(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 632 975**

(51) Int. Cl.:

A61K 31/445 (2006.01)
C07D 211/06 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.06.2011 PCT/US2011/041910**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **29.12.2011 WO11163640**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.06.2011 E 11799027 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.05.2017 EP 2585064**

(54) Título: **Antagonistas de C5aR**

(30) Prioridad:

25.03.2011 US 201113072616
24.06.2010 US 823039

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.09.2017

(73) Titular/es:

CHEMOCENTRYX, INC. (100.0%)
850 Maude Avenue
Mountain View, California 94043, US

(72) Inventor/es:

FAN, PINGCHEN;
GREENMAN, KEVIN LLOYD;
LELETI, MANMOHAN REDDY;
LI, YANDONG;
POWERS, JAY;
TANAKA, HIROKO;
YANG, JU y
ZENG, YIBIN

(74) Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 632 975 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

Antagonistas de C5aR

Antecedentes de la invención

El sistema del complemento de sempeña un papel central en la depuración de los inmunocomplejos y en las respuestas inmunitarias a agentes infecciosos, antígenos extraños, células infectadas por virus y células tumorales. La activación inapropiada o excesiva del sistema del complemento puede producir consecuencias perjudiciales, e incluso potencialmente mortales debido a la severa inflamación y consiguiente destrucción tisular. Estas consecuencias se manifiestan clínicamente en diversos trastornos que incluyen choque séptico; miocardiopatía, así como lesión por isquemia/reperfusión intestinal; rechazo de l injerto; insuficiencia orgánica; nefritis; inflamación patológica; y enfermedades autoinmunitarias.

El sistema del complemento se compone de un grupo de proteínas que normalmente están presentes en el suero en un estado inactivo. La activación del sistema del complemento abarca principalmente tres vías distintas, es decir, la clásica, la alternativa, y la vía de las lectinas (V. M. Holers, en *Clinical Immunology: Principles and Practice*, ed. R. R. Rich, Mosby Press; 1996, 363-391). 1) La vía clásica es una cascada dependiente de calcio/magnesio, activada normalmente por la formación de complejos antígeno-anticuerpo. Se puede activar igualmente de manera independiente del anticuerpo por medio de la unión de la proteína C reactiva, complejada con un ligando, y por numerosos patógenos incluyendo bacterias gram negativas. 2) La vía alternativa es una cascada dependiente de magnesio activada por la deposición y activación de C3 en determinadas superficies susceptibles (p. ej., polisacáridos de la pared celular de levaduras y bacterias, y determinados materiales biopolímeros). 3) La vía de las lectinas implica la unión inicial de lectina unida a manosa y la posterior activación de C2 y C4, que son comunes en la vía clásica (Matsushita, M. *et al*., *J. Exp. Med*. 176: 1497-1502 (1992); Suankratay, C. *et al*., *J. Immunol*, 160: 3006-3013 (1998)).

La activación de la vía del complemento genera fragmentos biológicamente activos de proteínas del complemento, p. ej., anafilatoxinas C3a, C4a y C5a y complejos atacantes de membrana (CAM) C5b-9, los cuales median las respuestas inflamatorias que afectan al quimiotaxis leucocitaria; activan macrófagos, neutrófilos, plaquetas, mastocitos y células endoteliales; y aumentan la permeabilidad vascular, la citolisis y la lesión tisular.

El complemento C5a es uno de los mediadores proinflamatorios más potentes del sistema del complemento. (El péptido C5a anafiláctico es 100 veces más potente, sobre una base molar, en la obtención de respuestas inflamatorias que C3a). C5a es la forma activada de C5 (190 kD, peso molecular). C5a está presente en el suero humano en aproximadamente 80 µg/ml (Kohler, P. F. *et al*., *J. Immunol*. 99: 1211-1216 (1967)). Se compone de dos cadenas polipéptidas, α y β, con pesos moleculares aproximados de 115 kD y 75 kD; respectivamente (Tack, B. F. *et al*., *Biochemistry* 18: 1490-1497 (1979)). Biosintetizado como una promolécula de cadena sencilla, C5 se escinde enzimáticamente en una estructura de dos cadenas durante el procesamiento y la secreción. Tras la escisión, las dos cadenas se mantienen unidas mediante al menos un enlace disulfuro así como interacciones no covalentes (Ooi, Y. M. *et al*., *J. Immunol*. 124: 2494-2498 (1980)).

C5 se escinde en los fragmentos C5a y C5b durante la activación de las vías del complemento. Las enzimas convertasas responsables de la activación de C5 son complejos de múltiples subunidades de C4b, C2a y C3b para la vía clásica y de $(C3b)_2$, Bb, y P para la vía alternativa (Goldlust, M. B. *et al*., *J. Immunol*. 113: 998-1007 (1974); Schreiber, R. D. *et al*, *Proc. Natl. Acad. Sci*. 75: 3948-3952 (1978)). C5 se activa por escisión en la posición 74-75 (Arg-Leu) en la cadena α. Tras la activación, se libera el péptido C5a de 74 de aminoácidos de 11,2 kD de la parte amino terminal de la cadena α. Tanto C5a como C3a son potentes estimuladores de neutrófilos y monocitos (Schindler, R. *et al*., *Blood* 76: 1631-1638 (1990); Haeffner-Cavaillon, N. *et al*., *J. Immunol*. 138: 794-700 (1987); Cavaillon, J. M. *et al*., *Eur. J. Immunol*. 20: 253-257 (1990)).

Además de sus propiedades anafilatóxicas, C5a induce la migración quimiotáctica de neutrófilos (Ward, P. A. *et al*., *J. Immunol*. 102: 93-99 (1969)), eosinófilos (Kay, A. B. *et al*., *Immunol*. 24: 969-976 (1973)), basófilos (Lett-Brown, M. A. *et al*., *J. Immunol*. 117: 246-252, 1976)), y monocitos (Snyderman, R. *et al*., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*. 138: 387-390, 1971)). Tanto C5a como C5b-9 activan las células endoteliales para expresar las moléculas de adhesión esenciales para secuestro de los leucocitos activados, que median la inflamación tisular y las lesiones (Foreman, K. E. *et al*., *J. Clin. Invest*. 94: 1147-1155 (1994); Foreman, K. E. *et al*., *Inflammation* 20: 1-9. (1996); Rollins, S. A. *et al*., *Transplantation* 69: 1959-1967 (2000)). C5a también media reacciones inflamatorias al provocar la contracción del músculo liso, elevar la permeabilidad vascular, inducir la desgranulación de basófilos y mastocitos e inducir la liberación de proteasas lisosomales y radicales libres oxidantes (Gerard, C. *et al*., *Ann. Rev. Immunol*. 12: 775-808 (1994)). Es más, C5a modula la expresión génica de fase aguda hepática y aumenta la respuesta inmunitaria global al aumentar la producción de FNT-a, IL-1-β, IL-6, IL-8, prostaglandinas y leucotrienos (Lambris, J. D. *et al*., en *The Human Complement System in Health and Disease*, Volanakis, J. E. ed., Marcel Dekker, Nueva York, págs. 83-118).

Se cree que los efectos anafilácticos y quimiotácticos de C5a se median a través de su interacción con el receptor C5a. El receptor C5a humano (C5aR) es una membrana de 52 kD unida al receptor acoplado a la proteína G, y se expresa en neutrófilos, monocitos, basófilos, eosinófilos, hepatocitos, células del músculo liso pulmonar y endoteliales, y tejidos

glomerulares renales (Van-Epps, D. E. *et al*., *J. Immunol*. 132: 2862-2867 (1984); Haviland, D. L. *et al*., *J. Immunol*. 154: 1861-1869 (1995); Wetsel, R. A., *Immunol. Leff*. 44: 183-187 (1995); Buchner, R. R. *et al*., *J. Immunol*. 155: 308-315 (1995); Chenoweth, D. E. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci*. 75: 3943-3947 (1978); Zwirner, J. *et al*., *Mol. Immunol*. 36: 877-884 (1999)). El sitio de unión al ligando de C5aR es complejo y consiste en al menos dos dominios de unión físicamente separables. Uno une el extremo amino terminal de C5a (aminoácidos 1-20) y el núcleo unido a disulfuro (aminoácidos 21-61), mientras que el segundo une el extremo carboxi-terminal de C5a (aminoácidos 62-74) (Wetsel, R. A., *Curr. Opin. Immunol*. 7: 48-53 (1995)).

C5a desempeña un papel importante en la inflamación y lesión tisular. En la derivación cardiopulmonar y hemodiálisis, C5a se forma como resultado de la activación de la vía alternativa del complemento cuando la sangre humana se pone en contacto con la superficie artificial de la máquina de circulación extracorpórea o del hemodializador (Howard, R. J. *et al*., *Arch. Surg*. 123: 1496-1501 (1988); Kirklin, J. K. *et al*., *J. Cardiovasc. Surg*. 86: 845-857 (1983); Craddock, P. R. *et al*., *N. Engl. J. Med*. 296: 769-774 (1977)). C5a provoca el aumento de la permeabilidad capilar y edema, broncoconstricción, vasoconstricción pulmonar, activación de leucocitos y plaquetas e infiltración en los tejidos, en particular el pulmón (Czermak, B. J. *et al*., *J. Leukoc. Biol*. 64: 40-48 (1998)). La administración de un anticuerpo monoclonal anti-C5a ha demostrado reducir la derivación cardiopulmonar y la disfunción endotelial coronaria inducida por cardioplejía (Tofukuji, M. *et al*., *J. Thorac. Cardiovasc. Surg*. 116: 1060-1068 (1998)).

C5a también se implica en el síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA), trastorno pulmonar obstructivo crónico (TPOC) e insuficiencia orgánica múltiple (IOM) (Hack, C. E. *et al*., *Am. J. Med*. 1989: 86: 20-26; Hammerschmidt DE *et al*. *Lancet* 1980; 1: 947-949; Heideman M. *et al*. *J. Trauma* 1984; 4: 1038-1043; Marc, MM, et *al*., *Am. J. Respir. Cell and Mol. Biol*., 2004: 31: 216-219). C5a aumenta la producción monocitaria de dos importantes citoquinas proinflamatorias, FNT-α y IL-1. Asimismo se ha demostrado que C5a desempeña un valioso papel en el desarrollo de la lesión tisular, y en particular la lesión pulmonar, en modelos animales de choque séptico (Smedegard G *et al*. *Am. J. Pathol*. 1989; 135: 489-497; Markus, S., *et al*., *FASEB Journal* (2001), 15: 568-570). En modelos de sepsis en los que se emplean ratas, cerdos y primates no humanos, los anticuerpos anti-C5a administrados a los animales antes del tratamiento con endotoxinas o *E. coli* produjeron una disminución de la lesión tisular, así como una disminución de la producción de IL-6 (Smedegard, G. *et al*., *Am. J. Pathol*. 135: 489-497 (1989); Hopken, U. *et al*., *Eur. J. Immunol*. 26: 1103-1109 (1996); Stevens, J. H. *et al*., *J Clin. Invest*. 77: 1812-1816 (1986)). Aún más importante, se ha demostrado que el bloqueo o C5a con anticuerpos policlonales anti-C5a mejora de manera significativa los índices de supervivencia en un modelo de ligamento/punción cecal de sepsis en ratas (Czermak, B. J. *et al*., *Nat. Med*. 5: 788-792 (1999)). Este modelo comparte muchos aspectos de la manifestación clínica de sepsis en seres humanos. (Parker, S. J. *et al*., *Br. J. Surg*. 88: 22-30 (2001)). En el mismo modelo de sepsis, se mostró que los anticuerpos anti-C5a inhiben la apoptosis de timocitos (Guo, R. F. *et al*., *J. Clin. Invest*. 106: 1271-1280 (2000)) y previenen la IOM (Huber-Lang, M. *et al*., *J. Immunol*. 166: 1193-1199 (2001)). Los anticuerpos anti-C5a eran también protectores en un modelo del factor de veneno de cobra de lesión pulmonar en ratas y en la lesión pulmonar inducida por inmunocomplejos (Mulligan, M. S. *et al*. *J. Clin. Invest*. 98: 503-512 (1996)). La importancia de C5a en la lesión pulmonar mediada por inmunocomplejos se confirmó posteriormente en ratones (Bozic, C. R. *et al*., *Science* 26: 1103-1109 (1996)).

Se descubre que C5a es un mediador principal en la lesión por isquemia-reperfusión miocárdica. La depleción del complemento redujo el tamaño del infarto de miocardio en ratones (Weisman, H. F. *et al*., *Science* 249: 146-151 (1990)), y el tratamiento con anticuerpos anti-C5a redujo la lesión en un modelo de rata de isquemia-reperfusión de las extremidades posteriores (Bless, N. M. *et al*., *Am. J. Physiol*. 276: L57-L63 (1999)). La lesión por reperfusión durante un infarto de miocardio se redujo también notablemente en cerdos que se volvieron a tratar con una IgG monoclonal anti-C5a (Amsterdam, E. A. *et al*., *Am. J. Physiol*. 268:H448-H457 (1995)). Un antagonista C5aR humano recombinante reduce el tamaño del infarto en un modelo porcino de revascularización quirúrgica (Riley, R. D. *et al*., *J. Thorac. Cardiovasc. Surg*. 120: 350-358 (2000)).

Los neutrófilos estimulados por C5a también contribuyen a numerosas enfermedades ampollosas (p. ej., penfigoide ampolloso, pénfigo vulgar y pénfigo foliáceo). Estos son trastornos inflamatorios crónicos y recurrentes caracterizados clínicamente por ampollas estériles que aparecen en el espacio subepidérmico de la piel y la mucosa. Aunque se cree que los autoanticuerpos contra los queratinocitos situados en las membranas basales cutáneas forman la base del desprendimiento de los queratinocitos basales epidérmicos de la membrana basal subyacente, las ampollas se caracterizan igualmente por la acumulación de neutrófilos tanto en las capas dérmicas superiores como en las cavidades de las ampollas. En modelos experimentales una reducción de neutrófilos o ausencia del complemento (total o selectiva en C5) puede inhibir la formación de ampollas subepidérmicas, incluso en presencia de altos títulos de autoanticuerpo.

Los niveles del complemento son elevados en pacientes con artritis reumatoide (Jose, P. J. *et al*., *Ann. Rheum. Dis*. 49: 747-752 (1990); Grant, E. P., *et al*., *J. of Exp. Med*., 196(11): 1461-1471, (2002)), nefritis lúpica (Bao, L., *et al*., *Eur. J. of Immunol*., 35(8), 2496-2506, (2005)) y lupus eritematoso sistémico (LES) (Porcel, J. M. *et al*., *Clin. Immunol. Immunopathol*. 74: 283-288 (1995)). Los niveles de C5a se relacionan con la gravedad del estado de la enfermedad. La artritis inducida por colágeno en ratones y ratas se asemeja a la enfermedad de artritis reumatoide en humanos. Los ratones deficientes del receptor C5a demostraron una protección completa de la artritis inducida por inyección de Acs monoclonales anti-colágeno (Banda, N. K., *et al*., *J. of Immunol*., 2003, 171: 2109-2115). Por lo tanto, la inhibición de C5a y/o receptor C5a (C5aR) podría resultar útil en el tratamiento de estas enfermedades crónicas.

Se considera que el sistema del complemento se activa en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (EII) y se cree que desempeña un papel en la patogénesis de la enfermedad. Los productos del complemento activado se encontraron en la cara luminal de las células epiteliales de la superficie, así como en la mucosa muscular y en los vasos sanguíneos de la submucosa en pacientes con EII (Woodruff, T. M., *et al.*, *J of Immunol*, 2003, 171: 5514-5520).

La expresión de C5aR se aumenta en astrocitos reactivos, microglia y células endoteliales en un sistema nervioso central humano inflamado (Gasque, P. *et al.*, *Am. J. Pathol.* 150: 31-41 (1997)). C5a podría estar implicado en enfermedades neurodegenerativas, tales como enfermedad de Alzheimer (Mukherjee, P. *et al.*, *J. Neuroimmunol.* 105: 124-130 (2000); O'Barr, S. *et al.*, *J. Neuroimmunol.* (2000) 105: 87-94; Farkas, I., *et al.* *J. Immunol.* (2003) 170:5764-5771), enfermedad de Parkinson, enfermedad de Pick y encefalopatías espongiformes transmisibles. La activación de C5aR neuronal puede inducir apoptosis (Farkas I *et al.* *J. Physiol.* 1998; 507: 679-687). Por lo tanto, la inhibición de C5a y/o C5aR también podría resultar útil en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

Hay indicios de que la producción de C5a empeora la inflamación asociada con la dermatitis atópica (Neuber, K., *et al.*, *Immunology* 73:83-87, (1991)), y urticaria crónica (Kaplan, A. P., *J. Allergy Clin. Immunol.* 114; 465-474, (2004).

Actualmente la psoriasis se conoce por ser una enfermedad mediada por linfocitos T (Gottlieb, E. L. *et al.*, *Nat. Med.* 1: 442-447 (1995)). No obstante, los neutrófilos y mastocitos también pueden estar involucrados en la patogénesis de la enfermedad (Terui, T. *et al.*, *Exp. Dermatol.* 9: 1-10; 2000); Werfel, T. *et al.*, *Arch. Dermatol. Res.* 289: 83-86 (1997)). La acumulación de neutrófilos en el estrato córneo se observa en zonas muy inflamadas de las placas psoriásicas, y los extractos (escama) de lesión psoriásica contienen niveles muy elevados de C5a y exhiben una potente actividad quimiotáctica hacia los neutrófilos, un efecto que puede inhibirse por la adición de un anticuerpo C5a. Los linfocitos T y los neutrófilos se quimioatraen por C5a (Nataf, S. *et al.*, *J. Immunol.* 162: 4018-4023 (1999); Tsuji, R. F. *et al.*, *J. Immunol.* 165: 1588-1598 (2000); Cavaillon, J. M. *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 20: 253-257 (1990)). Adicionalmente se ha demostrado la expresión de C5aR en células dendríticas plasmacitoides (CDp) aisladas de lesiones de lupus eritematoso cutáneo y estas células se mostraron para exhibir el comportamiento quimiotáctico hacia C5a, lo que sugiere que el bloqueo de C5aR en CDp podría ser eficaz en la reducción de la infiltración de CDp en la piel inflamada tanto en LES y psoriasis. Por lo tanto, C5a podría ser una importante diana terapéutica para el tratamiento de la psoriasis.

Los inmunocomplejos (IC) que contienen inmunoglobulina G contribuyen a la patofisiología de una serie de enfermedades autoinmunitarias, tales como lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, enfermedad de Sjögren, síndrome de Goodpasture, y neumonitis por hipersensibilidad (Madaio, M. P., *Semin. Nephrol.* 19: 48-56 (1999); Korganow, A. S. *et al.*, *Immunity* 10: 451-459 (1999); Bolten, W. K., *Kidney Int.* 50: 1754-1760 (1996); Ando, M. *et al.*, *Curr Opin. Pulm. Med.* 3: 391-399 (1997)). Estas enfermedades son muy heterogéneas y afectan generalmente a uno o más de los siguientes órganos: piel, vasos sanguíneos, articulaciones, riñones, corazón, pulmones, sistema nervioso e hígado (incluyendo cirrosis y fibrosis hepática). El modelo animal clásico para la respuesta inflamatoria en estas enfermedades por IC es la reacción de Arthus, que se caracteriza por la infiltración de células polimorfonucleares, hemorragia y exudación plasmática (Arthus, M., C. R. *Soc. Biol.* 55: 817-824 (1903)). Estudios recientes muestran que los ratones deficientes de C5aR se protegen de la lesión tisular inducida por IC (Kohl, J. *et al.*, *Mol. Immunol.* 36: 893-903 (1999); Baumann, U. *et al.*, *J. Immunol.* 164: 1065-1070 (2000)). Los resultados son consistentes con la observación de que un antagonista anti-C5aR peptídico pequeño inhibe la respuesta inflamatoria causada por la deposición de IC (Strachan, A. J. *et al.*, *J. Immunol.* 164: 6560-6565 (2000)). Junto con su receptor, C5a desempeña un papel primordial en la patogénesis de enfermedades por IC. Los inhibidores de C5a y C5aR podrían resultar útiles para el tratamiento de estas enfermedades.

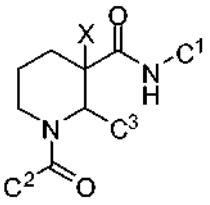
Descripción de la técnica relacionada

Recientemente se han descrito en la literatura antagonistas no peptídicos basados en el receptor C5a (p. ej., Sumichika, H., *et al.*, *J. Biol. Chem.* (2002), 277, 49403-49407). El antagonista no peptídico basado en el receptor C5a se ha descrito por ser eficaz en el tratamiento del choque endotóxico en ratas (Stracham, A. J., *et al.*, *J. of Immunol.* (2000), 164(12): 6560-6565); y en el tratamiento de EII en un modelo de rata (Woodruff, T. M., *et al.*, *J of Immunol*, 2003, 171: 5514-5520). Los moduladores no peptídicos basados en el receptor C5a también se han descrito en la literatura de patentes por Neurogen Corporation, (p. ej., documentos WO2004/043925, WO2004/018460, WO2005/007087, WO03/082826, WO03/08828, WO02/49993, WO03/084524); Dompe S.P.A. (documento WO02/029187); y la Universidad de Queenland (documento WO2004/100975). El documento WO 2010/075257, publicado el 1 de julio de 2010 describe piridinas sustituidas que son moduladores del receptor de C5a. El documento WO 2007/051062 proporciona dihidropiridinas que son moduladores del receptor de C5a.

Hay una evidencia experimental considerable en la literatura que implica un aumento de los niveles de C5a con una serie de enfermedades y trastornos, en particular en las enfermedades y trastornos autoinmunitarios e inflamatorios. Por consiguiente, persiste una necesidad en la materia de nuevos moduladores de molécula orgánica pequeña, p. ej., agonistas, preferentemente antagonistas, agonistas parciales, del receptor C5a (C5aR) que resultan útiles en la inhibición de acontecimientos patogénicos, p. ej., quimiotaxis asociada con un aumento de los niveles de la actividad de anafilatoxina. La presente invención satisface esta y otras necesidades.

Breve sumario de la invención

Se describen compuestos que tienen la fórmula:



(I);

y sales, hidratos y rotómeros de los mismos farmacéuticamente aceptables; donde

C^1 se selecciona entre el grupo que consiste en arilo y heteroarilo, donde el grupo heteroarilo tiene entre 1-3 heteroátomos como miembros del anillo seleccionados entre N, O y S; y donde dichos grupos arilo y heteroarilo están opcionalmente sustituidos con 1 a 3 sustituyentes R^1;
C^2 se selecciona entre el grupo que consiste en arilo y heteroarilo, donde el grupo heteroarilo tiene entre 1-3 heteroátomos como miembros del anillo seleccionados entre N, O y S; y donde dichos grupos arilo y heteroarilo están opcionalmente sustituidos con 1 a 3 sustituyentes R^2;
C^3 se selecciona entre el grupo que consiste en alquilo o heteroalquilo C_{1-8}, cicloalquilo C_{3-8}, cicloalquil C_{3-8}-alquilo C_{1-4}, arilo, aril-alquilo C_{1-4}, heteroarilo, heteroaril-alquilo C_{1-4}, heterocicloalquilo o heterocicloalquil-alquilo C_{1-4}, donde el grupo o porción heterocicloalquilo tiene entre 1-3 heteroátomos seleccionados entre N, O y S, y donde el grupo heteroarilo tiene entre 1-3 heteroátomos como miembros del anillo seleccionados entre N, O y S, y cada C^3 está opcionalmente sustituido con entre 1-3 sustituyentes R^3;
cada R^1 se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en halógeno, -CN, $-R^c$, $-CO_2R^a$ $-CONR^aR^b$, $-C(O)R^a$, $-OC(O)NR^aR^b$, $-NR^bC(O)R^a$, $-NRbC(O)_2R^c$, $-NR^a-C(O)NR^aR^b$, $-NR^aC(O)NR^aR^b$, $-NR^aR^b$, $-OR^a$ y $-S(O)_2NR^aR^b$; donde cada R^a y R^b se selecciona independientemente entre hidrógeno, alquilo C_{1-8}, y haloalquilo C_{1-8}, o cuando unido al mismo átomo de nitrógeno puede combinarse con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de cinco o seis miembros que tiene de 0 a 2 heteroátomos adicionales como miembros del anillo seleccionados entre N, O o S y se sustituye opcionalmente con uno o dos oxo; cada R^c se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en alquilo o heteroalquilo C_{1-8}, haloalquilo C_{1-8}, cicloalquilo C_{3-6}, heterocicloalquilo, arilo y heteroarilo, y donde las porciones alifáticas y cíclicas de R^a, R^b y R^c están además opcionalmente sustituidas con de uno a tres grupos halógeno, hidroxi, metilo, amino, alquilamino y dialquilamino; y opcionalmente cuando dos sustituyentes R^1 están en átomos adyacentes, se combinan para formar un anillo carbocíclico o heterocíclico de cinco o seis miembros condensado;
cada R^2 se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en halógeno, -CN, $-NO_2$, $-R^f$, $-CO_2R^d$, $-CONR^dR^e$, $-C(O)R^d$, $-OC(O)NR^dR^e$, $-NR^eC(O)R^d$, $-NR^eC(O)_2R^f$, $-NR^dC(O)NR^dR^e$, $-NR^dC(O)NR^dR^e$, $-NR^dR^e$, $-OR^d$ y $-S(O)_2NR^dR^e$; donde cada R^d y R^e se selecciona independientemente entre hidrógeno, alquilo C_{1-8}, y haloalquilo C_{1-8}, o cuando unido al mismo átomo de nitrógeno puede combinarse con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de cinco o seis miembros que tiene de 0 a 2 heteroátomos adicionales como miembros del anillo seleccionados entre N, O o S y se sustituye opcionalmente con uno o dos oxo; cada R^f se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en alquilo C_{1-8}, haloalquilo C_{1-8}, cicloalquilo C_{3-6}, heterocicloalquilo, arilo y heteroarilo, y donde las porciones alifáticas y cíclicas de R^d, R^e y R^f están además opcionalmente sustituidas con de uno a tres grupos halógeno, hidroxi, metilo, amino, alquilamino y dialquilamino, y opcionalmente cuando dos grupos R^2 están en átomos adyacentes, se combinan para formar un anillo de cinco o seis miembros;
cada R^3 se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en halógeno, -CN, $-R^1$, $-CO_2R^g$, $-CONR^gR^h$, $-C(O)R^g$, $-C(O)R^i$, $-OC(O)NR^gR^h$, $-NR^hC(O)R^g$, $-NR^hCO_2R^i{}_{023}$, $-NR^gC(O)NR^gR^h$, $-NR^gR^h$, $-OR^g$, $-OR^j$, $-S(O)_2NR^gR^h$, $-X^4-R^i$, $-NH-X^4-R^j$, $-O-X^4-R^j$, $-X^4-NR^gR^h$, $-X^4-NHR^j$, $-X^4-CONR^gR^h$, $-X^4-NR^hC(O)R^g$, $-X^4-CO_2R^g$, $-O-X^4-CO_2R^g$, $-NH-X^4-CO_2R^g$, $-X^4-NR^hCO_2R^i$, $-O-X^4-NR^hCO_2R^i$, $-NHR^j$ y $-NHCH_2R^j$, donde X^4 es un alquileno C_{1-4}; cada R^g y R^h se selecciona independientemente entre hidrógeno, alquilo o heteroalquilo C_{1-8}, cicloalquilo C_{3-6} y haloalquilo C_{1-8}, o cuando unido al mismo átomo de nitrógeno puede combinarse con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de cuatro, cinco o seis miembros que tiene de 0 a 2 heteroátomos adicionales como miembros del anillo seleccionados entre N, O o S y está opcionalmente sustituido con uno o dos oxo; cada R^1 se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en alquilo o heteroalquilo C_{1-8}, haloalquilo C_{1-8}, cicloalquilo C_{3-6}, heterocicloalquilo, arilo y heteroarilo; y cada R^j se selecciona entre el grupo que consiste en cicloalquilo C_{3-6}, imidazolilo, pirimidinilo, pirrolinilo, piperidinilo, morfolinilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidropiranilo y S,S-dioxo-tetrahidrotiopiranilo, y donde las porciones alifáticas y cíclicas de R^g, R^h, R^1 y R^j están además opcionalmente sustituidas con de uno a tres grupos halógeno, metilo, CF_3, hidroxi, alcoxi C_{1-4}, alcoxi-alquilo C_{1-4}, -C(O)Oalquilo C_{1-8}, amino, alquilamino y dialquilamino; y opcionalmente cuando dos grupos R^3 están en átomos adyacentes, se combinan para formar un anillo de cinco o seis miembros, y
X es hidrógeno o CH_3. La presente invención proporciona los compuestos como se definen en las reivindicaciones.

Además de los compuestos proporcionados en el presente documento, la presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que contienen uno o más de estos compuestos, así como los compuestos para uso en unos métodos terapéuticos, principalmente para tratar una enfermedad asociada con la actividad de señalización C5a.

Se de scriben m étodos d e d iagnóstico d e l a e nfermedad en u n i ndividuo. E n e stos métodos, l os compuestos proporcionados en el presente documento se administran en forma marcada a un sujeto, seguido de formación de imágenes de diagnóstico para determinar la presencia o ausencia de C5aR. En un aspecto relacionado, un método de diagnóstico de la enfermedad se lleva a cabo poniendo en contacto una muestra de tejido o de sangre con un compuesto marcado como proporcionada en este documento y determinar la presencia, ausencia o cantidad de C5aR en la muestra.

Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1** proporciona estructuras y la actividad para los compuestos representativos de la presente invención. Los compuestos pr epararon usando métodos como los de scritos g eneralmente a continuación, as í c omo métodos proporcionados en los Ejemplos.

Descripción detallada de la invención

I. Abreviaturas y definiciones

El término "alquilo", por sí mismo o como parte de otro sustituyente, significa, a menos que se indique otra cosa, un radical de hidrocarburo de cadena lineal o ramificada, que tiene el número de átomos de carbono designados (es decir C_{1-8} significa de uno a ocho carbonos). Los ejemplos de grupos alquilo incluyen por ejemplo metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, t-butilo, isobutilo, sec-butilo, n-pentilo, n- hexilo, n-heptilo y n-octilo. El t érmino "a lquilo" e n s u sentido más amplio también pretende incluir aquellos grupos insaturados, tales como los grupos alquenilo y alquinilo. El término "alquenilo" se refiere a un grupo alquilo insaturado que tiene uno o más dobles enlaces. De forma análoga, el término "alquinilo" se refiere a un grupo alquilo insaturado que tiene uno o más triples enlaces. Los ejemplos de tales grupos alquilo i nsaturados incluyen vinilo, 2-propenilo, crotilo, 2-isopentenilo, 2-(butadienilo), 2,4-pentadienilo, 3-(1,4-pentadienilo), etinilo, 1- y 3-propinilo, 3-butinilo y los isómeros y homólogos superiores. El término "cicloalquilo" se refiere a anillos de hidrocarburo que tiene el número indicado de átomos en el anillo (por ejemplo, cicloalquilo C_{3-6}) y que es tá t otalmente s aturado o que n o t iene más de un doble en lace entre los v értices d el a nillo. "Cicloalquilo" también intenta referirse a anillos de hidrocarburo bicíclicos o policíclicos tales como, por ejemplo, biciclo[2.2.1]heptano o biciclo[2.2.2]octano. El t érmino "heterocicloalquilo" se r efiere a un gr upo c icloalquilo que contiene de uno a cinco heteroátomos seleccionados entre N, O, y S, donde los átomos de ni trógeno y azufre se oxidan opcionalmente, y el átomo o átomos de nitrógeno se cuaternizan opcionalmente. El heterocicloalquilo puede ser un sistema de anillo monocíclico, bicíclico o policíclico. Ejemplos no limitantes de grupos heterocicloalquilo incluyen por ejemplo, pirrolidina, imidazolidina, pirazolidina, butirolactama, valerolactama, imidazolidinona, hidantoina, dioxolano, ftalimida, piperidina, 1 ,4-dioxano, morfolina, tiomorfolina, tiomorfolina-S-óxido, tiomorfolina-S,S-óxido, piperazina, pirano, piridona, 3-pirrolina, tiopirano, pirona, tetrahidrofurano, t etrhidrotiofeno y qui nuclidina. Un gr upo heterocicloalquilo puede unirse al resto de la molécula a través de un carbono del anillo o un heteroátomo.

El término "alquileno" por sí mismo o como parte de otro sustituyente significa un radical divalente obtenido a partir de un alcano, como se ejemplifica por $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$. Típicamente, un grupo alquilo (o alquileno) tendrá de 1 a 24 átomos de carbono, con en la presente invención se preferirán los grupos que tienen 10 o menos átomos de carbono. Un "alquilo i nferior" o " alquileno inferior" es un gr upo alquilo o alquileno de c adena corta, que g eneralmente tiene cuatro o menos átomos de carbono. De forma análoga, "alquenileno" y "alquinileno" se refirieren a l as f ormas insaturadas de "alquileno" que tiene dobles o triples enlaces, respectivamente.

El término "heteroalquilo", por sí mismo o junto con otro término, significa, a menos que se indique otra cosa, una cadena estable lineal o ramificada o un radical de hidrocarburo cíclico o combinaciones de los mismos, que consiste en el número indicado de átomos de carbono y de uno a tres heteroátomos seleccionados entre el grupo que consiste en O, N, Si y S, y donde los átomos de nitrógeno y azufre pueden opcionalmente oxidarse y el heteroátomo de nitrógeno puede opcionalmente cuaternizarse. El heteroátomo o heteroátomos de O, N y S pueden c olocarse en cualquier posición i nterior de l gr upo he teroalquilo. El het eroátomo d e Si puede colocarse en c ualquier pos ición de l gr upo heteroalquilo, que incluye la posición en la que el grupo alquilo se une al resto de la molécula. Los ejemplos incluyen $-CH_2-CH_2-O-CH_3$, $-CH_2-CH_2-NH-CH_3$, $-CH_2-CH_2-N(CH_3)-CH_3$, $-CH_2-S-CH_2-CH_3$, $-CH_2-CH_2,-S(O)-CH_3$, $-CH_2-CH_2-S(O)_2-CH_3$, $-CH=CH-O-CH_3$, $-Si(CH_3)_3$, $-CH_2-CH=N-OCH_3$ y $-CH=CH-N(CH_3)-CH_3$. Pueden e star d e forma consecutiva hasta dos heteroátomos, tales como, por ejemplo, $-CH_2-NH-OCH_3$ y $-CH_2-O-Si(CH_3)_3$. De forma análoga, los términos "heteroalquenilo" y "heteroalquinilo" por sí mismo o junto con otro término, significa, a menos que se indique otra cosa, un grupo alquenilo o un grupo alquinilo, respectivamente, que contiene el número indicado de carbonos y que tiene de uno a tres heteroátomos seleccionados entre el grupo que consiste en O, N, Si y S, y donde los átomos de nitrógeno y azufre pueden opcionalmente oxidarse y el heteroátomo de nitrógeno puede opcionalmente cuaternizarse. El heteroátomo o heteroátomos de O, N y S pueden colocarse en cualquier posición interior del grupo heteroalquilo.

El término "heteroalquileno" por sí mismo o como parte de otro sustituyente significa un radical divalente, saturado o insaturado o poliinsaturado, obtenido a partir de heteroalquilo, como se ejemplifica por $-CH_2-CH_2-S-CH_2CH_2-$ y $-CH_2-S-CH_2-CH_2-NH-CH_2-$, $-O-CH_2-CH=CH-$, $-CH_2-CH=C(H)CH_2-O-CH_2-$ y $-S-CH_2-C=C-$. Para grupos heteroalquileno, los heteroátomos también pueden ocupar cualquier o ambos extremos de la cadena (por ejemplo, alquilenooxi, alquilenodioxi, alquilenoamino o alquilendiamino).

Los términos "alcoxi," "alquilamino" y "alquiltio" (o tioalcoxi) se usan en su sentido convencional, y se refieren a los grupos alquilo unidos al resto de la molécula a través de un átomo de oxígeno, un grupo amino o un átomo de azufre, respectivamente. Además, para los grupos dialquilamino, las porciones alquilo pueden ser las mismas o diferentes y también pueden combinarse para formar un anillo de 3-7 miembros con el átomo de nitrógeno al que se une cada uno. Por consiguiente, un grupo representado como $-NR^aR^b$ pretende incluir, por ejemplo piperidinilo, pirrolidinilo, morfolinilo y azetidinilo.

Los términos "halo" o "halógeno," por sí mismos o como parte de otro sustituyente, significan, a menos que se indique otra cosa, un átomo de flúor, cloro, bromo o yodo. Además, términos tales como "haloalquilo," pretenden incluir monohaloalquilo y polihaloalquilo. Por ejemplo, el término "haloalquilo C_{1-4}" pretende incluir, por ejemplo trifluorometilo, 2,2,2-trifluoroetilo, 4-clorobutilo y 3-bromopropilo.

El término "arilo" significa, a menos que se indique otra cosa, un grupo hidrocarburo, típicamente aromático, poliinsaturado que puede ser un anillo único o anillos múltiples (hasta tres anillos) que se condensan juntos o se enlazan covalentemente. El término "heteroarilo" se refiere a grupos arilo (o anillos) que contienen de uno a cinco heteroátomos seleccionados entre N, O, y S, donde los átomos de nitrógeno y azufre se oxidan opcionalmente, y el átomo o átomos de nitrógeno se cuaternizan opcionalmente. Un grupo heteroarilo puede unirse al resto de la molécula a través de un heteroátomo. Los ejemplos no limitantes de grupos arilo incluyen fenilo, naftilo y bifenilo, mientras que los ejemplos no limitantes de grupos heteroarilos incluyen piridilo, piridazinilo, pirazinilo, pirimindinilo, triazinilo, quinolinilo, quinoxalinilo, quinazolinilo, cinnolinilo, ftalaziniilo, benzotriazinilo, purinilo, benzoimidazolilo, benzopirazolilo, benzotriazolilo, benzoisoxazolilo, isobenzofurilo, isoindolilo, indolizinilo, benzotriazinilo, tienopiridinilo, tienopirimidinilo, pirazolopirimidinilo, imidazopiridinas, benzotiaxolilo, benzofuranilo, benzotienilo, indolilo, quinolilo, isoquinolilo, isotiazolilo, pirazolilo, indazolilo, pteridinilo, imidazolilo, triazolilo, tetrazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiadiazolilo, pirrolilo, tiazolilo, furilo y tienilo. Los sustituyentes para cada uno de los sistemas de anillo arilo y heteroarilo indicados anteriormente se seleccionan entre el grupo de sustituyentes aceptables descritos a continuación.

Brevemente, el término "arilo" cuando se usa junto con otros términos (por ejemplo, ariloxi, ariltioxi, arilalquilo) incluye tanto anillo arilo y heteroarilo como se ha definido anteriormente. Por lo tanto, el término "arilalquilo" pretende incluir los radicales en los que un grupo arilo se une a un grupo alquilo (por ejemplo, bencilo, fenetilo o piridilmetilo).

Los términos anteriores (por ejemplo, "alquilo," "arilo" y "heteroarilo"), en algunas realizaciones, incluirán tanto formas sustituidas como sin sustituir del radical indicado. Los sustituyentes preferidos para cada tipo de radical se proporcionan a continuación. Brevemente, los términos arilo y heteroarilo se referirán a versiones sustituidas y sin sustituir como se proporcionan a continuación, mientras que el término "alquilo" y los radicales alifáticos relacionados harán referencia a la versión sin sustituir, a menos que se indique que está sustituida.

Los sustituyentes para los radicales alquilo (que incluyen los grupos denominados, a menudo, como alquileno, alquenilo, alquinilo y cicloalquilo) pueden ser una variedad de grupos seleccionados entre: -halógeno, -OR', -NR'R", -SR', -SiR'R"R"', -OC(O)R', -C(O)R', $-CO_2R'$, -CONR'R", -OC(O)NR'R", -NR"C(O)R', -NR'-C(O)NR"R"', $-NR"C(O)_2R'$, $-NH-C(NH_2)=NH$, $-NR'C(NH_2)=NH$, $-NH-C(NH_2)=NR'$, -S(O)R', $-S(O)_2R'$, $-S(O)_2NR'R"$, $-NR'S(O)_2R"$, -CN y $-NO_2$ en un número en el intervalo de cero a (2 m'+1), donde m' es el número total de átomos de carbono en tal radical. R', R" y R"' cada uno independientemente se refieren a hidrógeno, alquilo C_{1-8} sin sustituir, heteroalquilo sin sustituir, arilo sin sustituir, arilo sustituido con 1-3 halógenos, alquilo C_{1-8} sin sustituir, grupos alcoxi C_{1-8} o tioalcoxi C_{1-8} o grupos aril-alquilo C_{1-4} sin sustituir. Cuando R' y R" se unen al mismo átomo de nitrógeno, pueden combinarse con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 3, 4, 5, 6 o 7 miembros. Por ejemplo, -NR'R" pretende incluir 1-pirrolidinilo y 4-morfolinilo. El término "acilo" como se usa por sí mismo o como parte de otro grupo, se refiere a un radical alquilo donde dos sustituyentes en el carbono que está más próximo al punto de unión para el radical, se reemplaza con el sustituyente =O (por ejemplo, $-C(O)CH_3$, o $-C(O)CH_2CH_2OR'$).

De forma análoga, los sustituyentes para los grupos arilo y heteroarilo varían y se selecciona generalmente entre: -halógeno, -OR', -OC(O)R', -NR'R", -SR', -R', -CN, $-NO_2$, $-CO_2R'$, -CONR'R", -C(O)R', -OC(O)NR'R", -NR"C(O)R', $-NR"C(O)_2R'$, -NR'-C(O)NR"R"', $-NH-C(NH_2)=NH$, $-NR'C(NH_2)=NH$, $-NH-C(NH_2)=NR'$, -S(O)R', $-S(O)_2R'$, $-S(O)_2NR'R"$, $-NR'S(O)_2R"$, $-N_3$, perfluoroalcoxi (C_1-C_4) y perfluoroalquilo (C_1-C_4), en un número en el intervalo de cero al número total de valencias abiertas en el sistema de anillo aromático; y donde R', R" y R"' se selecciona independientemente entre hidrógeno, alquilo C_{1-8}, cicloalquilo C_{3-6}, C_{2-8} alquenilo, C_{2-8} alquinilo, arilo sin sustituir y heteroarilo, (arilo sin sustituir)-alquilo C_{1-4}, y ariloxi-alquilo C_{1-4} sin sustituir. Otros sustituyentes adecuados incluyen cada uno de los sustituyentes arilo anteriores unidos a un átomo del anillo por un enlace alquileno de entre 1-4 átomos de carbono.

Dos de los sustituyentes en los átomos adyacentes del anillo arilo o heteroarilo pueden reemplazarse con un

sustituyente de la fórmula -T-C(O)-$(CH_2)_q$-U-, donde T y U son independientemente -NH-, -O-, -CH_2- o un enlace sencillo, y q es un número entero de entre 0 a 2. Como alternativa, dos de los sustituyentes en los átomos adyacentes del anillo arilo o heteroarilo pueden reemplazarse opcionalmente con un sustituyente de la fórmula -A-$(CH_2)_r$-B-, donde A y B son independientemente -CH_2-, -O-, -NH-, -S-, -S(O)-, -$S(O)_2$-, -$S(O)_2$NR'- o un enlace sencillo, y r es un número entero de entre 1 a 3. Uno de los enlaces sencillos del nuevo anillo así formado puede reemplazarse opcionalmente con un doble enlace. Como alternativa, dos de los sustituyentes en átomos adyacentes del anillo arilo o heteroarilo pueden reemplazarse opcionalmente con un sustituyente de la fórmula -$(CH_2)_s$-X-$(CH_2)_t$-, donde s y t son independientemente número enteros de entre 0 a 3, y X es -O-, -NR'-, -S-,-S(O)-, -$S(O)_2$- o -$S(O)_2$NR'-. El sustituyente R' en -NR'- y -$S(O)_2$NR'- se selecciona entre hidrógeno o alquilo C_{1-6} sin sustituir.

Como se usa en la presente memoria, el término "heteroátomo" pretende incluir oxígeno (O), nitrógeno (N), azufre (S) y silicio (Si).

La expresión "líquido iónico " se refiere a cualquier líquido que contiene mayoritariamente iones. Preferentemente, en la presente invención, "líquido iónico" se refiere a las sales cuyo punto de fusión es relativamente bajo (por ejemplo, por de bajo de 250 ºC). Ejemplos de líquidos iónicos incluyen, por ejemplo, tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazolio, tetrafluoroborato de 1-hexil-3-metilimidazolio, tetrafluoroborato de 1-octil-3-metilimidazolio, tetrafluoroborato de 1-nonil-3-metilimidazolio, tetrafluoroborato de 1-decil-3-metilimidazolio, hexafluorofosfato de 1-hexil-3-metilimidazolio y bromuro de 1-hexil-3-metilimidazolio.

La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" pretende incluir sales de los compuestos activos que se preparan con ácidos o bases relativamente no tóxicos, dependiendo de los sustituyentes particulares encontrados en los compuestos descritos en el presente documento. Cuando los compuestos de la presente invención contienen funcionalidades relativamente ácidas, pueden obtenerse sales de adición de base poniendo en contacto la forma neutra de tales compuestos con una cantidad suficiente de la base deseada, ya sea pura o en un disolvente inerte adecuado. Ejemplos de sales obtenidas a partir de bases inorgánicas farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo sales de aluminio, amonio, calcio, cobre, férricas, ferrosas, litio, magnesio, mangánicas, manganosas, potasio, sodio y cinc. Las sales obtenidas a partir de bases orgánicas farmacéuticamente aceptables incluyen sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, que incluyen, por ejemplo aminas sustituidas, aminas cíclicas, aminas de origen natural, tales como por ejemplo, arginina, betaína, cafeína, colina, N, N'-dibenciletilendiamina, dietilamina, 2-dietilaminoetanol, 2-dimetilaminoetanol, etanolamina, etilendiamina, N-etilmorfolina, N-etilpiperidina, glucamina, glucosamina, histidina, hidrabamina, isopropilamina, lisina, metilglucamina, morfolina, piperazina, piperadina, resinas de poliamina, procaína, purinas, teobromo, trietilamina, trimetilamina, tripropilamina y trometamina. Cuando los compuestos de la presente invención contienen funcionalidades relativamente básicas, pueden obtenerse sales de adición de ácido poniendo en contacto la forma neutra de tales compuestos con una cantidad suficiente del ácido deseado, ya sea puro o en un disolvente inerte adecuado. Ejemplos de sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables incluyen los obtenidos a partir de ácidos inorgánicos, como por ejemplo ácido clorhídrico, bromhídrico, nítrico, carbónico, monohidrogenocarbónico, fosfórico, monohidrógenofosfórico, dihidrógenofosfórico, sulfúrico, monohidrogensulfúrico, yodhídrico o fosforoso así como sales obtenidas a partir de ácidos orgánicos relativamente no tóxicos, como por ejemplo acético, propiónico, isobutíroco, malónico, benzoico, succínico, subérico, fumárico, mandélico, ftálico, bencenosulfónico, p-tolil-sulfónico, cítrico, tartárico y metanosulfónico. También se incluyen sales de aminoácidos, tales como por ejemplo, arginato y sales de ácidos orgánicos, como por ejemplo ácido glucurónico o galactunórico (véase, por ejemplo, Berge, S.M., *et al*, "Pharmaceutical Salts", Journal of Pharmaceutical Science, 1977, 66, 1-19). Determinados compuestos específicos de la presente invención contienen tanto funcionalidades básicas como ácidas que permiten que los compuestos se conviertan en sales de adición de base o de ácido.

Las formas neutras de los compuestos pueden regenerarse poniendo en contacto la sal con una base o ácido y aislando el compuesto precursor de la manera convencional. La forma precursora del compuesto difiere de las diversas formas de sal en determinadas propiedades físicas, tales como la solubilidad en disolventes polares, pero en otros aspectos las sales son equivalentes a la forma precursora para los propósitos de la presente invención.

Los profármacos de los compuestos descritos en el presente documento son los compuestos que se someten fácilmente a condiciones fisiológicas para proporcionar los compuestos de la presente invención. Además, los profármacos pueden convertirse a los compuestos de la presente invención por métodos químicos o bioquímicos en un medio ambiente *ex vivo*. Por ejemplo, los profármacos pueden convertirse lentamente a los compuestos de la presente invención cuando se colocan en un reservorio de un parche transdermal con una enzima adecuada o reactivo químico.

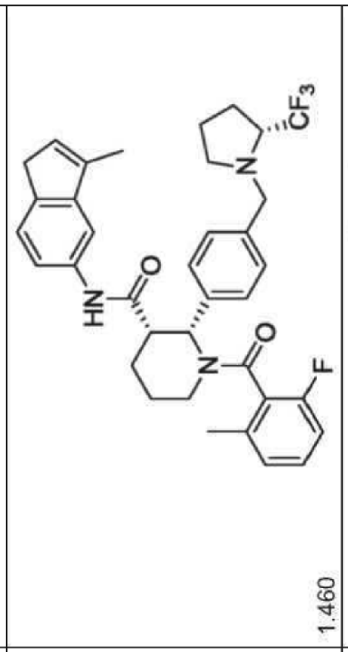
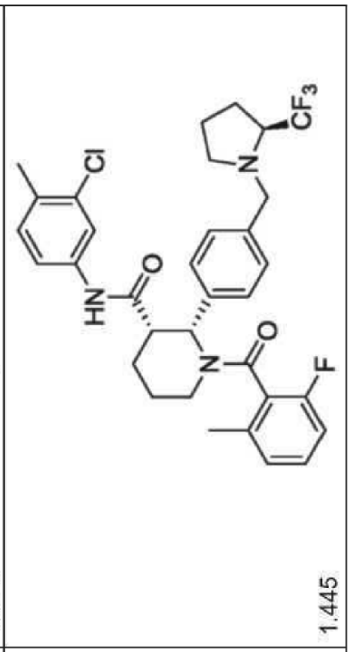
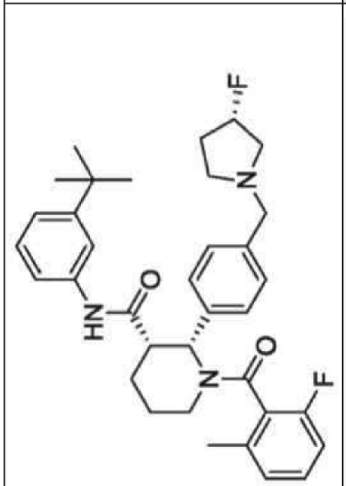
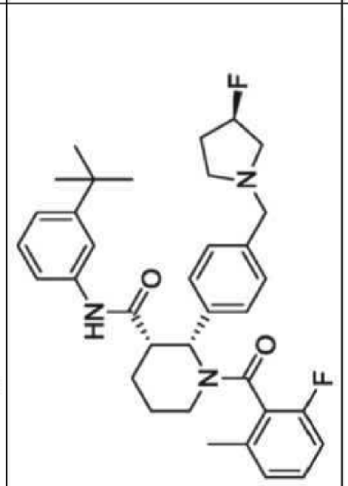
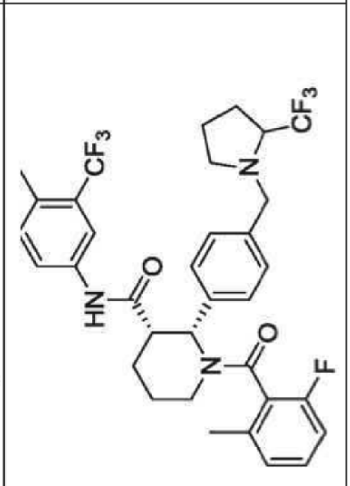
Determinados compuestos de la presente invención pueden existir en formas no solvatadas, así como formas solvatadas, que incluyen formas hidratadas. En general, las formas solvatadas son equivalentes a las formas no solvatadas y se pretenden abarcar dentro del alcance de la presente invención. Determinados compuestos de la presente invención pueden existir en múltiples formas cristalinas o amorfas. En general, todas las formas físicas son equivalentes para los usos por presente invención y se entiende que están dentro del alcance de la presente invención.

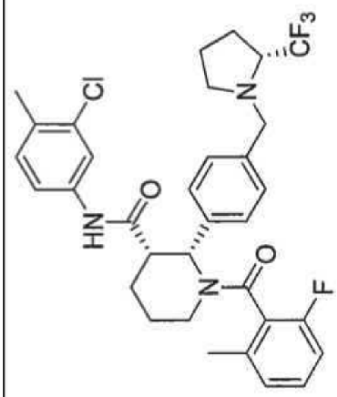
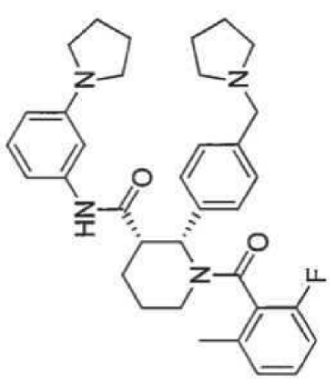
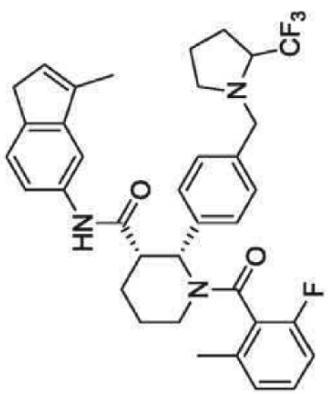
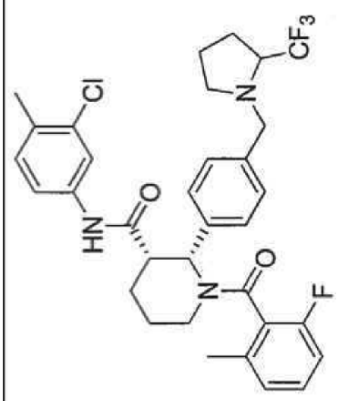
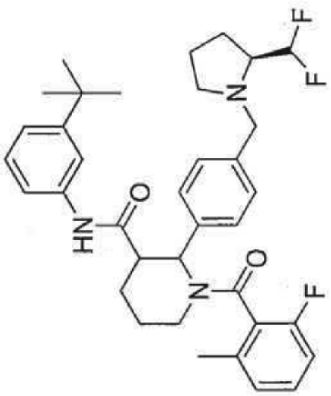
Determinados compuestos de la presente invención poseen átomos de carbono asimétricos (centros ópticos) o dobles enlaces; los racematos, diastereómeros, isómeros geométricos, regioisómeros e isómeros individuales (por ejemplo, enantiómeros separados) se pretenden abarcar dentro del alcance de la presente invención. Los compuestos de la

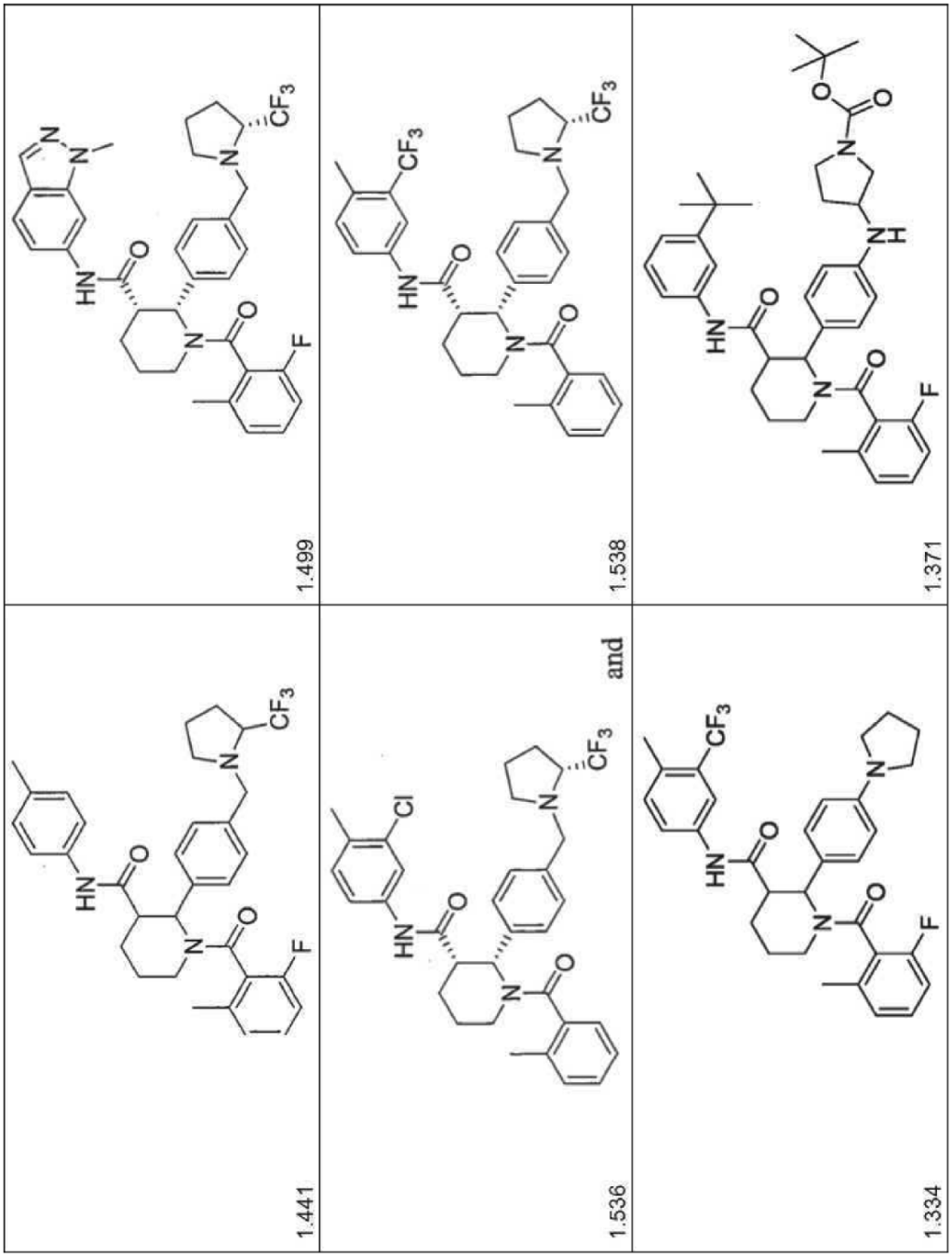
presente invención también pueden contener proporciones no naturales de isótopos atómicos en uno o más de los átomos que constituyen tales compuestos. Por ejemplo, los compuestos pueden estar radiomarcados con isótopos radioactivos, tales como por ejemplo tritio (^{3}H), yodo-125 (^{125}I) o carbono-14 (^{14}C). Todas las variaciones isotópicas de los compuestos de la presente invención, ya sean radioactivas o no, se pretenden abarcar dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, los compuestos pueden prepararse, tal que cualquier número de átomos de hidrógeno se reemplacen con un isótopo de deuterio (^{2}H).

