CL-EM.

20

Ensayo de atrapamiento de dansilo-glutatión

Incubación *in vitro*

Los compuestos de ensayo generalmente se preincubaron a 10 μM en tampón de fosfato potásico 0,1 M (pH 7,4) con 1 mg/ml de microsomas de hígado de humanos y dansilo-GSH 1 mM durante 5 min a 37 °C en tubos protegidos de la luz. La reacción se inicia mediante la adición de un sistema de regeneración de NADPH. Después de 60 minutos, la reacción se detiene mediante la adición de dos volúmenes de metanol enfriado con hielo con ditioneitol 5 mM (DTT). Después de la centrifugación, los sobrenadantes se analizaron adicionalmente por HPLC con detección de fluorescencia. Los experimentos de control se realizan en presencia de GSH en lugar de dansilo-GSH con el fin de identificar a los padres y/o metabolitos fluorescentes como interferencia. Otro control se lleva a cabo en ausencia de fármaco parental para determinar las señales de fondo debidas a la degradación/impurezas del dansilo-glutatión.

30

Analítica/cuantificación

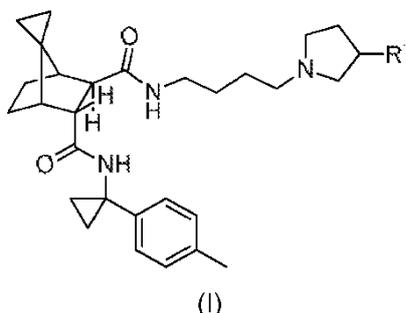
Los sobrenadantes de las muestras incubadas se introducen en un sistema Shimadzu de HPLC con detector de fluorescencia (λ_{ex} 340, λ_{em} 525 nm) capaz funcionar con presión más alta (60 MPa). La separación se realiza usando una columna de 4,6 x 100 mm RP Kinetics (Phenomenex, 2,6 μm) a 1,5 ml/min. Se utiliza un gradiente completo con agua y acetonitrilo, ambos acidificados con ácido fórmico al 0,1 %. Un volumen de 2 ml de acetonitrilo se añade después de la columna para reducir la fluorescencia dependiente de disolvente. Los compuestos atrapados en dansilo-GSH se identifican mediante comparación visual de los cromatogramas de las muestras de incubaciones y control. La cantidad de material atrapado se cuantifica mediante una calibración externa con concentraciones conocidas de dansilo-GSH y se expresó en nmol/l*h o pmol/ml*h.

35

40

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I)



en la que

- 5 R^1 representa hidrógeno o flúor;
o una sal de dicho compuesto.
2. Un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con la reivindicación 1, en el que
 R^1 representa hidrógeno;
o una sal de dicho compuesto.
- 10 3. Un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con la reivindicación 1, en el que
 R^1 representa flúor;
o una sal de dicho compuesto.
4. Un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el compuesto es:
15 (5R)- N^5 -(1-(*p*-tolil)ciclopropil)-(6R)- N^6 -(4-(pirrolidino)butil)-(4S,7R)-[4,7-etilen-espiro[2.4]heptano]-5,6-
dicarboxamida;
o una sal de dicho compuesto.
5. Un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o una sal
farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso como medicamento.
- 20 6. Una composición farmacéutica que contiene, como principio activo, un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con
una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y al menos un
excipiente terapéuticamente inerte.
- 25 7. Uso de un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o de una sal
farmacéuticamente aceptable del mismo, en la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de
una enfermedad seleccionada entre enfermedades inflamatorias, enfermedades obstructivas de las vías
respiratorias, afecciones alérgicas, infecciones por retrovirus mediadas por el VIH, trastornos cardiovasculares,
neuroinflamación, trastornos neurológicos, dolor, enfermedades mediadas por priones y trastornos mediados por
amiloide; y para la modulación de las respuestas inmunitarias.
- 30 8. Un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o de una sal
farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad
seleccionada entre enfermedades inflamatorias, enfermedades obstructivas de las vías respiratorias, afecciones
alérgicas, infecciones por retrovirus mediadas por el VIH, trastornos cardiovasculares, neuroinflamación, trastornos
neurológicos, dolor, enfermedades mediadas por priones y trastornos mediados por amiloide; y para la modulación
de las respuestas inmunitarias.