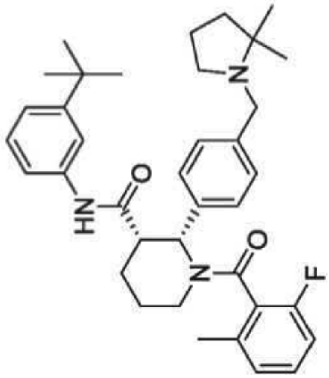
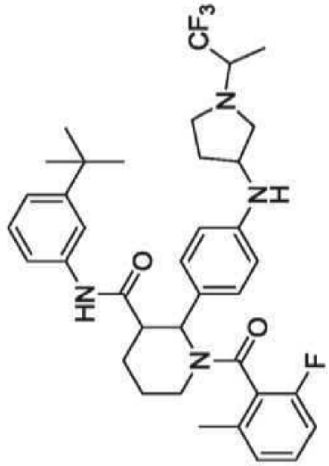
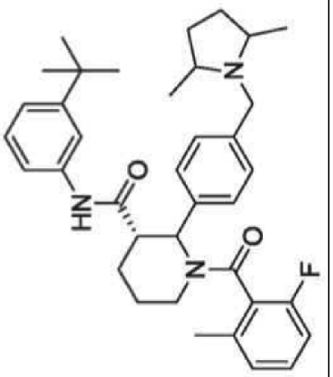
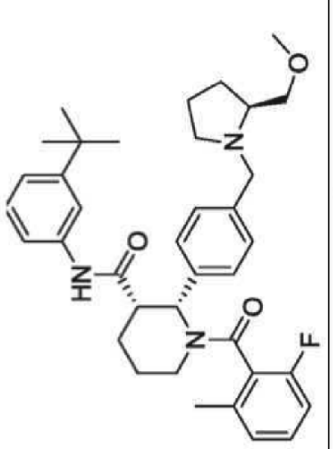
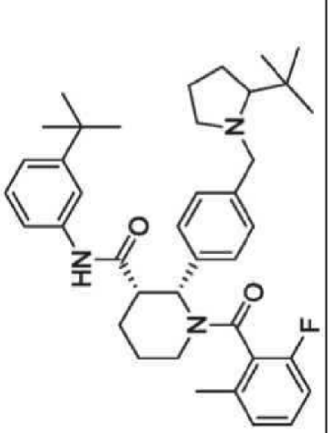
II. Compuestos

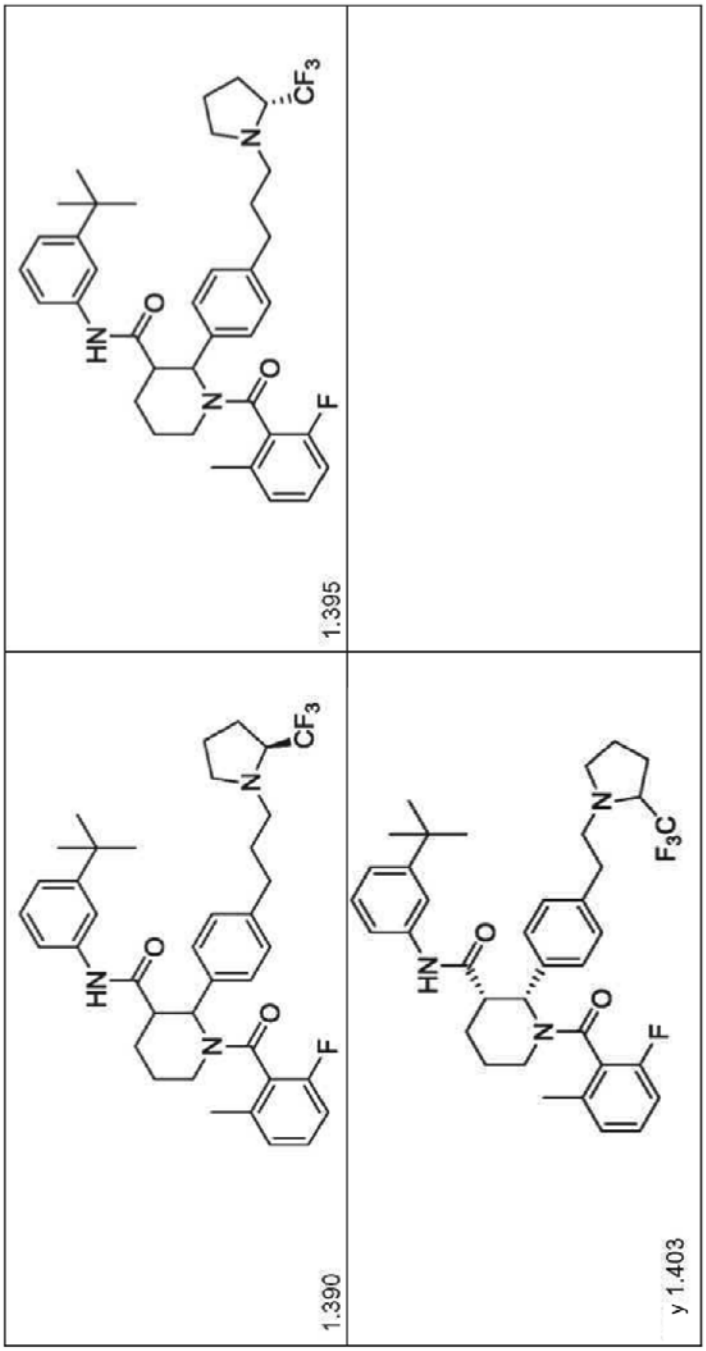
La presente invención proporciona un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en:

	 1.460	 1.445
 1.394	 1.396	 1.421

	 1.451	 1.452
 1.426	 1.428	 1.438

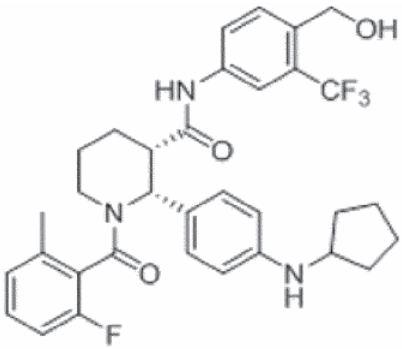

1.499
1.538
1.371
1.441
1.536
and
1.334

 1.399	 1.406
 1.412	 1.435
	 1.495

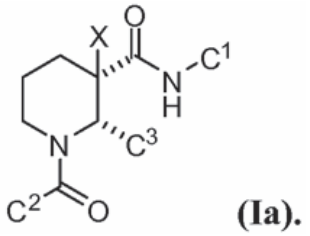

1.395
1.390
y 1.403

o una sal, hidrato o rotómeros farmacéuticamente aceptables de los mismos;
La presente invención proporciona un compuesto que es

1.543

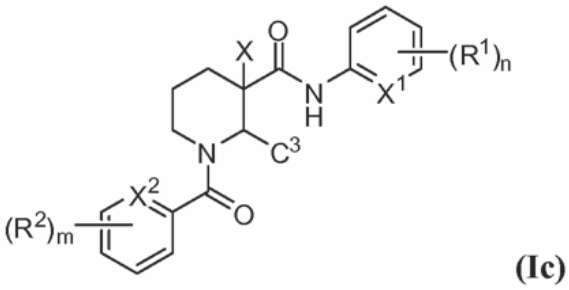


Se describen compuestos de fórmula I que tienen la subfórmula **Ia**:



(Ia).

También se describen compuestos de fórmula I que tiene la subfórmula **Ic**:



(Ic)

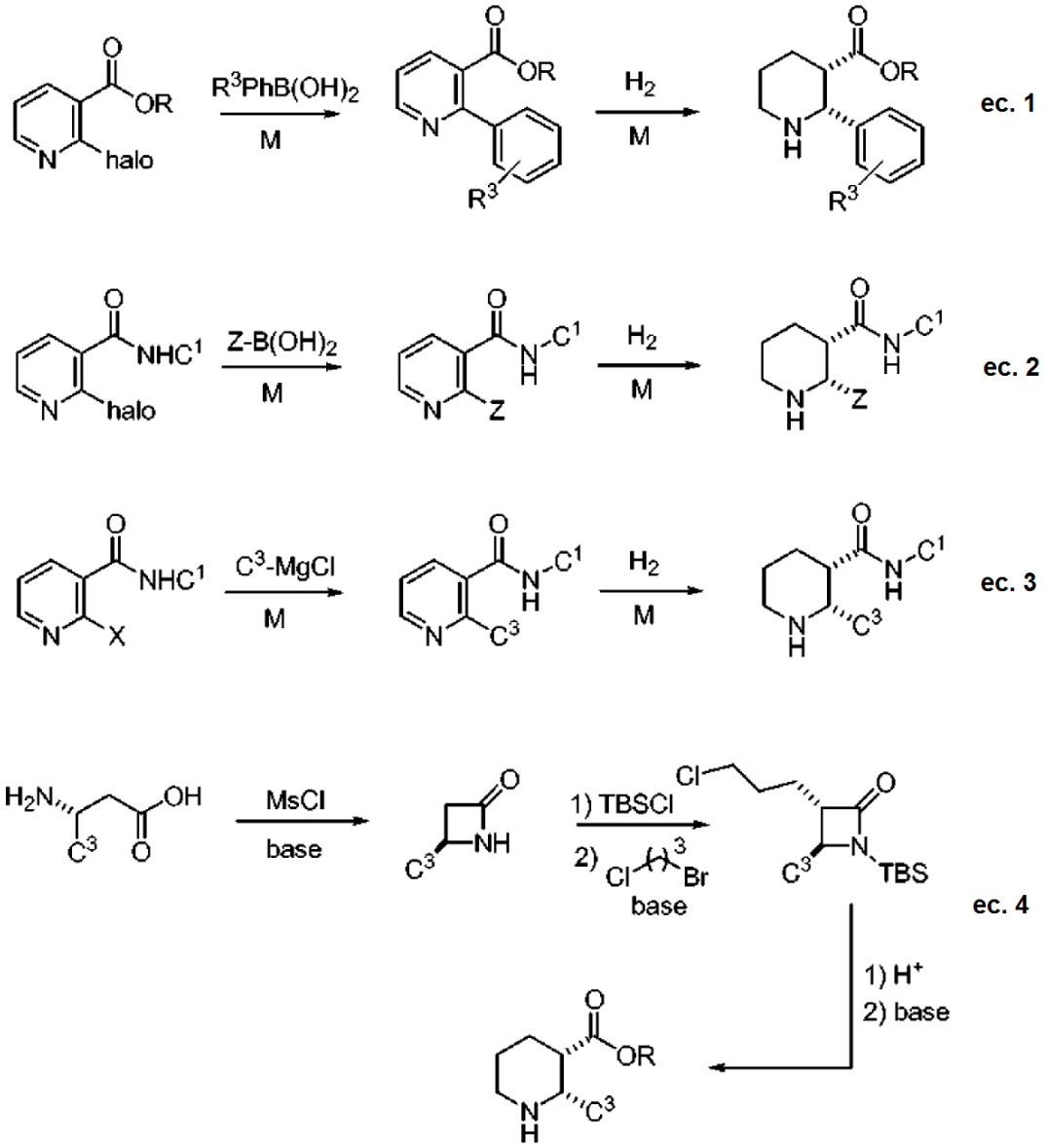
donde X^1 se selecciona entre el grupo que consiste en N, CH y CR^1; el subíndice n es un número entero de 0 a 2; X^2 se selecciona entre el grupo que consiste en N, CH y CR^2; y el subíndice m es un número entero de 0 a 2.

Los compuestos de la invención que tienen fórmula I pueden existir en diferentes formas diastereoméricas, por ejemplo, los sustituyentes C^1 y C^2 en las subfórmulas Ia y Ic pueden estar en posición cis con respecto a la otra o en posición trans con respecto a la otra. Como se usa en el presente del presente documento, los términos *cis* o *trans* se usan en su sentido convencional en las técnicas químicas, es decir, refiriéndose a la posición relativa de los sustituyentes entre sí con respecto a un plano de referencia, por ejemplo, un doble enlace o un sistema de anillo, tal como un sistema de anillo tipo decalina o un sistema de anillo de hidroquinolona: en el isómero cis, los sustituyentes están en el mismo lado del plano de referencia, en el isómero trans los sustituyentes están en lados opuestos. Además, se contempla por la presente invención diferentes confómeros, así como distintos rotámeros. Los confómeros son isómeros conformacionales que difieren por la rotación alrededor de un solo enlace σ.

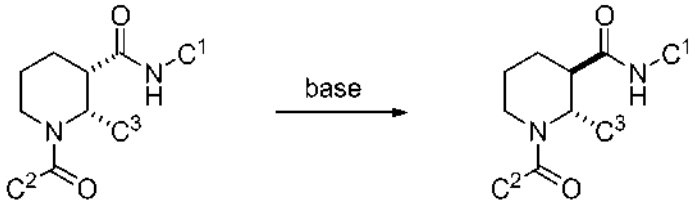
Preparación de compuestos

Los expertos en la materia reconocerán que hay una diversidad de métodos disponibles para sintetizar moléculas representadas en las reivindicaciones. En general, los métodos útiles para sintetizar los compuestos representados en las reivindicaciones consisten de cuatro partes, que pueden hacerse en cualquier orden: Formación del anillo de piperidina, instalación de dos enlaces amida e instalación y/o modificación de los grupos funcionales en C^1, C^2 y C^3.

Se ilustran a continuación varios métodos para la preparación de los compuestos reivindicados (ec. 1-6).

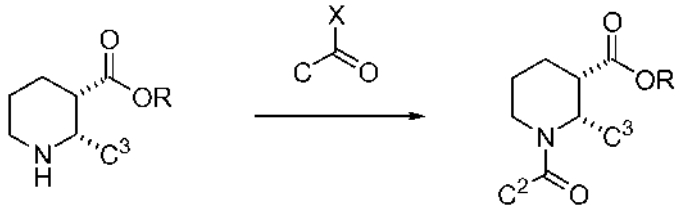


Las ecuaciones 1-4 demuestran algunos métodos de formación del anillo de piperidina. El acoplamiento en la posición 2 del anillo de piridina puede realizarse a través de acoplamientos mediados por metales de transición como se demuestra en las ec. 1-2, o por adición catalizada por metales de una especie organometálica, tal como la sal cincato o magnesio (ec. 3). Posteriormente al acoplamiento a la posición 2, la hidrogenación mediada por metales de transición del anillo de piridina produjo el sistema de anillo de pipidina (ec. 1-3). Otro método da como resultado la elaboración de un β-aminoácido a un anillo de piperidina como se describe en la ec. 4. Los expertos en la materia reconocerán que muchas metodologías sintéticas pueden producir piperdinas sustituidas, que incluyen ciclación de C-C o C-N de precursores acíclicos a través de alquilación o metástesis de cierre del anillo. La estereoquímica relativa puede establecer una diversidad de métodos, que incluyen selectividad durante la etapa de hidrogenación. La esteroquímica absoluta también puede establecerse a través de una variedad de métodos, a través del uso de ligandos quirales o un auxiliar quiral, la separación de diastereoisómeros quirales, el uso de materiales de partida quirales o resolución clásica. Los compuestos con estereoquímica *2,3-trans* pueden tener la estereoquímica relativa establecida durante la formación de la piperidina o pueden obtenerse a través de epimerización de una piperidina *2,3-cis* como se ilustra en la ec. 5.



ec. 5

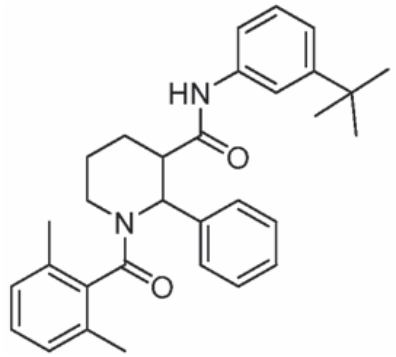
La acilación del anillo de piperidina se describe en la ecuación 6. En el caso de la ec. 6, X puede escogerse entre un grupo apropiado, tal como OH, Cl y F o entre cualquier grupo capaz de activar un grupo carbonilo para la adición de una amina (por ejemplo, OSu, o imidazol). Tales acoplamientos pueden estar asistidos mediante el uso de bases inorgánicas y orgánicas, agentes de activación, tales como HBTU, y también mediante catalizadores, en particular por los catalizadores conocidos en la técnica que asisten en la formación de enlaces amida, tales como DMAP, HOBT, etc. Las parejas de acoplamiento adecuadas incluyen un ácido carboxílico y una piperidina, un fluoruro de acilo y una amina y semejantes. Los expertos en la materia reconocerán que hay otras combinaciones posibles que también darán como resultado el producto deseado.



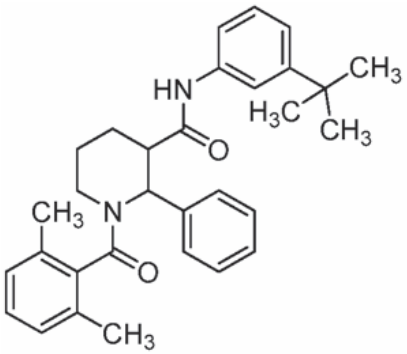
ec. 6

Se han usado una variedad de métodos descritos anteriormente para preparar compuestos de la invención, algunos de los cuales se describen en los ejemplos.

Una familia de compuestos específicos de particular interés que tiene la fórmula I consiste en compuestos, sales, hidratos y rotómeros de los mismos farmacéuticamente aceptables, como se muestran en la Figura 1. Para los compuestos de la Figura 1, cualquier enlace que no ilustra en el átomo o grupo unido se entiende que es un grupo metilo. Por ejemplo,



pretende ilustrar



III. Composiciones farmacéuticas

Además de los compuestos proporcionados anteriormente, las composiciones para modular la actividad C5a en seres humanos y animales contendrán típicamente un portador o diluyente farmacéutico.

El término "composición" como se usa en el presente documento pretende incluir un producto que comprende los ingredientes específicos en las cantidades específicas, así como cualquier producto que resulte, directa o indirectamente, de la combinación de los ingredientes específicos en las cantidades específicas. Por "farmacéuticamente aceptable" se entiende que el portador, diluyente o excipiente debe ser compatible con otros ingredientes de la formulación y no ser perjudiciales para el receptor de la misma.

Las composiciones farmacéuticas para la administración de los compuestos de esta invención pueden presentarse convenientemente en una forma de dosificación unitaria y pueden prepararse por cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de farmacia y entrega de fármaco. Todos los métodos incluyen la etapa de llevar el principio activo en asociación con el portador que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general, las composiciones farmacéuticas se preparan asociando uniforme e íntimamente el principio activo en asociación con un portador líquido o un portador sólido finamente dividido o ambos, y después, si es necesario, dando forma al producto en la formulación deseada. En la composición farmacéutica el compuesto objeto activo se incluye en una cantidad suficiente para producir el efecto deseado tras el proceso o condición de la enfermedad.

Las composiciones farmacéuticas que contienen el principio activo pueden estar en una forma adecuada para su uso oral, por ejemplo, como comprimidos, trociscos, grageas, suspensiones acuosas u oleosas, polvos o gránulos dispersables, emulsiones y autoemulsiones como se describe en la Solicitud de Patente de Estados Unidos 2002-0012680, cápsulas duras o suaves, jarabes, elixires, soluciones, parche bucal, gel oral, goma de mascar, comprimidos masticables, polvo efervescente y comprimidos efervescentes. Las composiciones pretendidas para uso oral pueden prepararse de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica para la fabricación de composiciones farmacéuticas y tales composiciones pueden contener uno o más agentes seleccionados entre el grupo que consiste en agentes edulcorantes, agentes saborizantes, agentes colorantes, agentes antioxidantes y conservantes para proporcionar preparaciones farmacéuticamente elegantes y de buen sabor. Los comprimidos contienen el principio activo con excipientes no tóxicos farmacéuticamente aceptables que son adecuados para la fabricación de comprimidos. Estos excipientes pueden ser por ejemplo, diluyentes inertes, tales como celulosa, dióxido de silicio, óxido de aluminio, carbonato de calcio, carbonato sódico, glucosa, manitol, sorbitol, lactosa, fosfato de calcio o fosfato sódico; agentes granuladores y disgregantes, por ejemplo, almidón de maíz o ácido algínico; agentes aglutinantes, por ejemplo PVP, celulosa, PEG, almidón, gelatina o acacia y agentes lubricantes, por ejemplo estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Los comprimidos puedes estar sin recubrir o pueden estar recubiertos, entéricamente o de otra manera, mediante técnicas conocidas para retardar la desintegración y la absorción en el tracto gastrointestinal y proporcionar de esta manera una acción sostenida durante un periodo largo. Por ejemplo, puede emplearse un material retardante, tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo. También pueden recubrirse por las técnicas descritas en las Pat. de Estados Unidos n.º 4.256.108; 4.166.452; y 4.265.874 para formar comprimidos osmótico terapéuticos de liberación controlada.

Las formulaciones para uso oral también se presentan como cápsulas de gelatina dura donde el principio activo se mezcla con un diluyente sólido inerte, por ejemplo, carbonato de calcio, fosfato de calcio o caolín, polietilenglicol (PEG) de varios tamaños medios (por ejemplo, PEG400, PEG4000) y ciertos tensioactivos tales como cremophor o solutol, o como cápsulas de gelatina suave donde el principio activo se mezcla con agua o un medio oleoso, por ejemplo aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva. Además, las emulsiones pueden prepararse con un ingrediente no miscible en agua, tal como en forma de un aceite y se estabilizan con tensioactivos, tales como, por ejemplo, mono o digliceridos o ésteres de PEG.

Las suspensiones acuosas contienen los materiales activos en mezcla con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Tales excipientes son agentes de suspensión, por ejemplo carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato sódico, polivinilpirrolidona, goma tragacanto y goma acacia; agentes dispersantes y humectantes pueden ser un fosfátido de origen natural, por ejemplo lecitina, o productos de condensación de un óxido de alquileno con ácidos grasos, por ejemplo polioxietileno estearato, o productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga, por ejemplo heptadecaetilenooxicetanol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales obtenidos a partir de ácidos grasos y un hexitol, tal como monooleato de polioxietileno sorbitol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales obtenidos a partir de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo monooleato de polietileno sorbitan. Las suspensiones acuosas también pueden contener uno o más conservantes, por ejemplo etilo o n-propilo, p-hidroxibenzoato, uno o más agentes colorantes, uno o más agentes saborizantes y uno o más agentes edulcorantes, tales como sacarosa y sacarina.

Las suspensiones oleosas pueden formularse suspendiendo el principio activo en un aceite vegetal, por ejemplo aceite de maní, aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de coco, o en un aceite mineral, tal como parafina líquida. Las suspensiones oleosas pueden contener un agente espesante, por ejemplo cera de abeja, parafina dura o alcohol cetílico. Los agentes edulcorantes, tales como los mostrados anteriormente y los agentes saborizantes pueden

añadirse para proporcionar una preparación oral de buen sabor. Estas composiciones pueden conservarse mediante la adición de un antioxidante, tal como ácido ascórbico.

Los polvos y los gránulos dispersables adecuados para la preparación de una suspensión acuosa mediante la adición de agua proporcionan el principio activo en mezcla con un agente dispersante o humectante, un agente de suspensión y uno o más conservantes. Los agentes dispersantes o humectantes adecuados o los agentes de suspensión se ejemplifican mediante los mencionados anteriormente. También pueden presentarse los excipientes adicionales, por ejemplo agentes edulcorantes, saborizantes y colorantes.

Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden estar en forma de emulsiones de aceite en agua. La fase oleosa puede ser un aceite vegetal, por ejemplo aceite de olivo o aceite de maíz, o un aceite mineral, por ejemplo parafina líquida o mezclas de estos. Los agentes de emulsificación adecuados pueden ser gomas de origen natural, por ejemplo goma acacia o goma tragacanto, fosfátidos de origen natural, por ejemplo haba de soja, lecitina y ésteres o ésteres parciales obtenidos a partir de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo monooleato de sorbitan y productos de condensación de dichos ésteres parciales con óxido de etileno, por ejemplo monooleato de polioxietileno sorbitan. Las emulsiones también pueden contener agentes edulcorantes y saborizantes.

Los jarabes y elixires pueden formularse con agentes edulcorantes, por ejemplo glicerol, propilenglicol, sorbitol o sacarosa. Tales formulaciones también pueden contener un agente emoliente, conservante y saborizante y colorante. Las soluciones orales pueden prepararse en combinación con, por ejemplo, ciclodextrina, PEG y tensioactivos.

Las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de una suspensión acuosa u oleaginosa inyectable. Esta suspensión puede formularse de acuerdo con la técnica conocida usando los agentes dispersantes o humectantes adecuados y los agentes de suspensión que se han mencionado anteriormente. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo como una solución en 1,3-butano diol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse están el agua, una solución de Ringer y una solución isotónica de cloruro sódico. Además, convencionalmente se usan aceites fijos estériles como disolvente o medio de suspensión. Para este propósito cualquier aceite fijo blando puede emplearse, incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. Además, los ácidos grasos, tales como ácido oleico encuentran uso en la preparación de inyectables.

Los compuestos de la presente invención también pueden administrarse en forma de supositorios para administración rectal del fármaco. Estas composiciones pueden prepararse mediante mezclando el fármaco con un excipiente adecuado no irritante que es sólido a temperaturas comunes, pero es líquido a temperatura rectal y por lo tanto se fundirá en el recto para liberar el fármaco. Tales materiales incluyen manteca de cacao y polietilenglicoles. Además, los compuestos pueden administrarse a través de la entrega ocular por medio de soluciones o pomadas. Aún más, la administración transdérmica de los compuestos en cuestión puede realizarse por medio de parches iontoforéticos y similares. Para uso tópico, se emplean cremas, pomadas, gelatinas, soluciones o suspensiones, etc, que contienen los compuestos de la presente invención. Como se usa en el presente documento, también pretende incluirse en una aplicación tópica el uso de lavados bucales y gargarismos.

Los compuestos de esta invención también pueden acoplarse a un portador que es un polímero adecuado como portador fármaco diana. Tales polímeros pueden incluir polivinilpirrolidona, copolímero de pirano, polihidroxi-propil-metacrilamida-fenol, polihidroxietil-aspartamida-fenol o polietilenooxide-polilisina sustituido con residuos de palmitoilo. Además, los compuestos de la invención pueden acoplarse a un portador que es una clase de polímeros degradables útiles para conseguir la liberación controlada de un fármaco, por ejemplo ácido poliláctico, ácido poliglicólico, copolímeros de ácido poliláctico y poliglicólico, poliepsilón de caprolactona, ácido polihidroxi butírico, poliortoésteres, poliacetales, polidihidropiranos, policianoacrilatos copolímeros de hidrogeles en bloque entrecruzados o anfipáticos. Los polímeros y las matrices poliméricas semipermeables pueden formarse en artículos preformados, tales como, por ejemplo, válvulas, estents, tubos o prótesis. En una realización de la invención, el compuesto de la invención se acopla a un polímero o matriz polimérica semipermeable que se forma como un estent o un dispositivo de injerto estent.

IV. Métodos de tratamiento de enfermedades y trastornos modulados por C5a

Los compuestos de la invención pueden emplearse como agonistas, (preferentemente) antagonistas, agonistas parciales, agonistas inversos, de los receptores C5a en diversos contextos, tanto *in vitro* como *in vivo*. En un aspecto, los compuestos de la invención son antagonistas C5aR que pueden utilizarse para inhibir la unión del ligando del receptor C5a (p. ej., C5a) al receptor C5a *in vitro* o *in vivo*. En general, dichos métodos comprenden la etapa de poner en contacto un receptor C5a con una cantidad suficiente de uno o más moduladores del receptor C5a como se proporciona en el presente documento, en presencia del ligando del receptor C5a en una solución acuosa y en condiciones adecuadas para la unión del ligando al receptor C5a. El receptor C5a puede estar presente en suspensión (p. ej., en una membrana aislada o preparación celular), en una célula cultivada o aislada, o en un tejido u órgano.

Preferentemente, la cantidad de modulador del receptor C5a en contacto con el receptor ha de ser suficiente para inhibir la unión de C5a al receptor C5a *in vitro* como se mide, por ejemplo, utilizando un ensayo de unión de

radioligandos, un ensayo de movilización de calcio, o un ensayo de quimiotaxis como se describe en el presente documento.

En un aspecto, los moduladores C5a de la invención se utilizan para modular, preferentemente inhiben la actividad de transducción de señales de un receptor C5a, por ejemplo, poniendo en contacto uno o más compuestos de la invención con un receptor C5a (ya sea *in vitro* o *in vivo*) en condiciones apropiadas para la unión de l(los) modulador(es) al receptor. El receptor puede estar presente en solución o en suspensión, en una preparación de células cultivadas o aisladas o en un paciente. Cualquier modulación de la actividad de transducción de señales puede evaluarse por detección de un efecto en ion calcio en la movilización del calcio o mediante la detección de un efecto en la quimiotaxis celular mediada por el receptor C5a. En general, una cantidad eficaz del(los) modulador(es) C5a es una cantidad suficiente para modular la actividad de transducción de señales del receptor C5a *in vitro* en un ensayo de movilización de calcio o quimiotaxis celular mediada por el receptor C5a en un ensayo de migración.

Cuando se emplean compuestos de la invención para inhibir la quimiotaxis celular mediada por el receptor C5a, preferentemente quimiotaxis leucocitaria (p. ej., neutrófilos), en un ensayo de quimiotaxis *in vitro*, dichos métodos comprenden poner en contacto los glóbulos blancos (en particular, glóbulos blancos de primate, especialmente glóbulos blancos humanos) con uno o más compuestos de la invención. Preferentemente, la concentración es suficiente para inhibir la quimiotaxis de los glóbulos blancos en un ensayo de quimiotaxis *in vitro*, por lo que los niveles de la quimiotaxis observados en un ensayo de control son significativamente más elevados, como se ha descrito previamente, que los niveles observados en un ensayo en el que se ha añadido un compuesto de la invención.

Los compuestos de la presente invención son útiles para facilitar los trasplantes de órganos. Los compuestos se pueden colocar en una solución, con el órgano antes del trasplante.

Los compuestos de la presente invención pueden utilizarse para tratar pacientes que padecen afecciones que son sensibles a la modulación del receptor C5a. La presente invención proporciona los compuestos de la invención para uso en un método de tratamiento de un mamífero que padece o es susceptible a una enfermedad o trastorno que implica la activación patológica de receptores C5a, en donde dicha enfermedad o trastorno es una enfermedad o trastorno inflamatorio, un trastorno cardiovascular o cerebrovascular, un trastorno autoinmune o secuelas patológicas asociadas con diabetes mellitus insulino-dependiente, nefropatía de lupus, nefritis de Heyman, nefritis membranosa, glomerulonefritis, respuestas de sensibilidad de contacto o inflamación resultante del contacto de la sangre con superficies artificiales.Como se utiliza en el presente documento, el término "tratar" o "tratamiento" abarca tanto un tratamiento modificador de la enfermedad como un tratamiento sintomático, cualquiera de los cuales puede ser profiláctico (es decir, antes del inicio de los síntomas, con el fin de prevenir, retrasar o reducir la gravedad de los síntomas) o terapéutico (es decir, después del inicio de los síntomas, con el fin de reducir la gravedad y/o duración de los síntomas). Como se utiliza en el presente documento, una enfermedad se considera "sensible a la modulación del receptor C5a" si la modulación de la actividad del receptor C5a produce la reducción de la actividad inadecuada de un receptor C5a. Como se utiliza en el presente documento, el término "pacientes" incluye primates (especialmente humanos), animales domésticos de compañía (tales como perros, gatos, caballos y similares) y ganado (tales como reses, cerdos, ovejas y similares), con dosificaciones que se describen en el presente documento.

Enfermedades que pueden tratarse por la modulación de C5a.

Trastornos autoinmunitarios -- p. ej., artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Guillain-Barré, pancreatitis, nefritis lúpica, glomerulonefritis lúpica, psoriasis, enfermedad de Crohn, vasculitis, síndrome de intestino irritable, dermatomiositis, esclerosis múltiple, asma bronquial, pénfigo, penfigoide, esclerodermia, miastenia grave, estados hemolíticos y trombocitopénicos autoinmunitarios, síndrome de Goodpasture (y glomerulonefritis asociada y hemorragia pulmonar), inmunovasculitis, rechazo de injerto tisular y rechazo hiperagudo de órganos trasplantados.

Trastornos inflamatorios y afecciones relacionadas -- p. ej., neutropenia, sepsis, choque séptico, enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple, aplojía, enfermedad inflamatoria del intestino (EII), degeneración macular relacionada con la edad (DME, en ambas formas, húmeda y seca), inflamación asociada con quemaduras severas, lesión pulmonar, y lesión por isquemia-reperfusión, osteoartritis, así como síndrome de distrés respiratorio agudo (adulto) (SDRA), trastorno pulmonar obstructivo crónico (TPOC), síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS), dermatitis atópica, psoriasis, urticaria crónica y síndrome de disfunción orgánica múltiple (SDOM). También se incluyen secuelas patológicas asociadas con la diabetes mellitus insulinodependiente (incluyendo retinopatía diabética), nefropatía lúpica, nefritis de Heyman, nefritis membranosa y otras formas de glomerulonefritis, respuestas de sensibilidad de contacto, e inflamación provocada por el contacto de la sangre con superficies artificiales que pueden causar activación del complemento, como ocurre, por ejemplo, durante la circulación extracorpórea de la sangre (p. ej., durante la hemodiálisis o por medio de una máquina de circulación extracorpórea, por ejemplo, junto con cirugía vascular, tal como cirugía de injerto de derivación de la arteria coronaria o reemplazo de válvulas del corazón), o junto con el contacto con otros vasos sanguíneos artificiales o superficies contenedoras (p. ej., dispositivos de asistencia ventricular, aparatos cardíacos artificiales, tubos de transfusión, bolsas para almacenamiento de sangre, plasmaféresis y plaquetaféresis). Se incluyen asimismo enfermedades relacionadas con la lesión por isquemia/reperfusión, tales como aquellas resultantes de los trasplantes, incluyendo trasplante de órganos sólidos, y síndromes, tales como lesión por reperfusión isquémica, colitis isquémica e isquemia cardiaca. Los compuestos de la

presente invención también pueden resultar útiles en el tratamiento de la degeneración macular asociada a la edad (Hageman *et al*, P.N.A.S.102: 7227-7232, 2005).

Trastornos cardiovasculares y cerebrovasculares -- p. ej., infarto de miocardio, trombosis coronaria, oclusión vascular, reoclusión vascular posquirúrgica, aterosclerosis, lesiones traumáticas del sistema nervioso central, y cardiopatía isquémica. Una cantidad eficaz de un compuesto de la invención puede administrarse a un paciente con riesgo de infarto de miocardio o trombosis (es decir, un paciente que posee uno o más factores de riesgo reconocidos de infarto de miocardio o trombosis, tales como, entre otros, obesidad, tabaquismo, hipertensión, hipercolesterolemia, antecedentes previos o genéticos de infarto de miocardio o trombosis) con el fin de reducir el riesgo de infarto de miocardio o trombosis.

Enfermedades de vasculitis - las enfermedades vasculíticas se caracterizan por la inflamación de los vasos sanguíneos. La infiltración de los leucocitos conduce a la destrucción de las paredes de los vasos sanguíneos, y se cree que la vía del complemento desempeña un papel significativo en la iniciación de la migración leucocitaria así como el daño resultante manifestado en el sitio de la inflamación (*Vasculitis*, segunda edición, editado por Ball y Bridges, Oxford University Press, págs. 47-53, 2008). Los compuestos proporcionados en la presente invención pueden emplearse para tratar la vasculitis leucoclástica, granulomatosis de Wegener, poliangitis microscópica, síndrome de Churg-Strauss, púrpura de Schönlein-Henoch, poliarteritis nodosa, glomerulonefritis rápidamente progresiva (GNRP), crioglobulinemia, arteritis de células gigantes (ACG), enfermedad de Behcet y arteritis de Takayasu (TAK).

Infección por VIH y SIDA -- los moduladores del receptor C5a proporcionados en el presente documento pueden utilizarse para inhibir la infección por VIH, retrasar la progresión del SIDA o reducir la gravedad de los síntomas o infección por VIH y SIDA.

Trastornos neurodegenerativos y enfermedades relacionadas -- en otros aspectos adicionales, los antagonistas de C5a proporcionados en el presente documento pueden emplearse para tratar la enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple y el deterioro de la función cognitiva asociada con la cirugía de derivación cardiopulmonar y los procedimientos relacionados.

Cánceres - Los antagonistas de C5a proporcionados en este documento también son útiles para el tratamiento de cánceres y condiciones precancerosas en un sujeto. Los cánceres específicos que se pueden tratar incluyen, pero no se limitan a, sarcomas, carcinomas y tumores mixtos. Ejemplos de enfermedades que pueden tratarse de acuerdo con la presente invención incluyen fibrosarcomas, liposarcomas, condrosarcomas, sarcomas osteogénicos, angiosarcomas, linfangiosarcomas, sinoviomas, mesoteliomas, meningiomas, leucemias, linfomas, leiomiosarcomas, rabdomiosarcomas, carcinomas de células escamosas, carcinomas basocelulares, adenocarcinomas, carcinomas papilares de células renales, carcinomas de células renales, carcinomas de células renales, carcinomas de células renales, carcinomas hepatocelulares, carcinomas de células transicionales, coriocarcinomas, seminomas, carcinomas embrionarios, tumores de wilm, adenomas pleomórficos, papilomas de células hepáticas, adenomas tubulares renales, cistoadenomas, papilomas, adenomas, leiomiomas y rabdomiomas , hemangiomas, linfangiomas, osteomas, condromas, lipomas y fibromas.

En otra realización, los compuestos de la presente invención son útiles en el tratamiento de la nefrotoxicidad inducida por cisplatino. En esta realización, el tratamiento compuesto puede aliviar la nefrotoxicidad inducida por la quimioterapia con cisplatino de tumores malignos (Hao Pan y col., *Am. J Physiol, Physiol Renal*, 296, F496-504, 2009).

En una realización de la invención, los compuestos de la invención pueden emplearse en el tratamiento de enfermedades seleccionadas entre el grupo que consiste en sepsis (y trastornos asociados), TPOC, artritis reumatoide, nefritis lúpica y esclerosis múltiple.

Los métodos de tratamiento incluyen, en general, la administración a un paciente de una cantidad eficaz de uno o más compuestos proporcionados en el presente documento. Los pacientes adecuados incluyen aquellos pacientes que padecen o son susceptibles a (es decir, tratamiento profiláctico) un trastorno o enfermedad identificado en el presente documento. Los pacientes típicos para el tratamiento según se describe en el presente documento incluyen mamíferos, particularmente primates, en especial seres humanos. Otros pacientes adecuados incluyen animales de compañía domesticados, tales como p. ej. un perro, gato o caballo, o ganado, tales como, p.ej. res, cerdo u oveja.

En general, los métodos de tratamiento comprenden administrar a un paciente una cantidad eficaz de uno o más compuestos proporcionados en el presente documento. El(los) compuesto(s) de la invención se administra(n) preferentemente a un paciente (p. ej., un ser humano) por vía oral o tópica. La cantidad eficaz puede ser una cantidad suficiente para modular la actividad del receptor C5a y/o una cantidad suficiente para reducir o aliviar los síntomas presentados por el paciente. Preferentemente, la cantidad administrada es suficiente para producir una concentración en plasma del compuesto (o su metabolito activo, si el compuesto es un profármaco) lo suficientemente elevada como para inhibir de forma detectable la quimiotaxis de los glóbulos blancos (p. ej., neutrófilos) *in vitro*. Los regímenes de tratamiento pueden variar en función del compuesto utilizado y la afección particular a tratar; para el tratamiento de la mayoría de los trastornos, resulta preferente una frecuencia de administración de 4 veces al día o menos. En general,

resulta más preferente un régimen de dosificación de 2 veces al día, siendo particularmente preferente una dosificación una vez al día. Se entenderá, sin embargo, que el nivel de dosis específica y régimen de tratamiento para cualquier paciente particular dependerá de diversos factores incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, edad, peso corporal, salud general, sexo, dieta, tiempo de administración, vía de administración, velocidad de excreción, combinación de fármacos (es decir, otros fármacos que se administran al paciente) y gravedad de la enfermedad particular sometida a terapia, así como el juicio del médico que prescribe. En general, resulta preferente el uso de la dosis mínima suficiente para proporcionar una terapia eficaz. Los pacientes pueden controlarse en general para la eficacia terapéutica utilizando criterios médicos o veterinarios adecuados para la afección a tratar o prevenir.

Los niveles de dosificación del orden de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 140 mg por kilogramo de peso corporal al día resultan útiles en el tratamiento o prevención de las condiciones que implican la actividad patogénica de C5a (aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 7 g por paciente humano al día). La cantidad de principio activo que puede combinarse con los materiales transportadores para producir una forma de dosificación única variará en función del huésped tratado y el modo particular de administración. Las formas de dosificación unitaria contendrán generalmente entre aproximadamente 1 mg a aproximadamente 500 mg de un principio activo. Para los compuestos administrados por vía oral, transdérmica, intravenosa, o subcutánea, se prefiere que la cantidad suficiente del compuesto que se va a administrar alcance una concentración en suero de 5 ng (nanogramos)/ml-10 µg (microgramos)/ml suero, más preferentemente ha de administrarse un compuesto suficiente para alcanzar una concentración en suero de 20 ng-1 µg/ml suero, más preferentemente ha de administrase un compuesto suficiente para alcanzar una concentración en suero de 50 ng/ml-200 ng/ml suero. Para la inyección directa en el sinovio (para el tratamiento de la artritis) han de administrarse compuestos suficientes para alcanzar una concentración local de aproximadamente 1 micromolar.

La frecuencia de dosificación también puede variar en función del compuesto utilizado y enfermedad particular tratada. No obstante, para el tratamiento de la mayoría de los trastornos, resulta preferente un régimen de dosificación de 4 veces al día, tres veces al día, o menos, siendo particularmente preferente un régimen de dosificación de una vez al día o 2 veces al día. Sin embargo, se entenderá que el nivel de dosis específica para cualquier paciente particular dependerá de varios factores incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, edad, peso corporal, salud general, sexo, dieta, tiempo de administración, vía de administración, y velocidad de excreción, combinación de fármacos (es decir, otros fármacos que se administran al paciente), gravedad de la enfermedad particular sometida a terapia, y otros factores, incluyendo el juicio del médico que prescribe.

Los compuestos de la invención pueden utilizarse en diferentes aplicaciones no farmacéuticas *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, los compuestos de la invención pueden marcarse y utilizarse como sondas para la detección y localización del receptor C5a (preparaciones celulares o muestras de secciones tisulares). Los compuestos de la invención también pueden emplearse como controles positivos en ensayos para la actividad del receptor C5a, es decir, como ejemplos para determinar la capacidad de un agente candidato que se une al receptor C5a, o como radiotrazadores para tomografía por emisión de positrones (TEP) o para tomografía computarizada por emisión de fotón único (TCEFU). Dichos métodos pueden utilizarse para caracterizar los receptores C5a en sujetos vivos. Por ejemplo, un modulador del receptor C5a puede marcarse empleando cualquiera de las técnicas diferentes conocidas adecuadamente (p. ej., radiomarcado con un radionúclido, tal como tritio), e incubarse con una muestra durante un periodo de incubación adecuado (p. ej., se determina ensayando en primer lugar una duración de unión). Tras la incubación, se elimina el compuesto no unido (p. ej., por lavado), y el compuesto unido detectado utiliza cualquier método adecuado para el marcador empleado (p. ej., puede utilizarse autorradiografía o recuento de centelleo para compuestos radiomarcados; métodos espectroscópicos para detectar grupos luminiscentes y grupos fluorescentes). Como control, una muestra concorde que contiene un compuesto marcado y una mayor cantidad (p. ej. mayor a 10 veces) de compuesto no marcado puede procesarse de la misma manera. Una mayor cantidad de marcador detectable restante en la muestra del ensayo que en el control indica la presencia del receptor C5a en la muestra. Los ensayos de detección, incluyendo la autorradiografía en el receptor (mapeo del receptor) del receptor C5a en las células cultivadas o en muestras tisulares pueden realizarse como se describe por Kuhar en las secciones 8.1.1 a 8.1.9 de *Current Protocols in Pharmacology* (1998) John Wiley & Sons, Nueva York.

Los compuestos proporcionados en el presente documento pueden utilizarse igualmente en diversos métodos de separación celular adecuadamente conocidos. Por ejemplo, los moduladores pueden unirse a la superficie interior de una placa de cultivo tisular u otro soporte, para su uso como ligandos de afinidad para la inmovilización y por lo tanto aislamiento de los receptores C5a (p. ej., aislamiento de las células que expresan el receptor) *in vitro*. En una aplicación preferente, un modulador vinculado a un marcador fluorescente, tal como fluoresceína, se pone en contacto con las células, que se analizan pues (o aíslan) por clasificación celular activada por fluorescencia (CCAF).

En la Figura 1, se proporcionan las estructuras y la actividad para los compuestos representativos descritos en el presente documento. La actividad se proporciona de la siguiente manera para el ensayo de unión descrito en el presente documento: +, 500 nM < CI_{50} < 2.000 nM; ++, 50 nM < CI_{50} < 500 nM; +++, 5 nM < CI_{50} < 50 nM; y ++++, CI_{50} < 5 nM.

V. Ejemplos

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar, pero no limitan la invención reivindicada.

Los reactivos y los disolventes usados a continuación pueden obtenerse a partir de fuentes comerciales, tales como Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, Wisconsin, Estados Unidos). Los espectros RMN ^{1}H se registraron en un espectrómetro RMN Varian Mercury de 400 MHz. Se proporcionan picos significativos con relación a TEM y se tabulan en el orden: multiplicidad (s, singlete; d, doblete; t, triplete; c, cuarteto; m, multiplete) y número de protones. Los resultados de la espectrometría de masa se informan como la relación de la masa sobre la carga, seguido de la abundancia relativa de cada ion (entre paréntesis). En los ejemplos, un único valor m/e se informa para el ion M+H (o, como se indica, M-H) que contiene los isótopos atómicos más comunes. Los patrones de isótopos corresponden a la fórmula esperada en todos los casos. El análisis de espectroscopia de masa por ionización por electronebulización (IEN) se realizó en un espectrómetro de masa de electronebulización Hewlett-Packard EMD usando el HP1100 HPLC para entregar la muestra. Normalmente, el analito se disolvió en metanol a 0,1 mg/ml y se infundió 1 microlitro con el disolvente entregado en el espectrómetro de masa, que efectuó barridos entre 100 a 1500 dalton. Todos los isótopos podrían analizarse en el modo IEN positivo, usando acetonitrilo/agua con ácido fórmico al 1 % como el disolvente de entrega. Los compuestos proporcionados a continuación también podrían analizarse en el modo IEN negativo, usando NH_4OAc 2 mM en acetonitrilo/agua como sistema de entrega.

Las siguientes abreviaturas se usan en los Ejemplos y a lo largo de toda la descripción de la invención:

EtOH: Etanol
EtONa: Etóxido sódico
THF: Tetrahidrofurano
TLC: Cromatografía de capa fina
MeOH: Metanol

Los compuestos dentro del alcance de esta invención pueden sintetizarse como se describe a continuación, usando una variedad de reacciones conocidas por los expertos. Un experto en la técnica reconocerá que los métodos alternativos pueden emplearse para sintetizar los compuestos diana de esta invención, y que los enfoques descritos dentro del cuerpo de este documento no son exhaustivos, pero proporcionan rutas ampliamente aplicables y prácticas para los compuestos de interés.

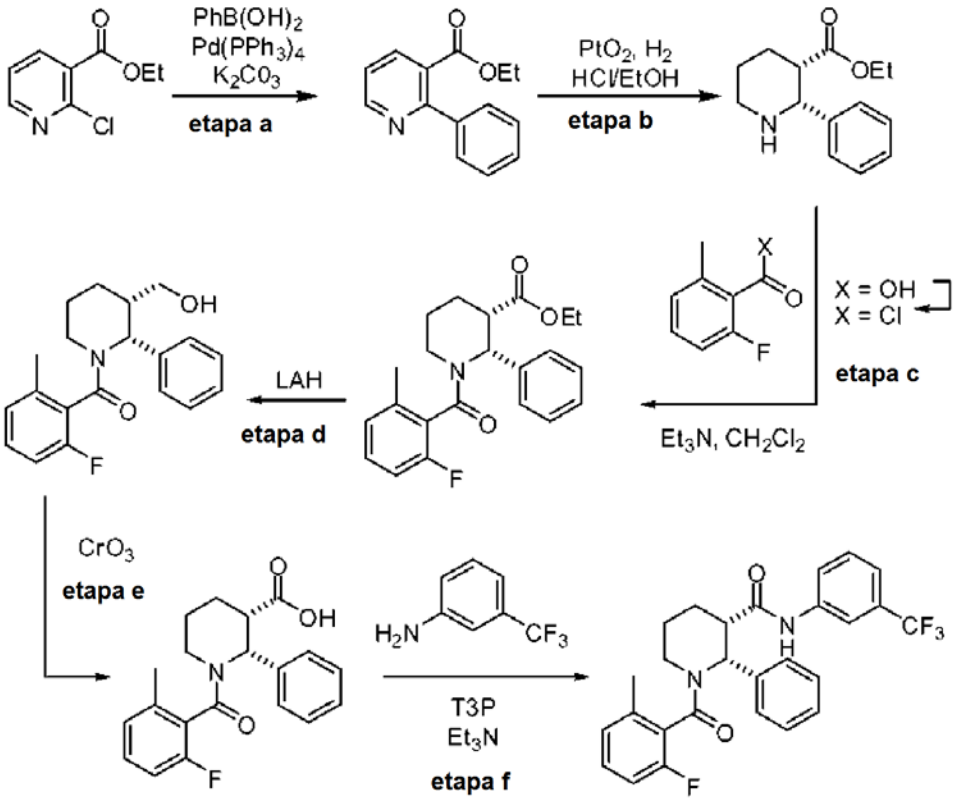
Determinadas moléculas reivindicadas en esta patente pueden existir en diferentes formas enantioméricas y diastereoméricas y se reivindican tales todas variantes de estos compuestos.

La descripción detallada de los procedimientos experimentales usados para sintetizar los compuestos clave en este texto conduce a moléculas que se describen mediante los datos físicos que identifican a los mismos, así como representaciones estructurales asociadas a ellos.

Los expertos en la materia reconocerán que durante los procedimientos de tratamiento estándar en química orgánica, se usan frecuentemente ácidos y bases. Algunas veces se producen sales de los compuestos precursores, si poseen la necesaria acidez o basicidad intrínseca, durante los procedimientos experimentales descritos dentro de esta patente.

Ejemplo de referencia 1

Síntesis de (3-trifluorometilfenil)amida del ácido *cis*-1-(2-fluoro-6-metilbenzoil)-2-fenilpiperidin-3-carboxílico



a) Se añadió $Pd(PPh_3)_4$ (3,0 g, 2,6 mmol) a una solución de 2-cloro-3-carboxietilpiridina (25 g, 134,7 mmol), ácido fenilborónico (21,04 g, 172,6 mmol) y K_2CO_3 (55,1 g, 399 mmol) en 1,4-dioxano (200 ml) y agua (200 ml). La mezcla de reacción se calentó a 100 ºC durante 2 h. Después, la solución se enfrió a temperatura ambiente y el dioxano se retiró a presión reducida. la fase acuosa resultante se extrajo con acetato de etilo, y las fases orgánicas combinadas se secaron (Na_2SO_4), se filtraron a través de celite y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (SiO_2, EtOAc al 10 -100 %/hexanos) para conseguir el derivado de 2-fenilpiridina en un rendimiento del 91 % (27,98 g). CL-EM T_r (tiempo de retención): 2,45 min, EM: (ES) m/z 228 ($M+H^+$).

b) Se añadió PtO_2 (800 mg, 3,52 mmol) a una solución de éster etílico del ácido 2-fenil-nicotínico (20 g, 88 mmol, preparado en la etapa a anterior) en EtOH (60 ml) y HCl concentrado (15 ml). La mezcla de reacción se hidrogenó usando un agitador Parr a 0,28-0,31 MPa (40-45 psi), durante 1 h. Después, la mezcla de reacción se filtró a través de celite, se lavó con EtOH y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se diluyó con CH_2Cl_2 y se lavó con $NaHCO_3$ saturado. La purificación por cromatografía ultrarrápida (SiO_2, Me OH al 0-20 %/CH_2Cl_2) dio el producto deseado en un rendimiento del 85 % (17,4 g). CL-EM T_r (tiempo de retención): 1,73 min, EM: (ES) *m/z* 234 ($M+H^+$).

c) Se añadió cloruro de oxalilo (3,2 ml, 30,75 mmol) a la solución de ácido 2-fluoro-6-metilbenzoico (3,79 g, 24,6 mmol) en CH_2Cl_2 (20 ml) en un frasco de reacción a temperatura ambiente, seguido de la adición de una cantidad catalítica de DMF. La reacción se mantuvo agitando durante 2 h a temperatura ambiente. El disolvente y el cloruro de oxalilo en exceso se retiraron al vacío y el residuo se secó a alto vacío durante 20 min. El cloruro de ácido resultante se disolvió en CH_2Cl_2 secó (20 ml) y se enfrió a 0 ºC seguido de la adición de la piperidina fabricada en la etapa b (5,56 g, 20,5 mmol) y Et_3N (8,6 ml, 61,5 mmol). Después, la mezcla se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante una noche. La mezcla de reacción se diluyó con CH_2Cl_2 y se añadió agua. Las fases se separaron y la fase acuosa se extrajo con CH_2Cl_2. Las fases orgánicas combinadas se secaron ($MgSO_4$) y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (SiO_2, EtOAc al 10-35 %/hexanos) para dar 7,47 g del compuesto deseado (rendimiento del 99 %). CL-EM T_r (tiempo de retención): 2,50 min y 2,58 min (dos rotámeros), EM: (ES) *m/z* 370 ($M+H^+$).

d) Se añadió una solución de hidruro de litio y aluminio (2,0 M en THF, 8,2 ml, 16,4 mmol) a una solución del éster de la etapa c (2,98 g, 8,06 mmol) en THF (100 ml) a 0 ºC. La solución resultante se mantuvo en agitación a 0 ºC

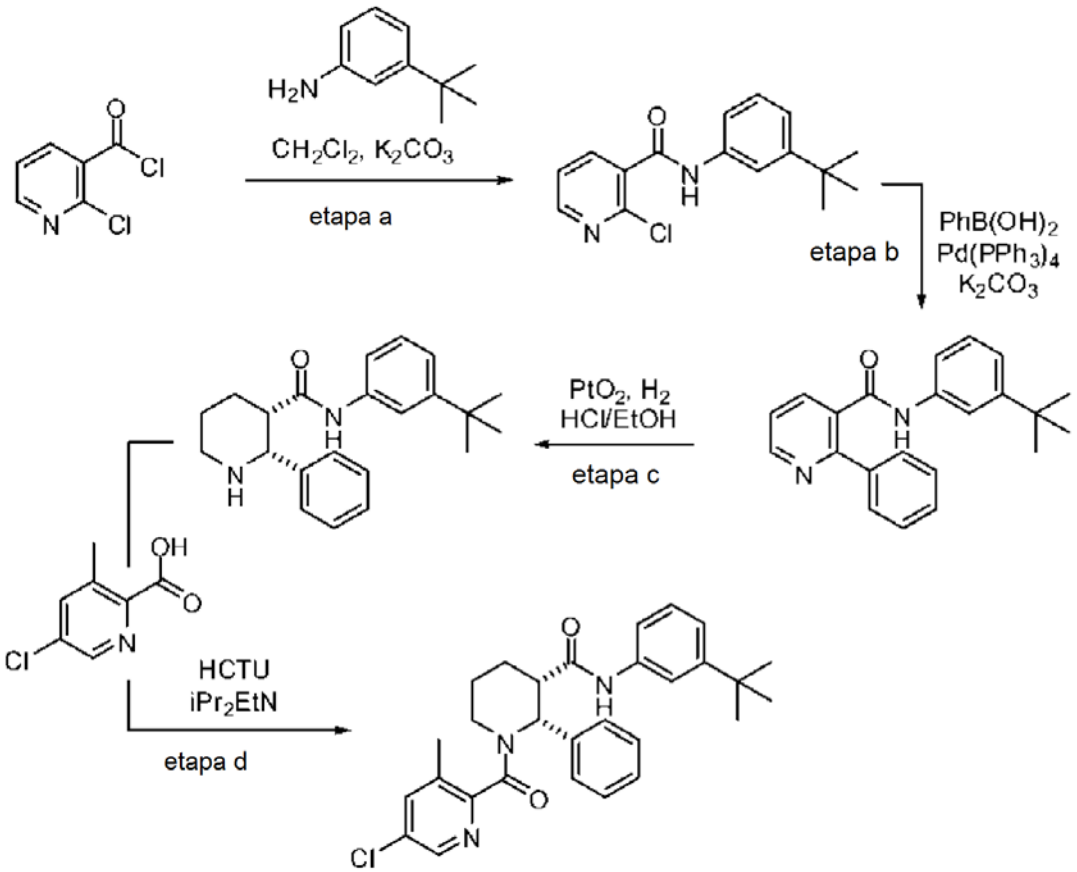
durante 2 h tiempo en el cual la reacción se completó. Se añadió gota a gota NaOH acuoso al 15 % (625 µl) para detener la reacción seguido de H_2O (625 µl). A la mezcla coloidal turbia se le añadió agua adicional (1,85 ml), y la mezcla se mantuvo en agitación durante 1 h a ta. Después, la mezcla se filtró a través de un lecho de celite y el filtrado se concentró a presión reducida. La purificación por cromatografía ultrarrápida (SiO_2, EtOAc al 33-67 %/hexanos) dio 2,46 g del producto deseado (rendimiento del 93 %). CL-EM: T_r (tiempo de retención): 1,90 min y 2,09 min (dos rotámeros), EM: (ES) *m/z* 328 ($M+H^+$).

e) Una solución del alcohol de la etapa d (1,42 g, 4,33 mmol,) en ácido acético (65 ml) se añadió a una suspensión de CrO_3 (2,61 g, 26,1 mmol) en H_2O (16 ml) a temperatura ambiente. La mezcla resultante se mantuvo en agitación a temperatura ambiente hasta que la reacción se completó (90 min). La mezcla se filtró a través de un lecho de Celite y el filtrado se concentró a presión reducida. La purificación por cromatografía ultrarrápida (SiO_2, CH_2Cl_2:MeOH al 3-10 % seguido de EtOAc al 50-67 %/hexanos) dio 1,03 g del producto deseado (rendimiento del 70 %). CL-EM: T_r (tiempo de retención): 1,88 min y 2,12 min (dos rotámeros), EM: (ES) *m/z* 342 ($M+H^+$).

f) Se añadió 3-trifluorometilanilina (16,2 mg, 0,1 mmol, 1,0 equiv.) a una solución del ácido preparado anteriormente (34,2 mg, 0,1 mmol) y trietilamina (6 equiv.) en CH_2Cl_2 (1 ml). Después, se añadió lentamente T3P (95,5 mg, 0,15 mmol) y la solución se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 1,5 h. La mezcla de reacción se diluyó con CH_2Cl_2 (1 ml), se lavó con HCL acuoso 1 N seguido de $NaHCO_3$ acuoso saturado. La fase orgánica se separó, se secó $MgSO_4$ anhidro y se concentró a presión reducida La purificación por cromatografía ultrarrápida (SiO_2, EtOAc al 5-40 %/hexanos) dio 35 mg (rendimiento del 73 %) del producto en forma de un sólido de color blanco. RMN ^1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 1,22-2,45 (m, 8 H), 2,93-3,32 (m, 3 H), 6,77-7,82 (m, 12 H), 9,10 (s, 0,38 H), 9,30 (s, 0,62 H). CL-EM: T_r (tiempo de retención) = 2,88 min, EM: (ES) *m/z* 485 ($M+H^+$).

Ejemplo de referencia 2

Síntesis de *N*-(3-*terc*-butilfenil)-1-(5-cloro-3-metilpicolmoil)-2-fenilpiperidin-3-carboxamida



a) Se añadió cloruro de 2-cloronicotinoílo (1,05 equiv.) disuelto en diclorometano anhidro (0,5 M) a una solución de 3-*terc*-butilanilina (1 equiv.) y K_2CO_3 ac. 2 M (2,2 equiv.) en diclorometano anhidro (0,5 M) a 0 ºC durante un periodo de 30 min, y la mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante un adicional de 1,5 h. Las fases se separaron y la fase acuosa se extrajo con diclorometano. La fase orgánica combinada se lavó con salmuera, se secó ($MgSO_4$), se filtró y se concentró para dar la amida deseada en forma de un sólido espumoso que se usó como tal en la siguiente etapa sin purificación adicional. EM: (ES) *m/z* 289,1 ($M+H^+$).

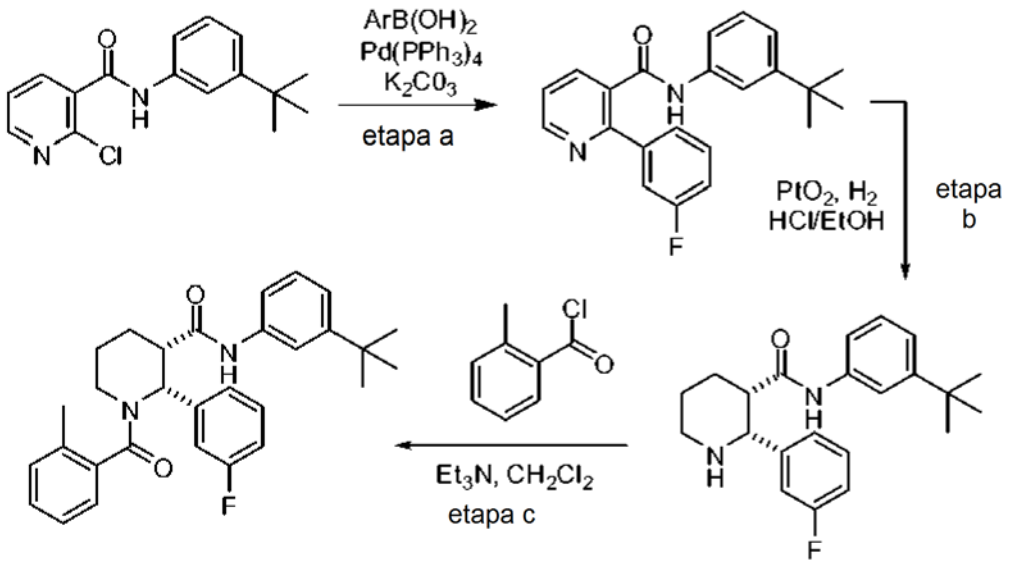
b) Se añadió $Pd(PPh_3)_4$ (2-5 mol%) a una solución de la piridin amida anterior (1 equiv.), ácido fenilborónico (1,4 equiv.) y K_2CO_3 ac. 2 M (2,4 equiv.) en tolueno (0,7 M) y la mezcla de reacción se calentó a 100 ºC durante una noche (~12 h). Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se filtró a través de celite y el lecho de celite se lavó con EtOAc. El filtrado se diluyó con agua y se extrajo con EtOAc, se secó ($MgSO_4$), se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida automática (SiO_2, gradiente del 10 % al 100 % de EtOAc-hexanos) y se secó al vacío para dar la 2-fenil-3-carboxiamidapiridina en un rendimiento del 60-75 %, EM: (ES) *m/z* 331,2 ($M+H^+$).

c) Se añadió PtO_2 (10 mol%) a una solución del derivado de 2-fenilpiridina preparado anteriormente (1 equiv.) en EtOH y HCl concentrado (en exceso, relación 4:1) y la mezcla de reacción se hidrogenó usando un agitador Parr a 0,28-0,31 MPa (40-45 psi), durante 1,5 h. Se filtró a través de celite, se lavó con EtOH y el filtrado se concentró. El residuo se diluyó con CH_2Cl_2 y se lavó con $NaHCO_3$ ac. saturado. Después, el residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida automática (SiO_2, gradiente del 1 % al 30 % de CH_2Cl_2-MeOH) y se secó al vacío para dar el compuesto del título en un rendimiento de ~85 % en forma de un sólido espumoso. EM: (ES) *m/z* 337,2 ($M+H^+$).

d) Se disolvieron ácido 5-cloro-3-metilpicolínico (30 mg, 0,16 mmol) y *N*-(3-*terc*-butilfenil)-2-fenilpiperidin-3-carboxamida (50 mg, 0,15 mmol), preparada en la etapa c anterior) en DMF anhidra (1 ml). Se añadió *N,N*-diisopropiletilamina (0,15 ml) a temperatura ambiente seguido de HCTU (67 mg, 0,16 mmol). Después de agitar 2 h a temperatura ambiente, la CL-EM y TLC indicaba la finalización de la reacción. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc (50 ml) y se lavó con HCl 1 N (20 ml), $NaHCO_3$ saturado (30 ml) y salmuera (30 ml) y la solución resultante se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por HPLC preparativa (gradiente del 20 → 95 % de MeCN-H_2O con TFA al 0,1 %) y las fracciones puras se liofilizaron para proporcionar el compuesto del título (50 mg, rendimiento del 67 %). HPLC tiempo de retención = 2,88 minutos. RMN ^1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8,42 (d, 1 H, J = 0,8 Hz), 7,97 (a, 1 H), 7,59 (d, 1 H, J = 0,8 Hz), 7,56 (d, 1 H, J = 7,6 Hz), 7,34 (m, 3 H), 7,20 (m, 3 H), 7,10 (d, 1 H, J = 7,6 Hz), 6,61 (dos conjuntos de a, 1 H), 3,12 (dos conjuntos de m, 2 H), 2,94 (tres conjuntos de m, 1 H), 2,36 (s, 3 H), 2,20 (dos conjuntos de a, 2 H), 1,74 (complejo a, 2 H), 1,29 (s, 9 H). EM: (ES) m/z 490,2 (M+ H+).

Ejemplo de referencia 3

Síntesis de (3-*terc*-butilfenil)amida del ácido *cis*-1-(2-metilbenzoil)-2-(3-fluorofenil)piperidin-3-carboxílico



a) A una mezcla de N-(3-*terc*-butilfenil)-2-cloronicotinamida (570,2 mg, 2 mmol), ácido 3-fluorofenilborónico (401,2 mg, 2,8 mmol), 3 ml de tolueno y 1 ml de carbonato potásico 2 N en agua se añadió *tetraquis*(trifenilfosfina)paladio (0) (234,5 mg, 0,2 mmol). Después, la mezcla se calentó a 90 ºC durante 3 horas en atmósfera de nitrógeno, antes se enfrió hasta una temperatura ambiente. Después, la mezcla de reacción se diluyó con 30 ml de agua y 150 ml de EtOAc. La fase orgánica se separó, se lavó con salmuera y se secó (Na_2SO_4). El disolvente orgánico se retiró a presión reducida y el residuo se purificó por columna sobre gel de sílice (EtOAc al 40 % en hexano) para dar N-(3- *terc*-butilfenil)-2-(3-fluorofenil)nicotinamida (691,4 mg, 99 %). EM: (ES) *m/z* 394,5 ($M+H^+$).

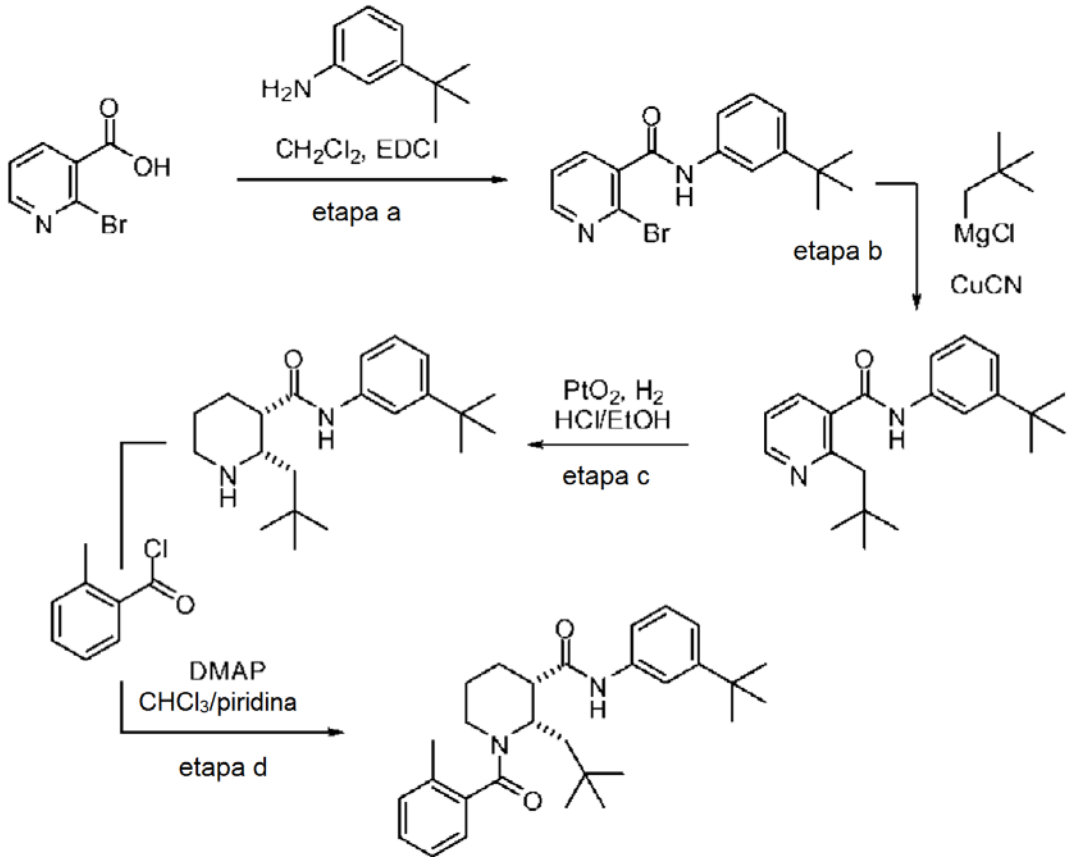
b) Una mezcla de N-(3-*terc*-butilfenil)-2-(3-fluorofenil)nicotinamida (501,2 mg, 1,4 mmol), óxido de platino (51,9 mg, 0,21 mmol) y HCl concentrado (400 µl, 5,2 mmol) en 5 ml de etanol se agitó vigorosamente en un globo de

hidrógeno durante una noche. La mezcla se filtró y los sólidos se lavaron con 25 ml de metanol tres veces. La solución combinada se secó a presión reducida. Al residuo se le añadieron 30 ml de bicarbonato sódico saturado y 150 ml de EtOAc. La fase orgánica se separó y se secó sobre sulfato sódico. la evaporación del disolvente dio la (3-*terc*-butilfenil)amida del ácido 2-(3-fluorofenil)piperidin-3-carboxílico en forma de un sólido de color pardo, que se recogió directamente para la siguiente etapa. EM: (ES) *m/z* 355,7 ($M+H^+$).

c) A una solución de (3-*terc*-butilfenil)amida del ácido 2-(3-fluorofenil)piperidin-3-carboxílico (preparada anteriormente, 177. 3 mg, 0,5 mmol) en 2 ml de diclorometano se le añadieron Et_3N (100 µl, en exceso) y cloruro de 2-metilbenzoílo (92,3 mg, 0,6 mmol) a temperatura ambiente. Después, la solución resultante se agitó a esta temperatura hasta la finalización de la reacción (10 min.). Después, la mezcla de reacción se cargó directamente en una columna sobre gel de sílice y se purificó por usando ISCO (EtOAc al 30 % en hexano) para dar el producto final (3-*terc*-butilfenil)amida del ácido 2-(3-fluorofenil)-1-(2-metilbenzoil)piperidin-3-carboxílico (151,2 mg, rendimiento del 64 %). RMN ^1H (400 MHZ, $CDCl_3$, mezcla de rotómeros): δ 7,91 (s, 0,6 H), 7,85 (s, 0,4 H), 7,18-7,46 (m, 9 H), 7,11 (m, 1 H), 6,95 (m, 1 H), 6,67 (d, J = 1,2 Hz, 1 H), 3,36 (d, *J* = 1,6 Hz, 0,4H), 3,26 (d, *J* = 1,6 Hz, 1 H), 3,05 (m, 1 H), 2,89 (t, J = 1,2 Hz, 1 H), 2,45 (s, 1 H), 2,02-2,40 (m, 4 H), 1,70-1,84 (m, 3 H), 1,44-1,64 (s, 1 H), 1,32 (s, 6 H), 1,25 (s, 1 H). EM: (ES) *m/z* 473,2 ($M+H^+$).

Ejemplo de referencia 4

Síntesis de (3-*terc*-butilfenil)amida del ácido *cis*-1-(2-metilbenzoil)-2-(2,2-dimetilpropil)piperidin-3-carboxílico



a) A una solución en agitación de ácido 2-bromonicotínico (1,01 g, 5 mmol) disuelta en diclorometano anhidro (8 ml) se le añadieron EDCI (1,34 g, 7 mmol) y 3-*terc*-butilanilina (0,74 g, 5 mmol) a temperatura ambiente y la mezcla de reacción se agitó durante 12 horas. Después, la mezcla se diluyó con diclorometano, seguido de bicarbonato sódico saturado y se lavó con agua. La capa de diclorometano se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida para obtener 2-bromo-N(3- *terc*-butilfenil)nicotinamida en un rendimiento del 59 % (950 mg). T_r: 2,44 min (20-100-5 método). EM: (ES) *m/z* 333, 335 ($M+H^+$).

b) Se añadió cloruro de 2,2-dimetilpropilmagnesio (1 M-dietiléter, 4,8 ml, 4,8 mmol) a una suspensión de cianuro de cobre (215 mg, 2,40 mmol) en THF (6 ml) a -78 ºC. Después de agitar a la misma temperatura durante 1 hora, se añadió 2- bromo-N-(3-*terc*-butilfenil)nicotinamida (200 mg, 0,601 mmol) todo de una vez en forma de un sólido. La mezcla de reacción se calentó gradualmente a temperatura ambiente y la reacción se dejó en agitación durante

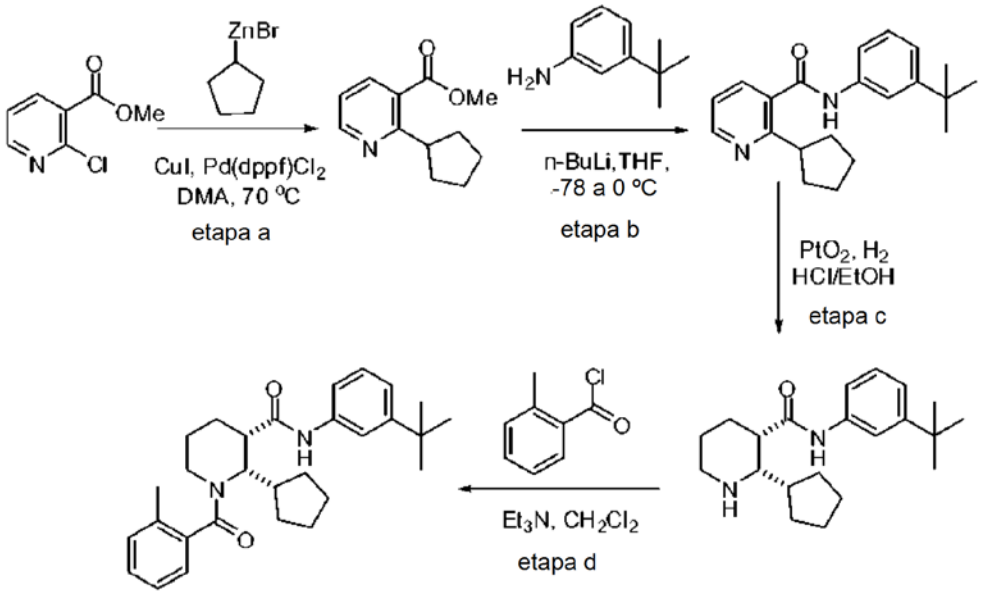
una noche. Se añadió una solución de cloruro de amonio saturado y acetato de etilo, y la mezcla de reacción se filtró a través de celite y se aclaró con acetato de etilo. Las fases se separaron y el producto se extrajo una vez más con acetato de etilo. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera y se secó sobre sulfato sódico anhidro. Después de retirar el disolvente a presión reducida, el material en bruto se purificó usando cromatografía en columna sobre gel de sílice usando un gradiente del 20 %-50 % de acetato de etilo en hexanos para producir N-(3-*terc*-butilfenil)-2-(2, 2-dimetilpropil)nicotinamida (168 mg, 0,517 mmol, 86 %). Fr = 0,45 (tolueno: acetato de etilo = 2:1).

c) Se disolvió N-(3-*terc*-butilfenil)-2-(2, 2-dimetilpropil)nicotinamida (168 mg, 0,517 mmol) en etanol (5 ml). Se añadió óxido de platino (11,6 mg, 0,0511 mmol) seguido de ácido clorhídrico concentrado (250 µl). La mezcla de reacción se hidrogenó usando un aparato Parr durante 1,5 horas a 0,31 MPa (45 psi). El análisis de la mezcla de reacción mostró la conversión incompleta, y la secuencia se repitió una vez más. Se retiró óxido de platino por filtración y los disolventes se retiraron a presión reducida. El material en bruto se neutralizó usando una solución saturada de bicarbonato sódico y se extrajo con acetato de etilo. Después, la fase orgánica se lavó con salmuera y se secó sobre sulfato de magnesio anhidro. La retirada del disolvente a presión reducida dio la (3-*terc*-butilfenil)amida del ácido 2, 3-*cis*-2-(2,2-dimetilpropil)piperidin-3-carboxílico (153 mg) que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

d) A una solución de (3-*terc*-butilfenil)amida del ácido 2,3-*cis*-2-(2,2-dimetilpropil)piperidin-3-carboxílico (84,8 mg, 0,257 mmol) en piridina (415 µl, 5,13 mmol) a temperatura ambiente se le añadió cloruro de 2-metilbenzoílo (81,6 mg, 0,528 mmol) en cloroformo (415 µl). Se añadió una cantidad catalítica (no pesada) de dimetilaminopiridina para mejorar la reacción y la mezcla se agitó durante tres días. Después, se añadieron acetato de etilo y agua a la mezcla de reacción y el producto se extrajo con acetato de etilo tres veces. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro. Después de la retirada del disolvente a presión reducida el material en bruto se purificó por cromatografía sobre gel de sílice usando acetato de etilo al 10 %-20 % en hexanos para dar (3-*terc*-butilfenil)amida del ácido 2,3-*cis*-2-(2,2-dimetilpropil)-1-(2-metilbenzoil)piperidin-3-carboxílico (47,0 mg, 0,105 mmol, 41 %). Fr = 0,6 (hexanos: acetato de etilo = 2:1). T_r = 3,16 min, 3,26 min. (el compuesto existe en forma de mezclas de diversos confórmeros. 20-100-5 método.). RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ 9,68 (s, 1 H), 9,43 (s, 1 H), 8,33 (s, 1 H), 8,28 (s, 1 H)), 6,97-7,79 (m, 8 H), 5,48 (a, 1 H), 5,39 (dd, J = 4, 10 Hz, 1 H), 5,33 (dd, J = 6, 6 Hz, 1 H), 3,38 (ddd, J = 4, 14, 14 Hz, 2 H), 3,25 (dd, J = 13, 13 Hz, 2H), 2,66 (dd, *J* = 4, 8,4 Hz, 1 H), 2,63 (ddd, *J* = 2,8, 2,8, 8 Hz, 1 H), 2,50 (s, 9 H), 2,40 (s, 9 H), 2,25 (s, 9 H), 2,13 (s, 9 H), 1,79-1,99 (m, 2 H), 1,23-1,56 (m, 2 H), 1,32 (s, 9 H), 1,07 (s, 9 H), 1,06 (s, 9 H), 0,97 (s, 9 H), 0,95 (s, 9 H). EM: (ES) m/z 449 ($M+H^+$).

Ejemplo de referencia 5

Síntesis de (3-*terc*-butilfenil)amida del ácido *cis*-2-ciclopentil-1-(2-metilbenzoil)piperidin-3-carboxílico



a) Se añadió cloruro de ciclopentilcinc (0,5 M, 6,5 ml, 3,26 mmol) a temperatura ambiente a una solución en agitación del éster metílico del ácido 2-cloronicotínico (400 mg, 2,33 mmol), CuI (19 mg, 0,1 mmol) y $Pd(dppf)Cl_2$ (42 mg, 0,06 mmol) en dimetilacetamida anhidro (1,7 ml) en atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se calentó a 70 ºC durante 3,5 horas, se enfrió a temperatura ambiente, se filtró a través de celite y la torta se aclaró con acetato de etilo. El filtrado se lavó con agua y salmuera, se secó ($MgSO_4$), se filtró y se concentró a presión

reducida. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (SiO_2, EtOAc al 10-100 %/hexanos) para conseguir el compuesto deseado en un rendimiento del 83 % (400 mg). CL-EM T_r (tiempo de retención): 1,87 min; EM: (ES) *m/z* 206 ($M+H^+$).

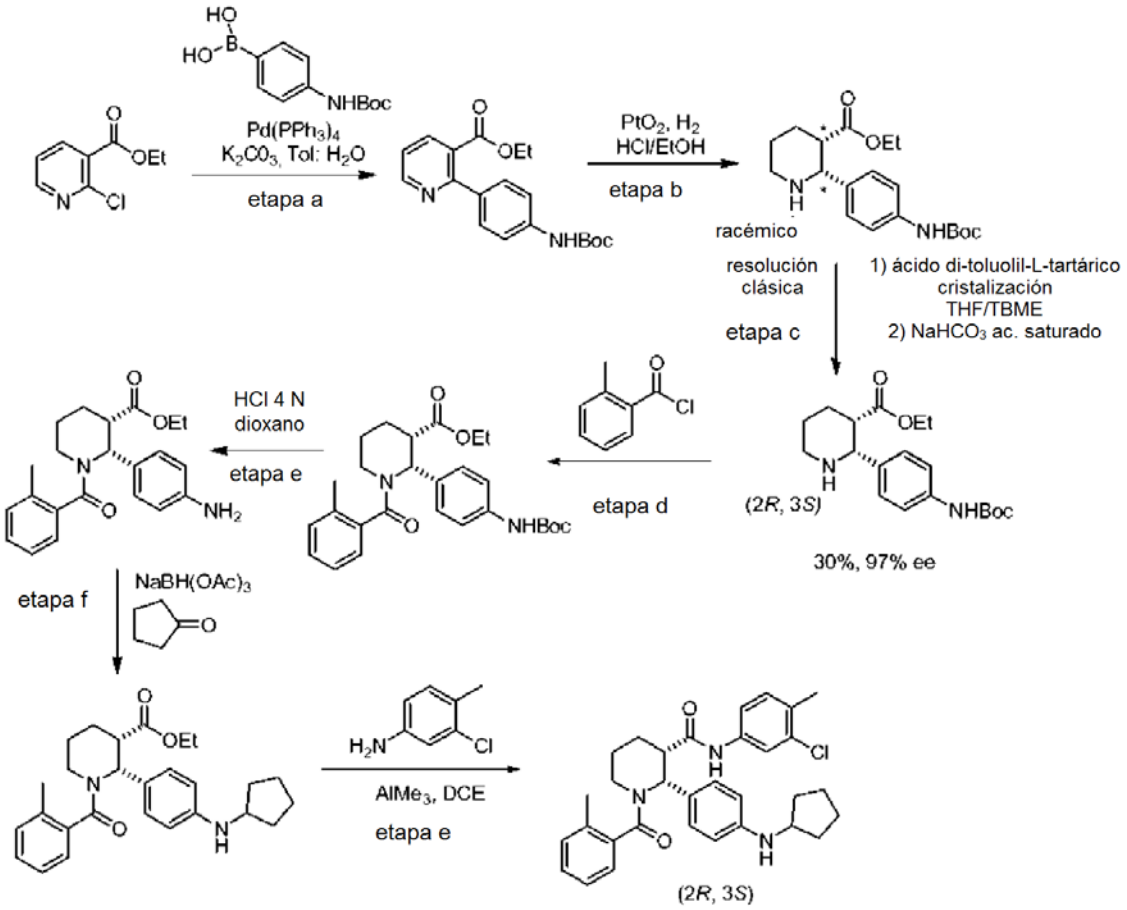
b) Se añadió n-BuLi (1,47 ml, 3,68 mmol) a la 3-*terc*-butilanilina (580 mg, 3,89 mmol) a -78 ºC en THF seco (2 ml) en nitrógeno y la solución se dejó en agitación a 0 ºC durante 10 minutos. La mezcla de reacción se enfrió de nuevo a -78 ºC y se añadió éster metílico del ácido 2-ciclopentil-nicotínico (400 mg, 1,94 mmol) disuelto en THF seco (2 ml). La mezcla de reacción se dejó que alcanzará 0 ºC durante un periodo de 2 horas, se inactivó con NH_4Cl acuoso saturado y se extrajo con acetato de etilo. Las fases orgánicas combinadas se secaron ($MgSO_4$), se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (SiO_2, EtOAc al 10-100 %/hexanos) para dar el compuesto puro en un rendimiento del 91 % (572 mg). CL-EM T_r (tiempo de retención): 2,61 min; EM: (ES) *m/z* 323 ($M+H^+$).

c) A una solución de la *N*-(3-*terc*-butilfenil)-2-ciclopentilnicotinamida (570 mg, 1,77 mmol) en etanol (10 ml) que contienen HCl concentrado (1 ml) se le añadió óxido de platino (40 mg, 0,17 mmol) y la solución se hidrogenó usando un agitador Parr a 0,28 MPa (40 psi) durante 1,5 horas. La mezcla de reacción se filtró a través de Celite y la torta se aclaró con etanol. El filtrado se concentró y el residuo se secó a alto vacío durante 2 horas para conseguir un rendimiento cuantitativo de la piperidina deseada como una sal HCl. CL-EM T_r (tiempo de retención): 1,97 min; EM: (ES) *m/z* 329 ($M+H^+$).

d) A una solución de la (3-*terc*-butilfenil)amida del ácido *cis*-2-ciclopentilpiperidin-3-carboxílico preparada anteriormente (123 mg, 0,34 mmol) en CH_2Cl_2 seco (1 ml) que contenía Et_3N (142 µl, 1,02 mmol) se le añadió cloruro de 2-metilbenzoílo (53 mg, 0,34 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Después, la mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (20 ml), se lavó con HCl acuoso 1 N, agua y salmuera. La fase orgánica se secó ($MgSO_4$), se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por HPLC preparativa de fase inversa (gradiente al 20-95 % de CH_3CN-H_2O) y se secó (Liofilizó) para dar el compuesto del título en un rendimiento 65 % (109 mg). RMN ^1H (400 MHz, $CDCl_3$): δ 1,22-1,48 (m, 11 H), 1,56-1,80 (m, 5 H), 1,84-2,06 (m, 4 H), 2,10-2,23 (m, 1 H), 2,30 (s, 1,6 H), 2,39 (s, 1,4 H), 2,41-2,50 (m, 1 H), 2,71-2,76 (m, 1 H), 3,02-3,09 (m, 1 H), 3,25-3,39 (m, 1 H), 5,11 (sa, 1 H), 7,05-7,30 (m, 6 H), 7,47-7,55 (m, 2 H), 8,32 (sa, 1 H). CL-EM T_r (tiempo de retención): 3,16 min; EM: (ES) *m/z* 447 (M+H)+. método CL-EM: Agilent Zorbax SB-C18, 2,1x 50 mm, 5µ, 35 ºC, caudal 1 ml/min, a 2,5 min gradiente de 20 % a B al 100 % con un lavado de 1,0 min a B al 100 %; A= ácido fórmico al 0,1 %/acetonitrilo al 5 %/agua al 94,9 %, B = ácido fórmico al 0,1 %/agua al 5 %/acetonitrilo al 94,9 %.

Ejemplo de referencia 6

Síntesis de (3-cloro-4-metilfenil)amida de l ácido (2R,3S)-2-(4-ciclopentilaminofenil)-1-(2-metilbenzoil) piperidin-3-carboxílico



b) Se s intetizó éster et ílico del ácido *cis*-2-(4-*terc*-butoxicarbonilaminofenil)piperidin-3-carboxílico de manera similar a como se ilustra en el ejemplo 1.

c:1): Se di solvió éster et ílico de l ác ido *cis*-2-(4-*terc*-butoxicarbonilaminofenil)piperidin-3-carboxílico (61 g, 174,8 mmol) y ácido di-p-toluoil-L-tartárico (62 g, 174,8 mmol) en EtOH (500 ml). La solución transparente se concentró y se bombeó para secar. Disolvió, la sal de color blanco obtenida se disolvió en 250 ml de acetato de etilo para formar una solución transparente. A esta solución se le añadieron 500 ml de TBME lentamente. La solución obtenida se dejó a ta en reposo durante 3 días. En este momento se formaron un montón de cristales de color blanco. Después, se filtraron y se lavaron con 100 ml de TBME para obtener un sólido de color blanco (60 g). La sal anterior se volvió a disolver en etanol, se concentró se bombeó para secar. La sal obtenida se disolvió en 500 ml de THF, seguido de la adición de TBME (500 ml). La solución transparente obtenida se dejó a ta sin molestar durante otros 2,5 días. Los cristales de color blanco obtenido se filtraron para obtener 20,5 g (enriquecimiento 64:1) de la sal.

c:2) A una suspensión en agitación a 0 ºC de la sal (16,7 g) en CH_2Cl_2 (150 ml) se le añadió una solución acuosa saturada de $NaHCO_3$ (100 ml) y la mezcla de reacción se dejó en agitación a ta durante un periodo de 30 minutos. Las fases se separaron y la fase acuosa se extrajo con CH_2Cl_2 (50 ml). La fase orgánica combinada se lavó con $NaHCO_3$ acuoso saturado (2 x 100 ml), se secó y se concentró para dar éster etílico de l ácido (2R,3S)-2-(4-*terc*-butoxicarbonilaminofenil)piperidin-3-carboxílico en un rendimiento del 90 % y ~ en 97 % ee.

d) A una solución a 0 ºC del éster etílico del ácido (2R,3S)-2-(4-*terc*-butoxicarbonilaminofenil)-piperidin-3-carboxílico preparado anteriormente (600 mg, 1,72 mmol) en CH_2Cl_2 seco (5 ml) que contenía Et_3N (480 µl, 3,44 mmol) se le añadió cloruro de 2-metilbenzoílo (266 mg,1,72 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una noche. Después, la mezcla de reacción se diluyó con CH_2Cl_2 (20 ml), se lavó con HCl acuoso 1 N, agua y salmuera. La fase orgánica se secó ($MgSO_4$) se filtró y se concentró a presión reducida para dar éster etílico del ácido (2R,3S)-2-(4-*terc*-butoxicarbonilaminofenil)-1-(2-metilbenzoil)piperidin-3-carboxílico en rendimiento cuantitativo y el producto en bruto se usó

como tal en la siguiente etapa.

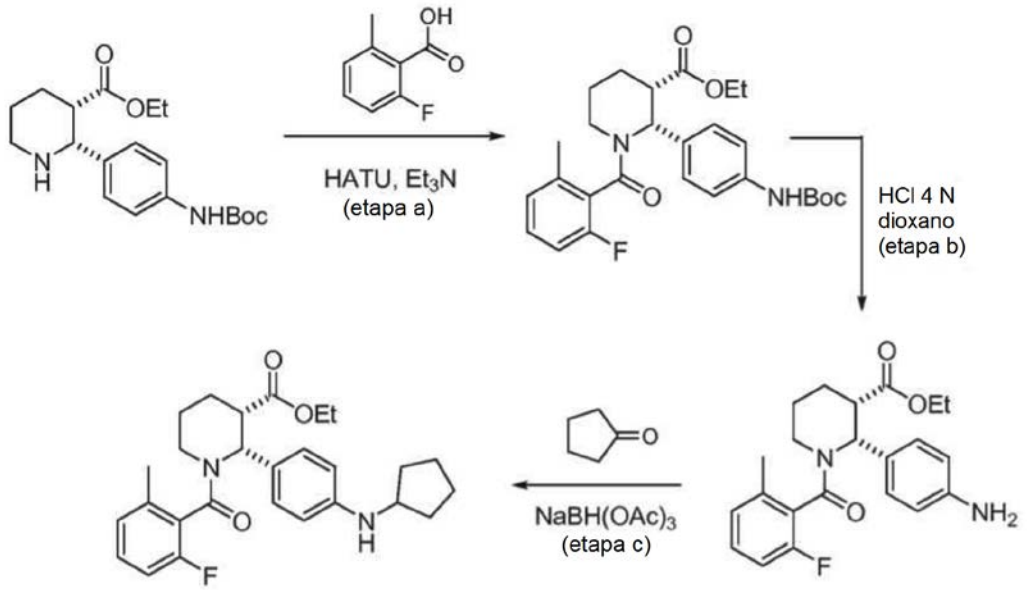
e) Se añadió lentamente HCl 4 N en 1,4-dioxano (5 ml, 20 mmol) lentamente a una solución a 0 ºC del producto en bruto anterior éster etílico del ácido (2R,3S)-2-(4-*terc*-butoxicarbonilaminofenil)-1-(2-metilbenzoil)piperidin-3-carboxílico (840 mg, 1,72 mmol) en CH_2Cl_2 seco (4 ml). Después de la adición del HCl, la mezcla de reacción se dejó que alcanzara ta y se agitó durante 1 h. Se diluyó con CH_2Cl_2 (30 ml), se enfrió a 0 ºC y se neutralizó con $NaHCO_3$ acuoso saturado para conseguir el éster etílico del ácido (2R,3S)-2-(4-aminofenil)-1-(2-metilbenzoil)piperidin-3-carboxílico (612 mg) en un rendimiento del 97 % en dos etapas.

f) Se añadió $Na(OAC)_3BH$ (495 mg, 2,33 mmol) a una solución del éster etílico del ácido (2R,3S)-2-(4-aminofenil)-1-(2-metilbenzoil)piperidin-3-carboxílico (612 mg, 1,67 mmol), ciclopentanona (140 mg, 1,67 mmol) y ácido acético (100 mg, 1,67 mmol) en dicloroetano seco a ta y la mezcla de reacción se calentó a 50 ºC durante 4 h, se enfrió a ta y se agitó durante 48 h. Después se diluyó con CH_2Cl_2 (30 ml), se lavó con una solución acuosa saturada de $NaHCO_3$, se secó y se concentró al vacío. El residuo se purificó por columna ultrarrápida ISCO usando acetato de etilo y hexanos como fase móvil (columna de 40 g, gradiente de 0-40 %) para proporcionar éster etílico de l ácido (2R,3S)-2-(4-ciclopentilaminofenil)-1-(2-metilbenzoil)piperidin-3-carboxílico (450 mg).

g) Se añadió Me_3Al (290 µl, 0,57 mmol, 2 M en tolueno) a una solución de la 3-cloro-4-metilfenilamina (65 mg, 0,46 mmol) en dicloroetano seco (1 ml) a temperatura ambiente. Se agitó durante 20 minutos, después se añadió a la misma éster etílico del ácido (2R,3S)-2-(4-ciclopentilaminofenil)-1-(2-metilbenzoil)piperidin-3-carboxílico (100 mg, 0,23 mmol) disuelto en dicloroetano seco (1 ml). Después, la mezcla de reacción se calentó a 85 ºC durante 3 h, se enfrió a ta, se diluyó con CH_2Cl_2 (20 ml), se lavó con una solución acuosa saturada de $NaHCO_3$. La fase acuosa se extrajo con CH_2Cl_2 (20 ml) y la fase orgánica combinada se secó ($MgSO_4$) y se concentró. El residuo se purificó por HPLC preparativa de fase inversa (gradiente del 20-95 % de CH_3CN-H_2O con TFA al 0,1 % como aditivo), las fracciones que contenían producto se agruparon juntas y se concentraron. El residuo se diluyó con CH_2Cl_2 (30 ml), se lavó con una solución acuosa saturada de $NaHCO_3$. La capa de CH_2Cl_2 se secó ($MgSO_4$) y se secó para conseguir la (3-cloro-4-metilfenil)amida del ácido (2R,3S)-2-(4-ciclopentilaminofenil)-1-(2-metilbenzoil)piperidin-3-carboxílico en un rendimiento del 50 %.
RMN ^1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8,4(s a, 1H), 7,55 (s, 1H), 7,37-7,05 (m, 9H), 6,55-6,52 (m, 2H), 3,77-3,70(m, 1H), 3,30-3,16 (m, 1H), 3,04-2,91 (m, 2H), 2,43-1,94 (m, 8H), 1,71-1,46 (m, 11H).

Ejemplo 7

Síntesis de (2R,3S)-2-[4-(ciclopentilamino)fenil]-1-(2-fluoro-6-metilbenzoil)piperidin-3-carboxilato de etilo.



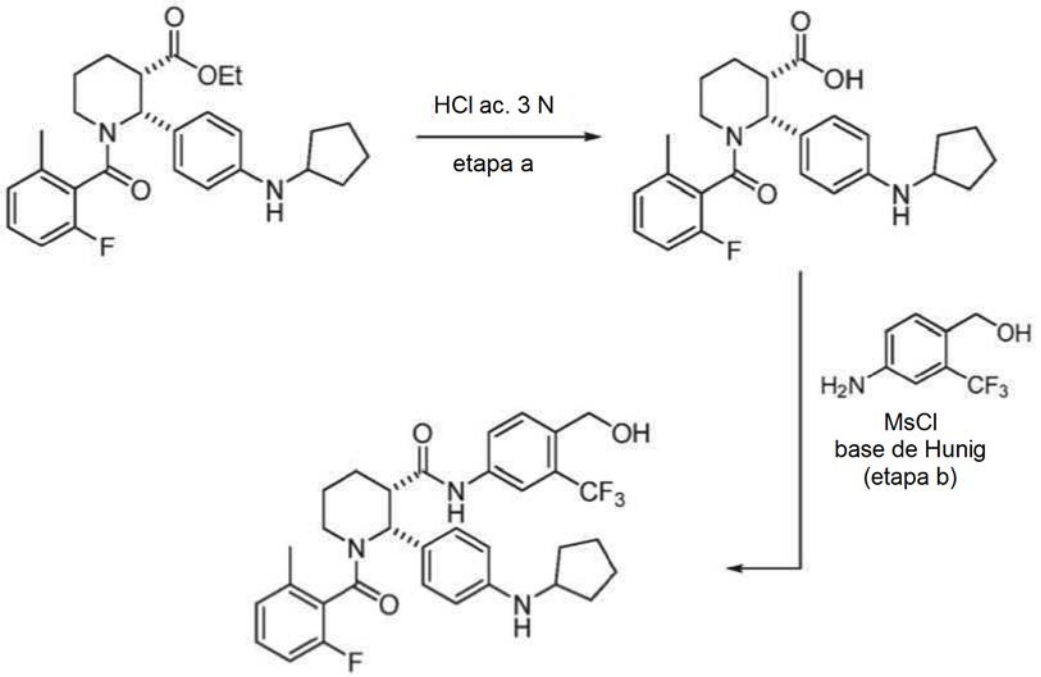
Etapa a) A una solución de éster etílico del ácido (2R,3S)-2-(4-*terc*-butoxicarbonilaminofenil)-piperidin-3-carboxílico (13,74 g, 39,36 mmol, preparado como en el documento WO 2010/075257), ácido 2-fluoro-6-metilbenzoico (6,37 g, 41,33 mmol) y Et_3N (14,4 ml, 102,3 mmol) en DMF seca (110 ml) a 0 ºC, se le añadió HATU (15,71 g, 41,33 mmol) y después, la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. Después, la mezcla de reacción se diluyó con agua, se extrajo con acetato de etilo y se lavó con salmuera. Las capas orgánicas combinadas se secaron ($MgSO_4$), se filtraron y se concentraron a presión reducida.

El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (SiO_2, acetato de etilo al 10-55 % en hexanos) para dar 19 g (100 %) d el p roducto (2R,3S)-2-[4-(*terc*-butoxicarbonilamino)fenil]-1-(2-fluoro-6-metilbenzoil)piperidin-3-carboxilato de etilo. EM: (ES) *m/z* 485 ($M+H^+$)

Etapa b) Se aña dió l entamente HCl 4 N en 1, 4-dioxano (110 ml, 440 mmol) a un a s olución d e (2R,3S)-2-[4-(*terc*-butoxicarbonilamino)fenil]-1-(2-fluoro-6-metilbenzoil)piperidin-3-carboxilato de et ilo (19 g, 39,36 mmol) anterior en CH_2Cl_2 seco (110 ml) a 0 ºC. Después de la adición de HCl, la mezcla de reacción se dejó que alcanzara ta y se agitó durante 3 h. La solución después se diluyó con acetato de etilo (200 ml), se enfrió a 0 ºC y s e n eutralizó c on N $aHCO_3$ acuoso saturado par a c onseguir (2R,3S)-2-(4-aminofenil)-1-(2-fluoro-6-metilbenzoil)piperidin-3-carboxilato de etilo (15 g, 100 %). EM: (ES) *m/z* 385 ($M+H^+$).

Etapa c) Se añadió $NaBH(OAc)_3$ (14,12 g, 66,60 mmol) a una solución de (2R,3S)-2-(4-aminofenil)-1-(2-fluoro-6-metilbenzoil)piperidin-3-carboxilato de et ilo (16 g, 41, 65 mmol) y c iclopentanona (10,51 g, 1 25 mmol) en dicloroetano seco (200 ml) a ta. La mezcla de reacción se calentó a 45 ºC durante 3 h, se enfrió a ta, se inactivó con una solución acuosa saturada de $NaHCO_3$, se extrajo con diclorometano, se secó y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (SiO_2, acetato de etilo/hexanos al 15-40 %) para proporcionar (2R,3S)-2-[4-(ciclopentilamino)fenil]-1-(2-fluoro-6-metilbenzoil)piperidin-3-carboxilato de etilo en forma de un sólido de color blanco (17 g, 90 %). EM: (ES) *m/z* 453 ($M+H^+$).

Síntesis de (2R,3S)-2-[4-(ciclopentilamino)fenil]-1-(2-fluoro-6-metilbenzoil)-*N*-[4-(hidroximetil)-3-(trifluorometil) fenil]piperidin-3-carboxamida



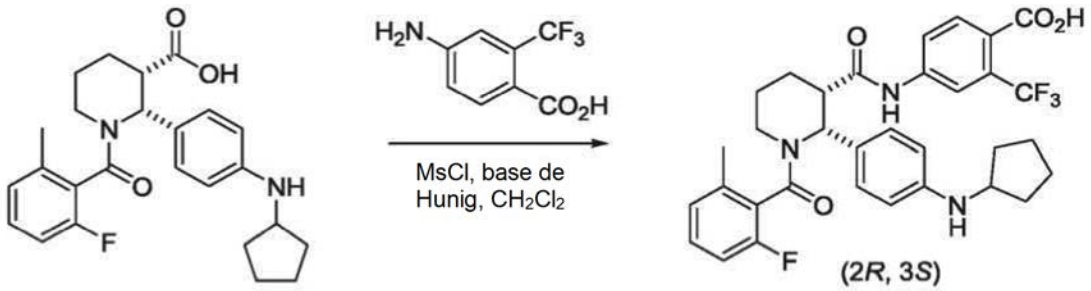
Etapa a) Se añadió (2R,3S)-2[4-(ciclopentilamino)fenil]-1-(2-fluoro-6-metilbenzoil)piperidin-3-carboxilato de etilo (2 g, 4,4 mmol) en 1,4-dioxano (9 ml) a HCl acuoso 3 N (6 ml) a temperatura ambiente y la mezcla de reacción se calentó a 80 ºC durante 15 h. Después, la solución se enfrió a 0 ºC y se neutralizó con $NaHCO_3$ acuoso saturado y se extrajo con acetato de etilo. La capa de acetato de etilo se concentró a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (SiO_2, EtOAc al 20 % en CH_2Cl_2) para conseguir el ácido deseado (1,4 g, 74 %). EM: (ES) *m/z* 425 ($M+H^+$).

Etapa b) Se añadió cloruro de metanosulfonilo (378 mg, 3,3 mmol) a una solución de ácido (2R,3S)-2-[4-(ciclopentilamino)fenil]-1-(2-fluoro-6-metil-benzoil)piperidin-3-carboxílico preparado anterormente (1,4 g, 3 ,3 mmol) y base de Hunig (586 µl, 3 ,3 mmol) en C H_2Cl_2 seco (25 ml) a 0 ºC en una at mósfera de nitrógeno. La solución s e ag itó dur ante u nos 15 minutos adicionales, d espués se añadieron s ecuencialmente [4-amino-2-(trifluorometil)fenil]metanol (631 mg, 3 ,3 mmol) y bas e d e H unig (586 µl, 3 ,3 mmol). L a m ezcla de reacción se dejó que alcanzara temperatura ambiente durante un periodo de 30 minutos. Cuando la TLC y la CLEM indicaron la finalización de la reacción, el disolvente en exceso se retiró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (SiO2, acetato de etilo al 0-20 % en diclorometano) para conseguir el compuesto deseado (1,2 g) con un rendimiento del 61 %. RMN ^1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9,50 (s a, 0,6H), 9,38 (s a, 0,4 H), 7,75-7,70 (m, 1 H), 7,50-7,33 (m, 3 H), 7,24-7,19 (m, 2 H), 7,06-6,90 (m, 2 H), 6,67- 6,55 (m, 3 H), 4,77-4,76 (m, 2

H), 3,78- 3,66 (m, 1 H), 3,32-3,00 (m, 3 H), 2,44-1,45 (m, 17 H). EM: (ES) *m/z* 598 ($M+H^+$).

Ejemplo de referencia 8

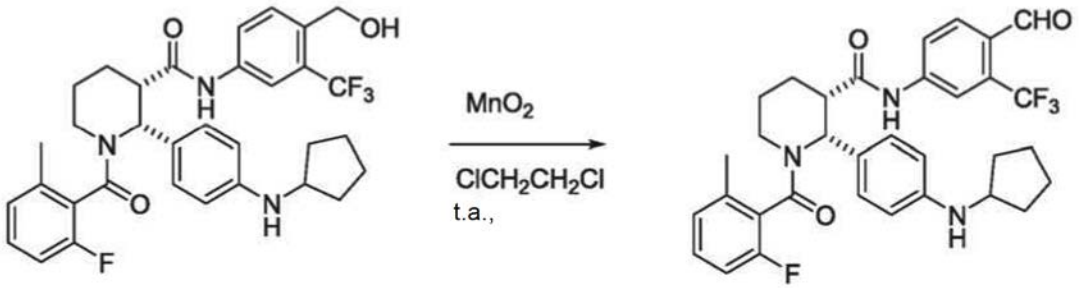
Síntesis de ácido 4-[[(2R,3S)-2-[4-(ciclopentilamino)fenil]-1-(2-fluoro-6-metilbenzoil)piperidin-3-carbonil]amino]-2-(trifluorometil)benzoico.



El compuesto del título se sintetizó de un modo similar como el ejemplo anterior: RMN ^{1}H (400 MHz, CD_3OD) δ 10,4 (a, 1 H), 8,05-7,65 (m, 4 H), 7,36-6,95 (m, 5 H), 6,50-6,47(m, 1 H), 3,92-3,94 (m, 1 H), 3,50- 3,21 (m, 3 H), 2,501,59 (m, 18 H). EM: (ES) *m/z* 612 ($M+H^+$).

Ejemplo de referencia 9

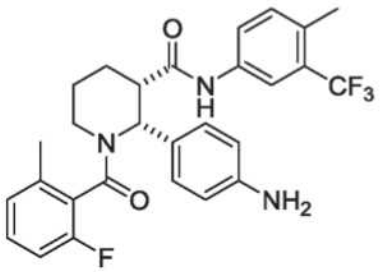
Síntesis de cis-2-[4-(ciclopentilamino)fenil]-1-(2-fluoro-6-metilbenzoil)-*N*-[4-formil-3-(trifluorometil)fenil]piperidin-3-carboxamida.



A una solución de cis-2-[4-(ciclopentilamino)fenil]-1-(2-fluoro-6-metil-benzoil)-*N*-[4-(hidroximetil)-3-(trifluorometil)fenil]piperidin-3-carboxamida (130 mg, 0,22 mmol) en 1,2-dicloroetano (2 ml) se le añadió MnO_2 (380 mg, 4,4 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó durante 3 h y después se diluyó con diclorometano, se filtró a través de un lecho de SiO_2 y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por HPLC para conseguir el compuesto deseado (como una mezcla de cenantiómeros *cis*) con un rendimiento del 31 %, 40 mg). RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 10,2 (s a, 1 H), 8,12-6,88 (m, 10 H), 3,82-3,04 (m, 4 H), 2,88-1,40 (m, 18 H). EM: (ES) *m/z* 596 ($M+H^+$).

Ejemplo de referencia 10

(2R,3S)-2-(4-aminofenil)-1-(2-fluoro-6-metilbenzoil)-*N*-[4-metil-3-(trifluorometil)fenil]piperidin-3-carboxamida.

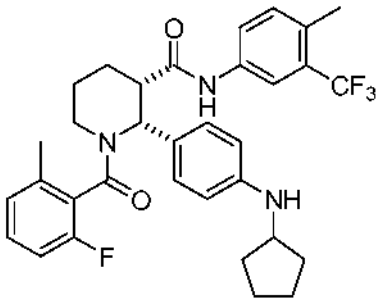


El compuesto del título se sintetizó de un modo similar como los ejemplos anteriores: RMN ^{1}H (400 MHz,$CDCl_3$) δ 9,21 (a, 0,6 H), 8,91 (a, 0,4 H), 7,67 (d, *J* = 2,2 Hz, 0,4 H), 7,60 (d, *J* = 2,2 Hz, 0,6 H), 7,51-7,47 (m, 1 H), 7,41 (d, *J* = 8,4 Hz, 1 H), 7,33 (d, *J* = 8,4 Hz, 1 H), 7,24-7,03 (m, 2 H), 6,95-6,84 (m, 2 H), 6,68 (d, *J* = 5,5 Hz, 1 H), 6,62-6,60 (m, 1 H), 3,65 (a, 2 H), 3,28-2,96 (m, 3 H), 2,44 (s, 1 H), 2,41-2,38 (m, 3 H), 2,11 (s, 3 H), 1,80-1,74 (m, 1 H), 1,70 (s, 3 H). EM: (ES) m/z 514 ($M+H^+$)

Ejemplo de referencia 11

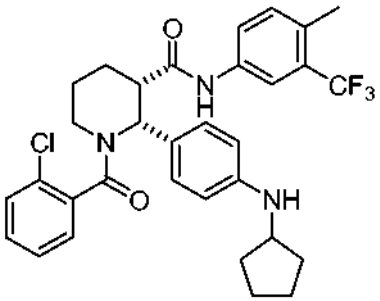
Los siguientes son compuestos representativos preparados y evaluados usando métodos similares a los de los ejemplos del presente documento. Los datos de caracterización se proporcionan para los compuestos a continuación. La evaluación biológica se muestra en la Figura 1 para estos compuestos y otros preparados como se describen en el presente documento.

(4-Metil-3-trifluorometilfenil)amida de l ácido (2R,3S)-2-(4-ciclopentilaminofenil)-1-(2-fluoro-6-metilbenzoil) piperidin-3-carboxílico



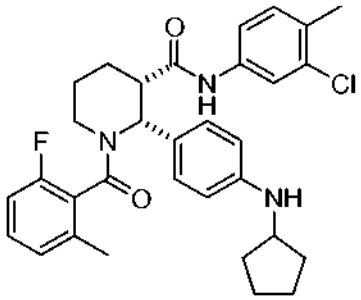
RMN ^{1}H (400 MHz, TFA-d) δ 7,91 (d, J = 8,6 Hz, 1 H), 7,84 (d, J = 8,6 Hz, 1 H), 7,58-6,82 (m, 8 H), 6,75 (t, *J* = 8,6 Hz, 1 H), 4,10-4,00 (m, 1H), 3,60-3,47 (m, 1H), 3,45-3,41 (m, 1H), 3,33-3,25 (m, 1H), 2,44-2,22 (m, 7H), 2,04-1,92 (m, 4H), 1,82-.169 (m, 7H)

(4-Metil-3-trifluorometilfenil)amida d el áci do (2R,3S)-1-(2-clorobenzoil)-2-(4-ciclopentilaminofenil) piperidin-3-carboxílico



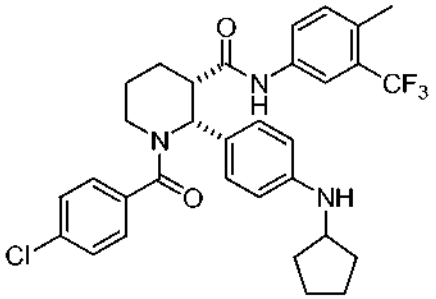
RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9,41 (s a, 0,5H), 9,03 (s a, 0,5H), 7,55 (s, 1H), 7,49-7,39 (m, 3H), 7,31-7,27 (m, 2H), 7,18-7,04 (m, 2H), 6,83-6,74 (m, 3 H), 3,76-3,64 (m, 1H), 3,22-2,90 (m, 5H), 2,39 (s, 3H), 2,32-2,20 (m, 1H), 2,16-2,04 (m, 1H), 2,0-1,86 (m, 2H) 1,80-1,72 (m, 3H), 1,56 (s a, 5H).

(3-Cloro-4-metilfenil)amida d el áci do (2R,3S)-2-(4-ciclopentilaminofenil)-1-(2-fluoro-6-metilbenzoil) piperidin -3-carboxílico



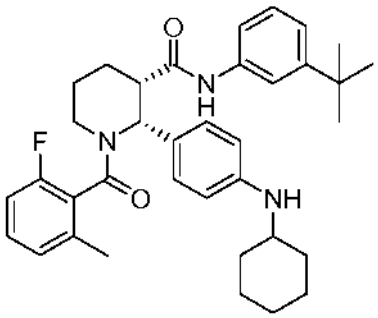
RMN ^{1}H (DMSO-d_6) δ 10,22 (s, 1H), 7,67 (dd, *J* = 1,8 Hz, *J* = 11,0 Hz, 1H), 7,04-7,33 (m, 9H), 6,30 (dd, J = 5,8 Hz, J = 9,4 Hz, 1H), 5,52 (a, 1H), 3,56-3,64 (m, 1H), 3,00-3,17 (m, 2H), 2,90-2,98 (m, 1H), 2,23(2,24) (s, 3H), 1,97(2,33) (s, 3H), 1,32-2,22 (m, 12H)

(4-Metil-3-trifluorometilfenil)amida del áci do (2R,3S)-1-(4-clorobenzoil)-2-(4-Ciclopentilaminofenil) p iperidin-3-carboxílico



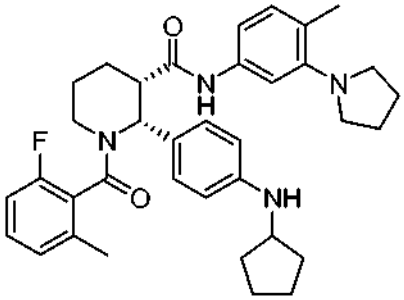
RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8,79 (s a, 1H), 7,62 (s, 1H), 7,52-7,48 (m, 1H), 7,37-7,30 (m, 5H), 7,13 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 6,52-6,50 (m, 3H), 3,75-3,69 (m, 1H), 3,44 (s a, 1H), 3,09-2,97 (m, 2H), 2,39 (s, 3H), 2,37-2,30 (m, 1H), 2,13-2,08 (m, 1H), 2,10-1,93 (m, 2H), 1,80-1,59 (m, 7H), 1,48-1,42 (m, 2H)

(3-*t*-Butilfenil)amida del ácido (2R,3S)-2-(4-ciclohexilaminofenil)-1-(2-fluoro-6-metilbenzoil)piperidin-3-carboxílico



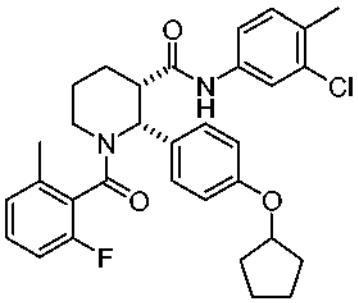
RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$): δ 8,24 (m, 1H), 7,40-6,85 (m, 8H), 6,65-6,40 (m, 3H), 3,57 (s, 1H), 3,30- 2,90 (m, 4H), 2,50-1,85 (m, 9H), 1,80-1,50 (m, 5H), 1,40-1,00 (m, 13H)

(4-Metil-3-pirrolidin-1-il-fenil)amida del ácido (2R,3S)-2-(4-ciclopentilaminofenil)-1-(2-fluoro-6-metilbenzoil) piperidin-3-carboxílico



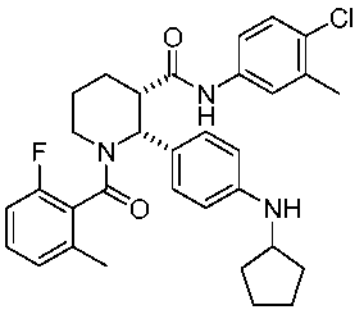
RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7,98 (m, 1H), 7,40- 7,18 (m, 3H), 7,10- 6,80 (m, 4H), 6,64- 6,40 (m, 3H), 3,80-3,50 (m, 2H), 3,30-2,90 (m, 6H), 2,50-2,10 (m, 7H), 2,10-1,80 (m, 8H), 1,80-1,20 (m, 9H)

(3-Cloro-4-metilfenil)amida del ácido (2R,3S)-2-[4-(ciclopentiloxi)fenil]-1-(2-fluoro-6-metilbenzoil) piperidin -3-carboxílico



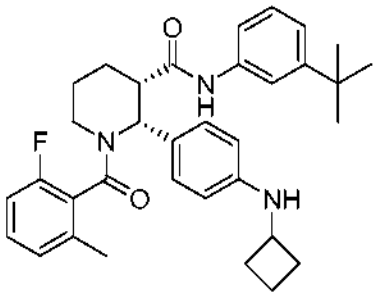
RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8,68 (s a, 0,6H), 8,58 (s a, 0,4H), 7,59-7,40 (m, 3H), 7,29-6,90 (m, 4H), 6,80 (m, 2H), 6,65 (m, 1H), 4,72 (m, 1H), 3,30-2,92 (m, 3H), 2,44 (s, 1H), 2,42-2,30 (m, 1H), 2,30 (s, 1H), 2,29 (s, 2H), 2,20 (s, 2H), 2,19-2,12 (m, 1H), 2,08-1,92 (m, 2H), 1,90-1,72 (m, 7H) 1,60 (m, 2H).

(4-Cloro-3-metilfenil)amida del ácido (±)-(2R,3S)-2-(4-ciclopentilaminofenil)-1-(2-fluoro-6-metilbenzoil) piperidin-3-carboxílico



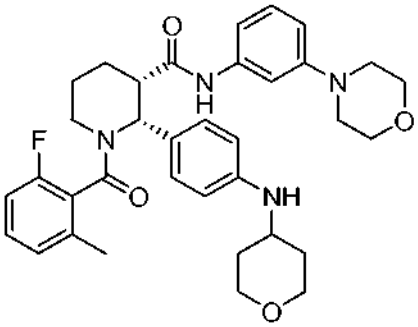
RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8,25 (s a, 0,4H), 8,16 (s a, 0,6H), 7,44-7,20 (m, 6H), 7,06-6,84 (m, 2H), 6,59-6,50 (m, 2H), 3,75 (m, 1H), 3,66 (s a, 1H), 3,26-2,92 (m, 3H), 2,43 (s, 1H), 2,42-2,30 (m, 1H), 2,30 (s, 1H), 2,29 (s, 2H), 2,20 (s, 2H), 2,19-2,12 (m, 1H), 2,08-1,92 (m, 2H), 1,80-1,58 (m, 7H) 1,45 (m, 2H).

(3-*t*-Butilfenil)amida d el áci do (2R,3S)-2-(4-ciclobutilaminofenil)-1-(2-fluoro-6-metilbenzoil)piperidin-3-carboxílico



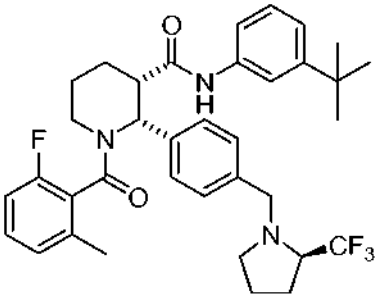
RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8,20 (s, 0,6 H), 8,39 (s, 0,4 H), 7,44-6,88 (m, 10 H), 6,25 (dd, J = 12 Hz, J = *6 Hz*, 1 H), 6,45 (t, J = *8,4 Hz*, 1H), 3,87 (m, 1H), 3,26-2,95 (m, 3H), 2,46-2,05 (m, 8H), 1,86-1,61 (m, 5H), 1,34-1,11 (m, 9H)

(3-Morfolin-4-il-fenil)amida del ácido (2R,3S)-1-(2-fluoro-6-metilbenzoil)-2-[4-(tetrahidropiran-4-ilamino) fenil]piperidin-3-carboxílico



RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,61 (s, 1 H), 7,34-6,92 (m, 10 H), 6,78-6,65 (m, 1 H), 6,62-6,53 (m, 1H), 3,98-3,85 (m, 4H), 3,83-3,70 (m, 1H), 3,55-3,30 (m, 3H), 3,27-2,98 (M, 4H), 2,42-1,92 (m, 8H), 1,81-1,45 (m, 7H)

(3-*t*-butilfenil)amida del á cido (2R,3S)-1-(2-fluoro-6-metilbenzoil)-2-[4-((R)-2-tnfluorometilpirrolidin1-ilmetil) fenil]piperidin3-carboxílico



RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8,01 (s a, 0,5H), 7,96 (s a, 0,5H), 7,55-7,37 (m, 3H), 7,30-7,19 (m, 6H), 7,13-7,06 (m, 1H), 7,01-6,90 (m, 1H), 6,85-6,64 (m, 1H), 4,15-4,11 (m, 1H), 3,58-3,54 (m, 1H), 3,30-3,20 (m, 2H), 3,17-2,80 (m, 2H), 2,45-2,17 (m, 4H), 2,00-1,94 (m, 2H), 1,86-1,60 (m, 8H), 1,31-1,26 (m, 7H)

Ejemplo 12

MATERIALES Y MÉTODOS

A. Células

1. Células que expresan el receptor C5a

a) Células U937

Las células U937 son una línea celular monocítica que expresa C5aR, y están disponibles de American Tissue Cell Collection (Virginia). Estas células se cultivaron como una suspensión en medio RPMI-1640 suplementado con 2 mM de L-glutamina, 1,5 g/l de bicarbonato sódico, 4,5 g/l de glucosa, 10 mM de HEPES, 1 mM de piruvato sódico, y SFB al 10 %. Las células se cultivaron en CO_2 al 5 %/aire 95 %, humedad al 100 % a 37 ºC y se subcultivaron dos veces por semana a 1:6 (las células se cultivaron en un intervalo de densidad de 1 x 10^5 a 2 x 10^6 células/ml) y se recogieron en 1 x 10^6 células/ml. Antes del ensayo, las células se tratan durante la noche con 0,5 mM de AMP cíclico (Sigma, OH) y se lavan una vez antes de su uso. Las células U937 tratadas con AMPc pueden utilizarse en la unión al ligando C5aR y en ensayos funcionales.

b) Neutrófilos aislados humanos,

Opcionalmente, los neutrófilos humanos o murinos pueden utilizarse para ensayar la actividad del compuesto. Los neutrófilos pueden aislarse a partir de sangre humana fresca utilizando separación y centrifugado por densidad. Brevemente, se incubó la sangre entera con partes iguales de dextrano al 3 % y se dejó separar durante 45 minutos. Tras la separación, la capa superior se coloca en la parte superior de 15 ml de Ficoll (15 ml de Ficoll por cada 30 ml de suspensión de sangre) y se centrifugó durante 30 minutos a 400 x g sin freno. A continuación, se aísla el sedimento en la parte inferior del tubo y se vuelve a suspender en tampón de lisis PharmLyse RBC (BD Biosciences, San Jose, CA) después de lo cual la muestra se centrifuga de nuevo durante 10 minutos a 400 x g con freno. El sedimento celular restante se vuelve a suspender según proceda y consiste en los neutrófilos aislados.

B. Ensayos

1. Inhibición de la unión de ^{125}I-C5a a C5aR

Las células U937 tratadas con AMPc que expresan C5aR se centrifugaron y se volvieron a suspender en tampón de ensayo (20 mM de HEPES pH 7,1, 140 mM de NaCl, 1 mM de $CaCl_2$, 5 mM de $MgCl_2$, y con seroalbúmina bovina al 0,1 %) a una concentración de 3 x 10^6 células/ml. Los ensayos de unión se establecieron de la siguiente manera. 0,1 ml de células se añadieron a las placas de ensayo que contienen 5 µl del compuesto, proporcionando una concentración final de -2-10 µM de cada compuesto para exploración (o parte de una respuesta a la dosis para determinaciones de CI_{50} de los compuestos). A continuación, se añadieron 0,1 ml de C5a marcado con ^{125}I (obtenido en Perkin Elmer Life Sciences, Boston, MA) diluido en tampón de ensayo a una concentración final de ~50 pM, proporcionando -30.000 cpm por pocillo, las placas se sellaron y se incubaron durante aproximadamente 3 horas a 4 ºC en una plataforma agitadora. Las reacciones se aspiraron sobre filtros de vidrio GF/B preempapados en solución de polietilenimina (PEI) al 0,3 %, en una cosechadora celular al vacío (Packard Instruments; Meriden, CT). El líquido de centelleo (40 µl; Microscint 20, Packard Instruments) se añadió a cada pocillo, las placas se sellaron y se midió la radiactividad en un contador de centelleo Topcount (Packard Instruments). Los pocillos de control que contenían o bien un diluyente único (para los recuentos totales) o el exceso de C5a (1 µg/ml, para la unión no específica) se utilizaron para calcular el porcentaje de inhibición total del compuesto. El programa informático Prism de GraphPad, Inc. (San Diego, Ca) se utilizó para calcular los valores de CI_{50}. Los valores de CI_{50} son aquellas concentraciones requeridas para reducir la unión de C5a radiomarcado en el receptor en un 50 %. (Para una descripción más detallada de la unión al ligando y otros ensayos funcionales, véanse Dairaghi, *et al.*, *J. Biol. Chem.* 274:21569-21574 (1999), Penfold, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* EE. UU. 96:9839-9844 (1999), y Dairaghi, *et al.*, *J. Biol. Chem.* 272:28206-28209 (1997)).

2. Movilización del calcio

Opcionalmente, los compuestos pueden ensayarse adicionalmente por su capacidad para inhibir el flujo de calcio en las células. Para detectar la liberación de los almacenes intracelulares de calcio, las células (p. ej., U937 o neutrófilos estimulados por AMPc) se incuban con 3 µM de medio de contraste INDO-01AM (Molecular Probes; Eugene, OR) en un medio celular durante 45 minutos a temperatura ambiente y se lavan con solución salina tamponada con fosfato (STF). Tras la carga de INDO-01AM, las células se vuelven a suspender en tampón de flujo (solución salina equilibrada de Hank (SSEH) y SFB al 1 %). La movilización del calcio se mide utilizando un espectrofotómetro de Photon Technology International (Photon Technology International, Nueva Jersey) con excitación a 350 nm y grabación simultánea doble de emisión de fluorescencia a 400 nm y 490 nm. Los niveles de calcio intracelular relativos se expresan como la relación de emisión 400 nm/490 nm. Los experimentos se realizan a 37 ºC con mezclado constante en cubetas que contienen cada una 10^6 células en 2 ml de tampón de flujo. Los ligandos de quimiocinas pueden utilizarse en un intervalo de 1 a 100 nM. La relación de emisión se representa gráficamente con el transcurso del tiempo (normalmente 2-3 minutos). El ligando candidato que bloquea los compuestos (hasta 10 µM) se añade a los 10 segundos, seguido de las quimiocinas a los 60 segundos (es decir, C5a; R&D Systems, Minneapolis, MN) y la quimiocina de control (es decir, SDF-1α; R&D Systems, Minneapolis, MN) a los 150 segundos.

3. Ensayos de quimiotaxis

Opcionalmente, los compuestos pueden ensayarse adicionalmente por su capacidad para inhibir la quimiotaxis en las células. Los ensayos de quimiotaxis se realizan con 5 µm de policarbonato de poro, filtros revestidos de

polivinilpirrolidona en cámaras de quimiotaxis de 96 pocillos (Neuroprobe; Gaithersburg, MD) utilizando tampón de quimiotaxis (solución salina equilibrada de Hank (SSEH) y SFB al 1 %). Los ligandos C5aR (es decir, C5a, R&D Systems, Minneapolis, MN) se emplean para evaluar la inhibición mediada por el compuesto de la migración mediada por C5aR. Otras quimiocinas (es decir, SDF-1α; R&D Systems, Minneapolis, MN) se utilizan como controles de especificidad. La cámara inferior se carga con 29 µl de quimiocinas (es decir, 0,03 nM de C5a) y cantidades variables de compuesto; la cámara superior contiene 100.000 células U937 o neutrófilos en 20 µl. Las cámaras se incuban 1,5 horas a 37 ºC, y el número de células en la cámara inferior se cuantifica bien mediante recuentos celulares directos en cinco campos de alta potencia por pocillo o mediante el ensayo CyQuant (Molecular Probes), un método de tinción fluorescente que mide el contenido de ácido nucleico y la observación microscópica.

C. Identificación de inhibidores de C5aR

1. Ensayo

Para evaluar las moléculas orgánicas pequeñas que evitan que el receptor C5a se una al ligando, se empleó un ensayo que detectó la unión de ^{125}I-C5a a las células que expresan C5aR en la superficie celular (por ejemplo, AMPc estimuló las células U937 o los neutrófilos aislados humanos). Para los compuestos que inhibían la unión, ya sea competitiva o no, se observan menos recuentos radiactivos cuando se compara con los controles sin inhibir.

Se añadieron las mismas cantidades de células a cada pocillo en la placa. Las células se incubaron a continuación con C5a radiomarcado. El ligando no unido se eliminó lavando las células, y el ligando unido se determinó cuantificando los recuentos radiactivos. Las células que se incubaron sin ningún compuesto orgánico proporcionaron los recuentos totales; La unión no específica se determinó incubando las células con un ligando sin marcar y un ligando marcado. El porcentaje de inhibición se determinó por medio de la ecuación:

% de inhibición = (1 - [(cpm de la muestra) - (cpm no específicas)]/[cpm totales) - (cpm no específicas)]) x 100.

2. Curvas dosis-respuesta

Para determinar la afinidad de un compuesto candidato para C5aR así como confirmar su capacidad para inhibir la unión al ligando, la actividad inhibidora se tituló en un intervalo de 1 x 10^{-10} a 1 x 10^{-4} M de concentraciones del compuesto. En el ensayo, varió la cantidad del compuesto; mientras que se mantuvo constante el número de células blancas y la concentración del ligando.

D. Modelos de eficacia *in vivo*

Los compuestos de interés pueden evaluarse para la eficacia potencial en el tratamiento de condiciones mediadas por C5a mediante la determinación de la eficacia del compuesto en un modelo animal. Además de los modelos descritos en lo sucesivo, otros modelos animales adecuados para el estudio del compuesto de interés pueden hallarse en Mizuno, M. *et al.*, *Expert Opin. Investig. Drug* (2005), 14(7), 807-821, que se incorpora en el presente documento en su totalidad como referencia.

1. Modelos de leucopenia inducida por C5a

a) Leucopenia inducida por C5a en un modelo de ratón con sustitución de secuencia génica con C5aR humano

Para estudiar la eficacia de los compuestos de la presente invención en un modelo animal, puede crearse un ratón recombinante utilizando técnicas convencionales, donde la secuencia genética codificante para el C5aR de ratón se sustituye con la secuencia codificante del C5aR humano, para crear una ratón hC5aR-KI. En este ratón, la administración de hC5a produce el aumento de moléculas de adhesión en las paredes de los vasos sanguíneos que se unen a los leucocitos de la sangre, secuestrándolos del torrente sanguíneo. A los animales se les administra 20 ug/kg de hC5a y 1 minuto más tarde los leucocitos se cuantifican en la sangre periférica mediante técnicas convencionales. El pretratamiento de los ratones con dosis variables de los presentes compuestos puede bloquear casi por completo la leucopenia inducida por hC5a.

b) Leucopenia inducida por C5a en un modelo de macaco cangrejero

Para estudiar la eficacia de los compuestos de la presente invención en un modelo de primate no humano, se estudia la leucopenia inducida por C5a en un modelo de cangrejero. En este modelo de administración de hC5a se produce el aumento de las moléculas de adhesión en las paredes de los vasos sanguíneos que se unen a los leucocitos de la sangre, en consecuencia, secuestrándolos del torrente sanguíneo. A los animales se les administra 10 ug/kg de hC5a y 1 minuto más tarde se cuantifican los leucocitos en la sangre periférica.

c) Modelo de ratón de vasculitis inducida por AACN

En el día 0 a los ratones hC5aR-KI se les inyecta por vía intravenosa 50 mg/kg de anticuerpo purificado contra mieloperoxidasa (Xiao *et al*, *J. Clin. Invest*. 110: 955-963 (2002)). Los ratones se dosifican además con dosis diarias orales de los compuestos de la invención o un vehículo durante siete días, a continuación, los ratones se sacrifican y se recogen los riñones para el examen histológico. El análisis de las secciones renales puede mostrar significativamente la reducción del número y la gravedad de las lesiones necróticas o crescénticas en los glomérulos en comparación con los animales tratados con el vehículo.

d) Modelo de ratón de neovascularización coroidea

Para estudiar la eficacia de los compuestos de la presente invención en el tratamiento de la degeneración macular asociada a la edad (DME), la membrana de Bruch en los ojos de ratones hC5aR-KI se rompe por la fotocoagulación con láser (Nozika *et al*, *PNAS* 103: 2328-2333 (2006). Los ratones se trataron con un vehículo o con una dosis oral diaria o intravítrea apta de un compuesto de la invención durante una a dos semanas. La reparación del daño inducido por láser y la neovascularización se evalúan por histología y angiografía.

2. Modelos de artritis reumatoide

a) Modelo de conejo de inflamación destructiva de las articulaciones

Para estudiar los efectos de los compuestos candidatos en la inhibición de la respuesta inflamatoria de conejos a una inyección intraarticular del componente lipopolisacárido (LPS) de la membrana bacteriana, se utiliza un modelo de conejo de inflamación destructiva de las articulaciones. Este diseño de estudio imita la inflamación destructiva de las articulaciones vista en la artritis. La inyección intraarticular de LPS causa una respuesta inflamatoria aguda caracterizada por la liberación de citoquinas y quimiocinas, muchas de las cuales se han identificado en las articulaciones artríticas reumatoides. Un notable incremento en los leucocitos se produce en el líquido sinovial y en el sinovio en respuesta a la elevación de estos mediadores quimiotácticos. Los antagonistas selectivos de los receptores de quimiocinas han mostrado eficacia en este modelo (véase Podolin, *et al*., *J. Immunol*. 169(11):6435-6444 (2002)).

Se lleva a cabo un estudio de LPS en conejo esencialmente como se describe en Podolin, *et al*. *ibid*., se trataron conejos hembra de Nueva Zelanda (aproximadamente 2 kilogramos) por vía intraarticular en una rodilla con LPS (10 ng) junto con solamente el vehículo (solución salina tamponada con fosfato con DMSO al 1 %) o con la adición del compuesto candidato (dosis 1 = 50 µM o dosis 2 = 100 mM) en un volumen total de 1,0 ml. Dieciséis horas después de la inyección de LPS, las rodillas se lavan y se realizan los recuentos celulares. Los efectos beneficiosos del tratamiento se determinaron mediante evaluación histopatológica de la inflamación sinovial. Las puntuaciones de inflamación se utilizan para la evaluación histopatológica: 1 - mínima, 2 - leve, 3 - moderada, 4 - moderada a intensa.

b) Evaluación de un compuesto en un modelo de rata de artritis inducida por colágeno

En el día 17 se lleva a cabo el desarrollo de un estudio de artritis por colágeno tipo II para evaluar los efectos de un compuesto candidato en inflamación del tobillo clínico inducida por artritis. La artritis por colágeno en rata es un modelo experimental de poliartritis que se ha utilizado ampliamente para los ensayos preclínicos de numerosos agentes antiartríticos (véase Trentham, *et al*., *J. Exp. Med*. 146(3):857-868 (1977), Bendele, *et al*., *Toxicologic Pathol.* 27:134-142 (1999), Bendele, *et al*., *Artritis, Rheum*. 42:498-506 (1999)). Las marcas distintivas de este modelo son el inicio fiable y la progresión de la inflamación poliarticular intensa fácilmente medible, la destrucción del cartílago marcado junto con la formación de queratis vascular, la resorción ósea leve a moderada y la proliferación ósea perióstica.

Se anestesian ratas Lewis hembra (aproximadamente 0,2 kilogramos) con isoflurano y se les inyecta adyuvante incompleto de Freund que contiene 2 mg ml/colágeno tipo II bovino en la base de la cola y en dos sitios en el dorso los días 0 y 6 para este estudio de 17 días. Un compuesto candidato se dosifica diariamente de manera subcutánea del día 0 al día 17 a una dosis eficaz. Se realizaron mediciones con plicómetro del diámetro de la articulación del tobillo, y se realizó la reducción de la hinchazón de las articulaciones como medida de eficacia.

3. Modelo de sepsis en rata

Para estudiar el efecto de los compuestos de interés en la inhibición de la respuesta inflamatoria generalizada que se asocia a sepsis como enfermedad, se utiliza el modelo de sepsis en rata por ligamento y punción cecal (LPC). Un estudio de LPC en ratas se lleva a cabo fundamentalmente como se describe en Fujimura N, *et al*. (*American Journal Respiratory Critical Care Medicine* 2000; 161: 440-446). Descrito brevemente en este caso, se someten a ayuno ratas albinas Wistar de ambos sexos con pesos entre 200-250 g durante doce horas antes de los experimentos. Los animales permanecen en ciclos normales de 12 horas de luz y oscuridad y se les dispuso alimento convencional para ratas hasta 12 horas antes del experimento. A continuación, los animales se dividen en cuatro grupos; (I) dos grupos de operación simulada y (ii) dos grupos de LPC. Cada uno de estos dos grupos (es decir, (i) y (ii)) se divide en grupo de control de vehículo y un grupo de compuesto de ensayo. La sepsis se induce por el método de LPC. Con anestesia breve se realiza una laparotomía en línea media utilizando disección mínima y el ciego se liga justo bajo la válvula ileocecal con seda 3-0, por lo que se mantiene la continuidad intestinal. La superficie antimesintérica del ciego se perfora con una aguja de calibre 18 en dos sitios a 1 cm de distancia y el ciego se presiona suavemente hasta que se extruye la materia fecal. El intestino se recoloca en el abdomen y se cierra la incisión. Al final de la operación, todas las ratas se reaniman con solución salina, 3 ml/100 g de peso corporal, dada por vía subcutánea. Tras la operación, las ratas se privan de alimentación, aunque tienen acceso libre al agua durante las próximas 16 horas hasta que se sacrifican. A los grupos de operación simulada se les realiza una laparotomía y el ciego se manipula pero no se liga o perfora. Los efectos beneficiosos del tratamiento se miden por puntuación histopatológica de los tejidos y órganos así como la medición de varios indicadores clave de la función hepática, función renal, y peroxidación lipídica. Para ensayar la función hepática se miden la aspartato transaminasa (AST) y alanina transaminasa (ALT). Se estudian las concentraciones de nitrógeno ureico y creatinina en sangre para evaluar la función renal. Las citoquinas proinflamatorias, tales como FNT-alfa e IL-1 beta también se ensayan mediante ELISA para los niveles séricos.

4. Modelo de ratón de LES de nefritis lúpica experimental.

Para estudiar el efecto de los compuestos de interés en lupus eritematoso sistémico (LES), se utilizó el modelo de LES MRL/lpr murino. La cepa MRL/Mp-Tmfrsf6$^{lpr/lpr}$ (MRL/lpr) es un modelo de ratón utilizado habitualmente de LES humano. Para ensayar la eficacia de los compuestos en este modelo, los ratones macho MRL/lpr se dividen por igual entre el control y los grupos antagonistas de C5aR a las 13 semanas de vida. A continuación, durante las próximas 6 semanas el compuesto o vehículo se administra a los animales a través de bombas osmóticas para mantener la cobertura y minimizar los efectos del estrés en los animales. Las muestras de suero y orina se recogen cada dos semanas durante las seis semanas del inicio y progresión de la enfermedad. En una minoría de estos ratones se desarrolla glomeruloesclerosis que produce la muerte del animal debido a insuficiencia renal. La consiguiente mortalidad como indicador de la insuficiencia renal es uno de los criterios medidos y el tratamiento exitoso dará lugar generalmente a un retraso en el inicio de la muerte súbita entre los grupos de ensayo. Además, la presencia y magnitud de la enfermedad renal también pueden controlarse continuamente con mediciones de nitrógeno ureico en sangre (NUS) y albuminuria. Los tejidos y órganos también se recogieron a las 19 semanas y se sometieron a histopatología, inmunohistoquímica y se puntuaron basándose en el daño tisular e infiltración celular.

5. Modelo de rata de EPOC

La inflamación de las vías respiratorias inducida por humo en modelos de roedores puede utilizarse para evaluar la eficacia de los compuestos en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Los antagonistas selectivos de quimiocinas han mostrado eficacia en este modelo (véase, Stevenson, *et al.*, *Am. J. Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 288 L514-L522, (2005)). Un modelo en rata de EPOC aguda se lleva a cabo como se describe en Stevenson *et al*. Un compuesto de interés se administra de forma sistémica a través de la dosificación oral o IV; o localmente con el compuesto nebulizado. Las ratas macho Sprague-Dawley (350-400 g) se colocaron en cámaras de Perspex y se expusieron al humo del cigarrillo recogido mediante una bomba (50 ml con intercambio cada 30 segundos a aire puro). Las ratas se exponen durante un periodo total de 32 minutos. Las ratas se sacrifican a los 7 días tras la exposición inicial. Cualquier efecto beneficioso del tratamiento se evalúa por una reducción del infiltrado celular inflamatorio, disminuye los niveles de quimiocinas y citoquinas.

En un modelo crónico, los ratones o ratas se exponen a exposiciones de humo de tabaco diarias de hasta 12 meses. El compuesto se administra por vía sistémica a través de la dosificación oral una vez al día, o de manera potencial localmente a través del compuesto nebulizado. Además de la inflamación observada con el modelo agudo (Stevensen *et al.*), los animales también pueden exhibir otras patologías similares a las observadas en la EPOC humana, tal como enfisema (como se indica por el aumento de la intercepción lineal media) así como la química pulmonar alterada (véase Martorana *et al*, *Am. J. Respir. Crit Care Med*. 172(7):848-53.

6. Modelo EAE en ratón de esclerosis múltiple

La encefalomielitis autoinmunitaria experimental (EAE) es un modelo de esclerosis múltiple humana. Se han publicado las variantes del modelo, y se conocen adecuadamente en el campo. En un protocolo típico, ratones C57BL/6 (Charles River Laboratories) se utilizan en el modelo de EAE. Los ratones se inmunizan con 200 ug de glicoproteína mielina de oligodendrocitos (GMO) 35-55 (Peptide International) emulsionada en adyuvante completo de Freund (ACF) que

contiene 4 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis* (Sigma-Aldrich) por vía SC en el día 0. Además, en el día 0 y en el día 2 a los animales se les administra 200 ng de toxina pertussis IV (Calbiochem). La puntuación clínica se basa en una escala de 0-5: 0, ningún síntoma de enfermedad; 1, cola flácida; 2, debilidad de las extremidades posteriores; 3, parálisis de las extremidades posteriores; 4, debilidad o parálisis de la extremidad anterior; 5, moribundo. La dosificación de los compuestos de interés que se va a evaluar puede iniciarse en el día 0 (profiláctico) o el día 7 (terapéutico, cuando se tiene prueba histológica de la enfermedad, pero pocos animales muestran signos clínicos) y se dosifican uno o más por día en las concentraciones apropiadas por su actividad y propiedades farmacocinéticas, p. ej., 100 mg/kg SC. La eficacia de los compuestos puede evaluarse mediante comparaciones de gravedad (puntuación clínica media máxima en presencia del compuesto en comparación con el vehículo), o midiendo una disminución en el número de macrófagos (F4/80 positivo) aislados de la médula espinal. Las células mononucleares de la médula espinal pueden aislarse a través del gradiente discontinuo de Percoll. Las células pueden teñirse utilizando F4/80-PE anti-ratón de rata o IgG2b-PE de rata (Caltag Laboratories) y cuantificarse mediante análisis por CCAF utilizando 10 ul de polimicroesferas por muestra (Polysciences).

7. <u>Modelo de ratón de trasplante renal</u>

Los modelos de trasplante pueden realizarse en ratones, por ejemplo, se describe un modelo de trasplante de riñón alogénico de ratones C57BL/6 a ratones BALB/c en Faikah Gueler *et al*, *JASN Express*, 27 de agosto de 2008. En resumen, los ratones se anestesian y el riñón del donante izquierdo se une a un manguito de la aorta y la vena renal con un pequeño manguito de la vena cava, y los uréteres se retiran en bloque. Tras la nefrectomía izquierda del receptor, los manguitos vasculares se anastomosan a la aorta abdominal y al vena cava del receptor, respectivamente, bajo el nivel de los vasos renales nativos. El uréter se anastomosa directamente a la vejiga. El tiempo de isquemia fría es de 60 minutos, y el tiempo de isquemia caliente es de 30 min. El riñón derecho nativo puede extraerse en el momento del trasplante del aloinjerto o en el postrasplante del día 4 para los estudios de supervivencia a largo plazo. El estado físico general de los ratones se controla para pruebas de rechazo. El tratamiento de los animales con el compuesto puede iniciarse antes de la cirugía o inmediatamente después del trasplante, p. ej., inyección en la subincisión una vez al día. Los ratones se estudiaron para la función renal y la supervivencia. Los niveles de creatinina en suero se miden por un método automatizado (Beckman Analyzer, Krefeld, Alemania).

8. <u>Modelo de ratón de isquemia/reperfusión</u>

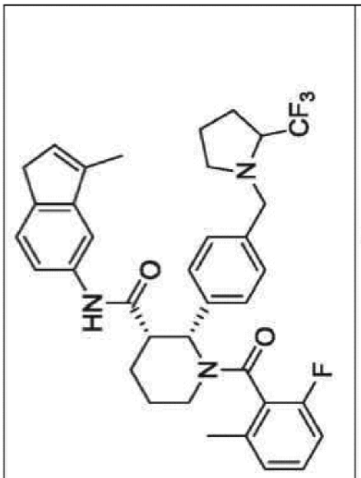
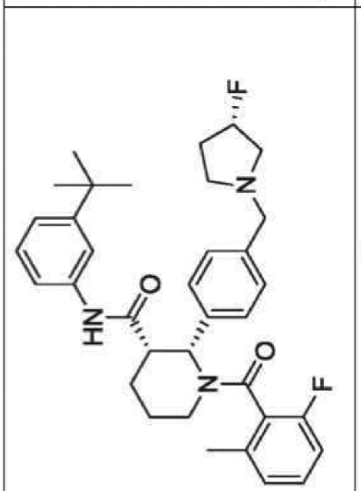
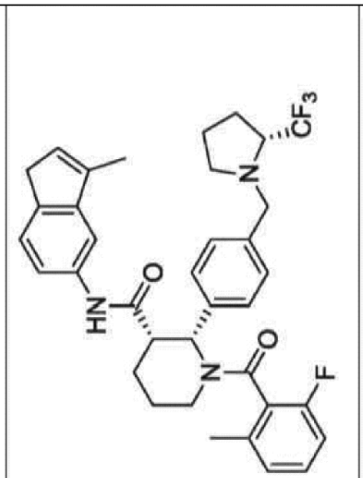
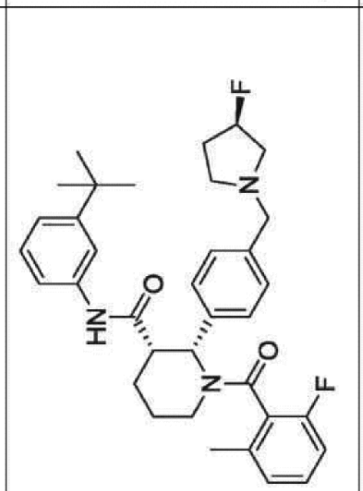
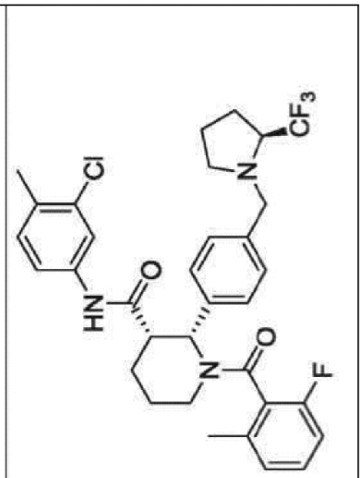
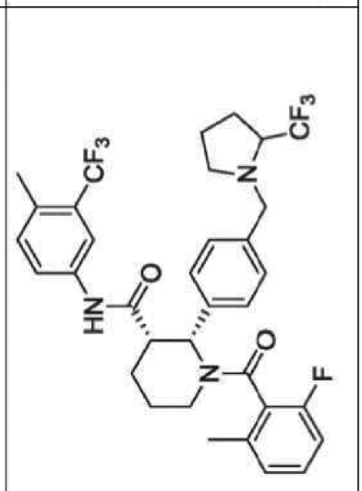
Un modelo de ratón de lesión por isquemia/reperfusión puede realizarse como describen Xiufen Zheng *et al*, *Am. J. Pathol*, vol. 173:4, octubre de 2008. En pocas palabras, los ratones CD1 de 6-8 semanas se anestesian y se colocan en una manta térmica para mantener el calor durante la cirugía. Después de las incisiones abdominales, los pedículos renales se diseccionan directamente y se coloca una pinza microvascular en el pedículo renal izquierdo durante 25-30 minutos. Tras la isquemia, las pinzas se retiran junto con el riñón derecho, se suturan las incisiones, y se permite la recuperación de los animales. La sangre se extrae para el análisis de creatinina y NUS en suero como indicador de la salud renal. Alternativamente, la supervivencia de los animales se controla conforme avance el tiempo. El compuesto puede administrarse a los animales antes y/o después de la cirugía y los efectos en la creatinina, NUS en suero, o supervivencia de los animales se utilizan como indicadores de la eficacia del compuesto.

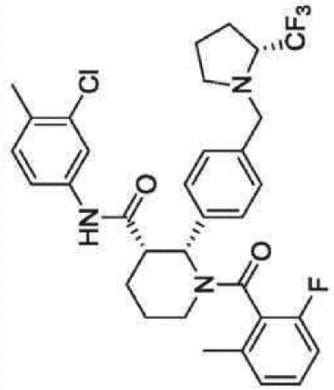
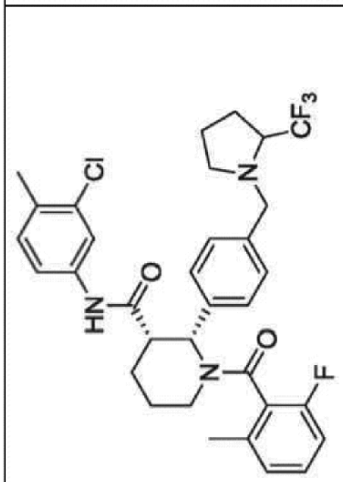
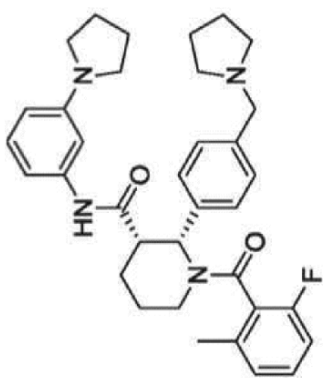
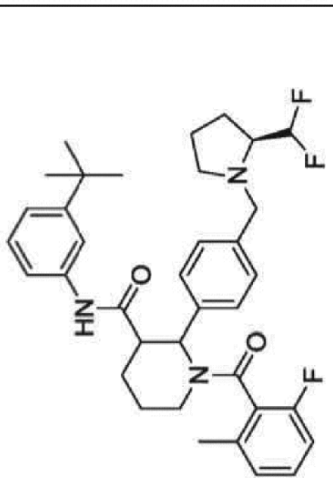
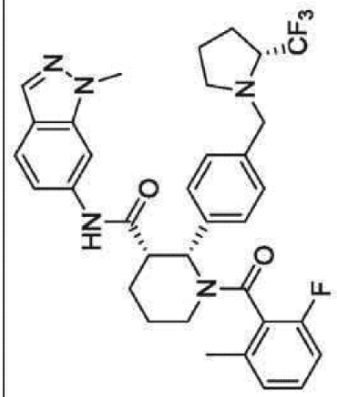
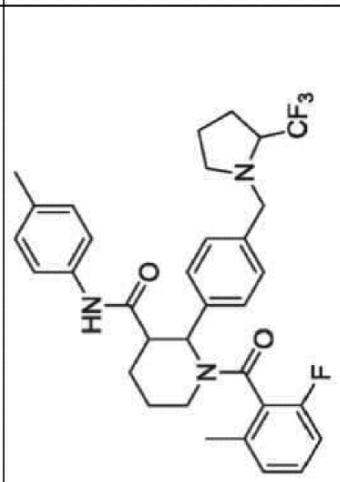
9. <u>Modelo de ratón del crecimiento tumoral</u>

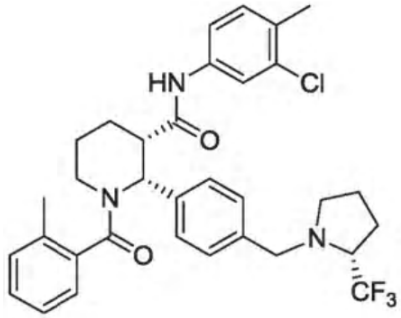
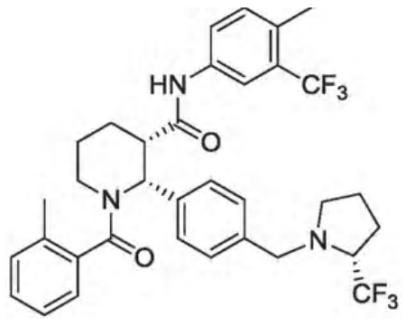
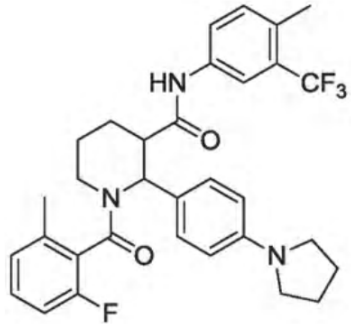
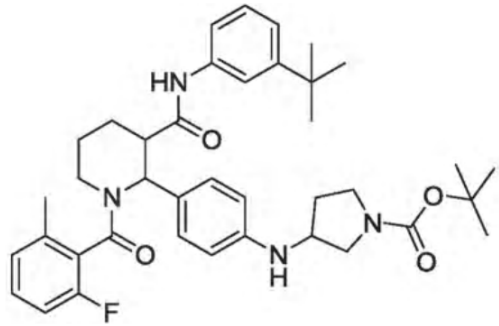
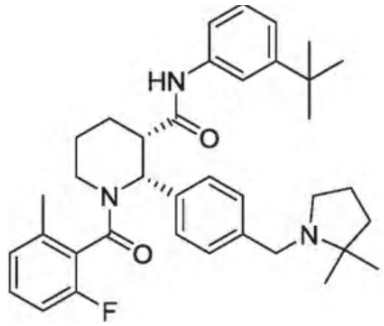
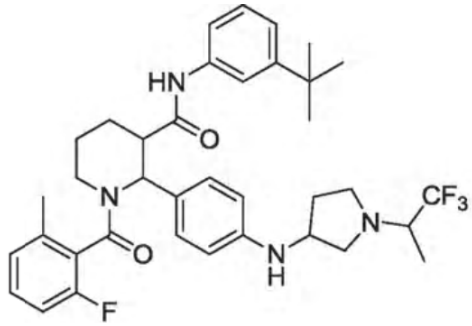
A los ratones C57BL/6 de 6-16 semanas de vida se les inyecta por vía subcutánea $1x10^5$ células TC-1 (CACT, VA) en el flanco posterior izquierdo o derecho. A partir de aproximadamente 2 semanas después de la inyección celular, los tumores se midieron con plicómetros cada 2-4 d hasta el tamaño del tumor requerido, los ratones se sacrifican. En el momento del sacrificio los animales se someten a una necropsia completa y se les extraen los bazos y tumores. Los tumores extirpados se miden y se pesan. Los compuestos pueden administrarse antes y/o después de las inyecciones tumorales, y un retraso o inhibición del crecimiento tumoral se utiliza para evaluar la eficacia del compuesto.

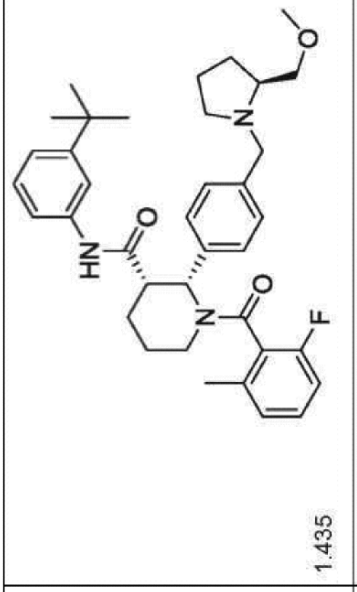
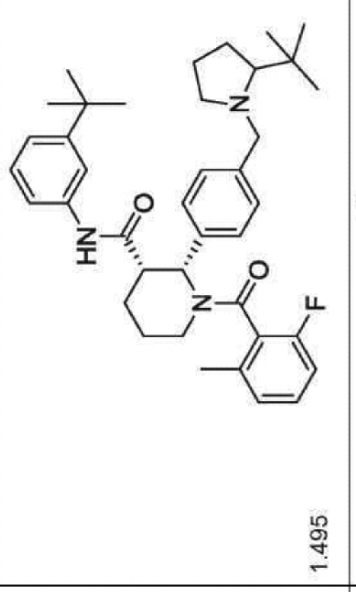
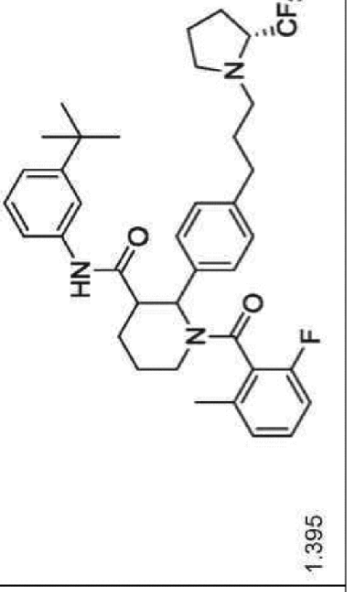
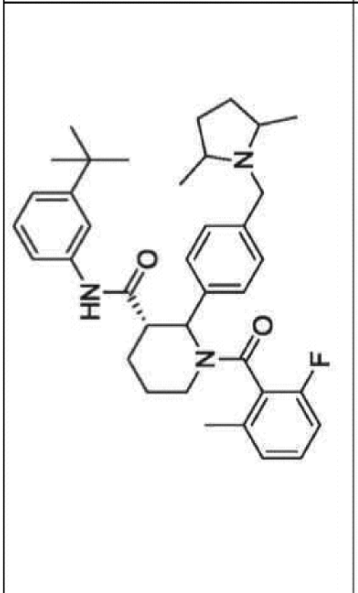
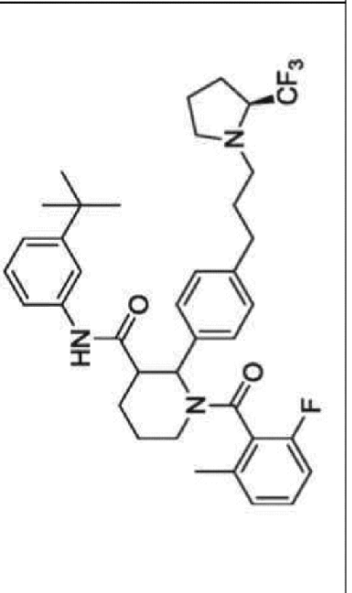
REIVINDICACIONES

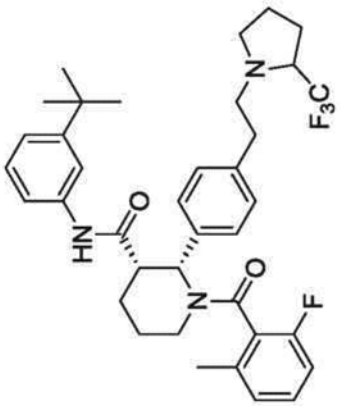
1. Un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en:

 1.426	 1.394
 1.460	 1.396
 1.445	 1.421

 1.451	 1.428
 1.452	 1.438
 1.499	 1.441

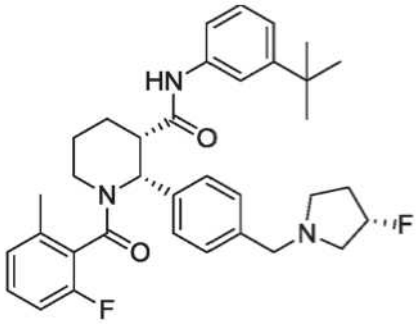
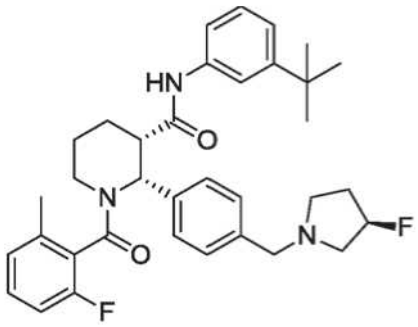
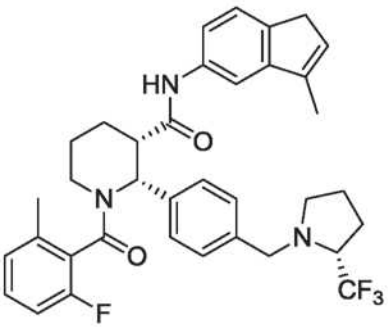
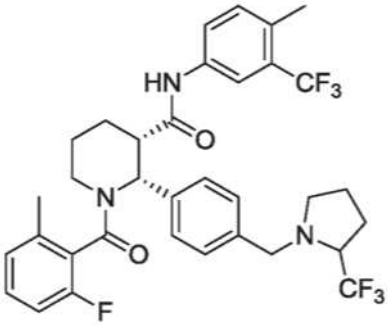
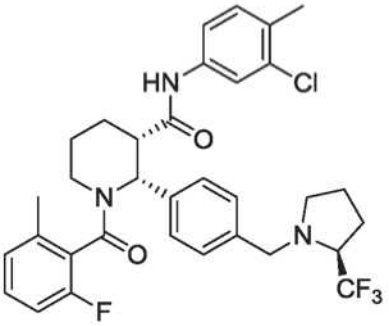
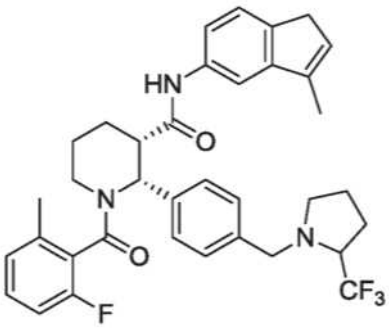
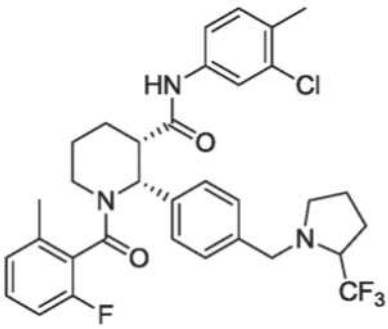
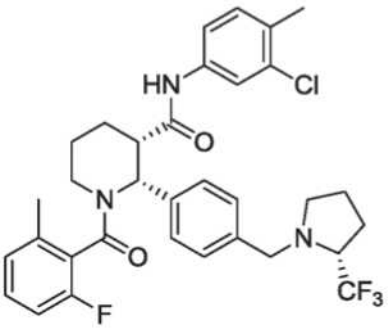
1.536  and	1.538 
1.334 	1.371 
1.399 	1.406 

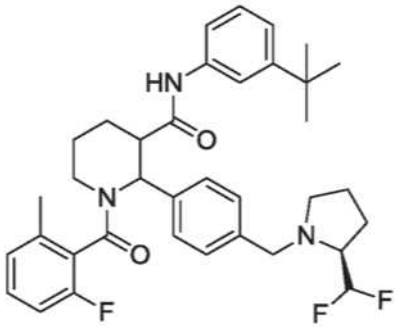
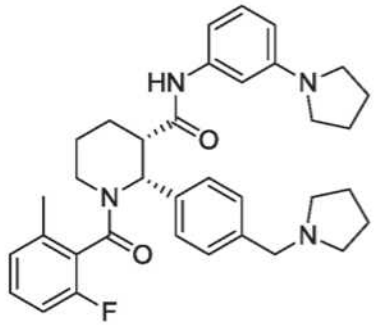
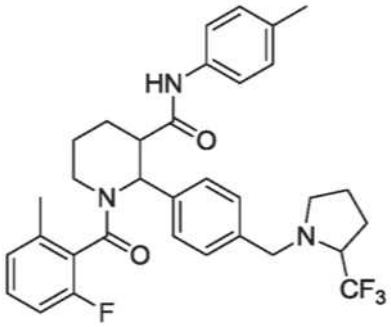
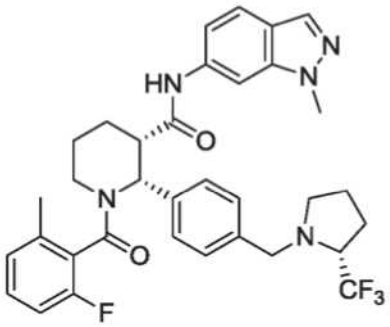
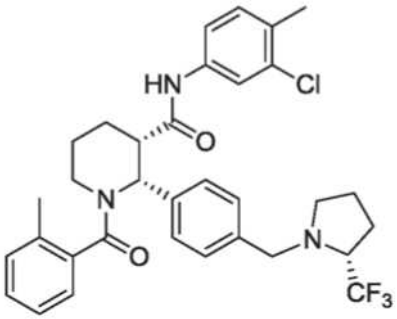
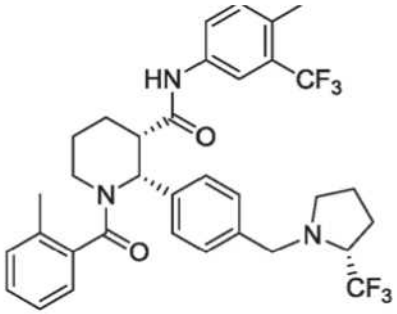
 1.435	 1.495	 1.395
 1.412		 1.390

	 y 1.403

o una sal, hidrato o rotómero farmacéuticamente aceptable del mismo.

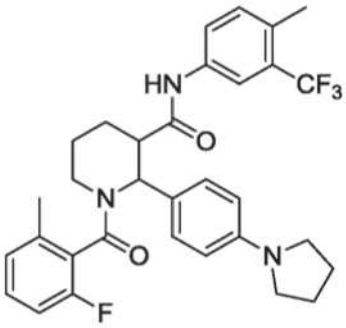
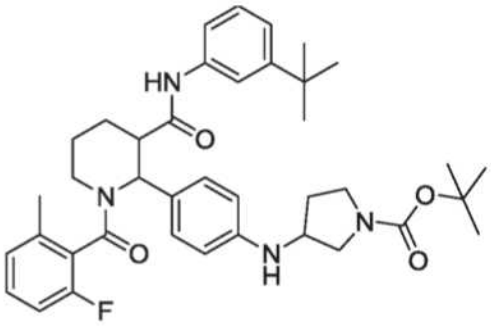
2. Un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en:

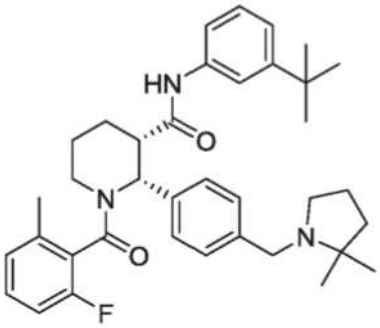
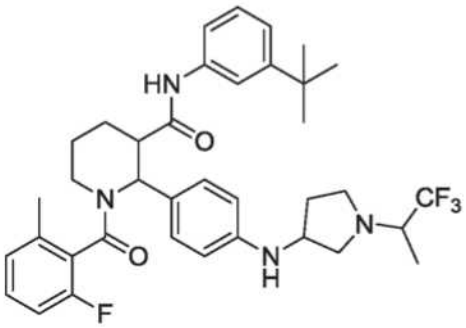
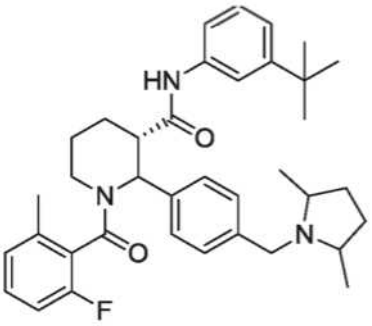
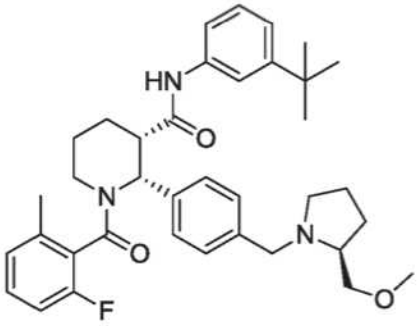
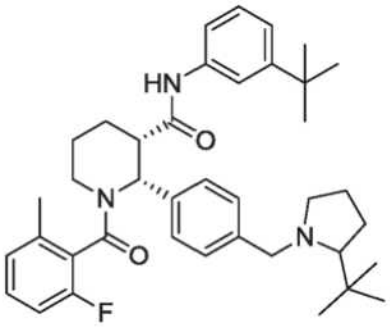
 1.394	
 1.396	 1.460
 1.421	 1.445
 1.426	
 1.428	 1.451

 1.438	 1.452
 1.441	 1.499
 1.536	 1.538

o una sal, hidrato o rotómero farmacéuticamente aceptable del mismo.

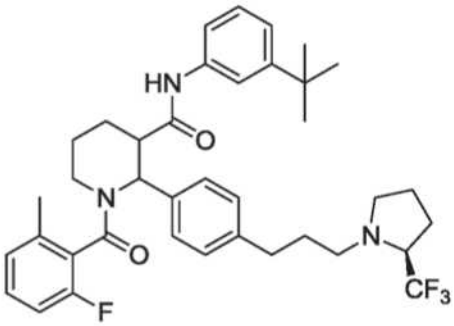
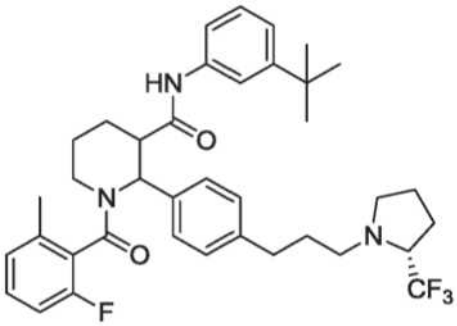
3. Un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en:

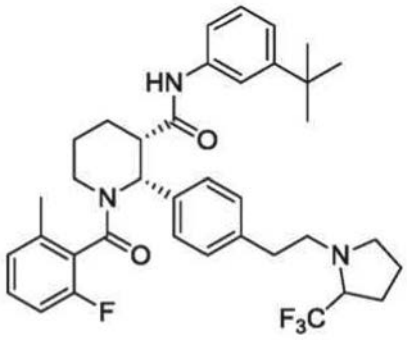
 1.334	 1.371

1.399 	1.406 
1.412 	1.435 
y	1.495 

o una sal, hidrato o rotómero farmacéuticamente aceptable del mismo.

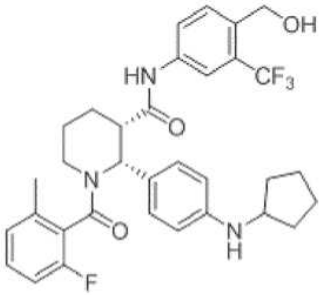
4. Un compuesto como se reivindica en la reivindicación 1, seleccionado entre el grupo que consiste en:

1.390 	1.395 

 y 1.403	

o una sal, hidrato o rotómero farmacéuticamente aceptable del mismo.

5. Un compuesto que es

1.543 

6. Una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

7. Un compuesto de acuerdo con las reivindicaciones de 1 a 5, para su uso en un método de tratamiento de un mamífero que padece o es susceptible a una enfermedad o trastorno que implica la activación patológica de receptores C5a, donde la enfermedad o trastorno es una enfermedad o trastorno inflamatorio, un trastorno cardiovascular o cerebrovascular; un trastorno autoinmunitario; o secuelas patológicas asociadas con el grupo que consiste en diabetes mellitus insulinodependiente, nefropatía lúpica, nefritis de Heyman, nefritis membranosa, glomerulonefritis, respuestas de sensibilidad de contacto, e inflamación resultante del contacto de la sangre con superficies artificiales.

8. El compuesto para el uso de la reivindicación 7, donde la enfermedad o trastorno es una enfermedad o trastorno inflamatorio.

9. Un compuesto para el uso de la reivindicación 8, donde
la enfermedad o trastorno inflamatorio se selecciona entre el grupo que consiste en neutropenia, sepsis, choque séptico, enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple, apoplejía, enfermedad inflamatoria intestinal, trastorno pulmonar obstructivo crónico, inflamación asociada con quemaduras, lesión pulmonar, osteoartritis, dermatitis atópica, urticaria crónica, lesión por isquemia-reperfusión, síndrome de distrés respiratorio agudo, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, síndrome de disfunción orgánica múltiple, rechazo del injerto tisular y rechazo hiperagudo de órganos trasplantados.

10. El compuesto para el uso de la reivindicación 7, donde la enfermedad o trastorno es un trastorno cardiovascular o cerebrovascular.

11. Un compuesto para el uso de la reivindicación 10, donde el trastorno cardiovascular o cerebrovascular se selecciona entre el grupo que consiste en infarto de miocardio, trombosis coronaria, oclusión vascular, reoclusión vascular posquirúrgica, aterosclerosis, lesión traumática del sistema nervioso central y enfermedad cardíaca isquémica.

12. El compuesto para el uso de la reivindicación 7, donde la enfermedad o trastorno es un trastorno autoinmune.

13. El compuesto para el usio de la reivindicación 12, donde el trastorno autoinmunitario se selecciona entre el grupo que consiste en artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Guillain-Barré, pancreatitis, nefritis lúpica, glomerulonefritis lúpica, psoriasis, enfermedad de Crohn, vasculitis, síndrome de intestino irritable,

dermatomiositis, esclerosis múltiple, asma bronquial, pénfigo, penfigoide, esclerodermia, miastenia grave, estados hemolíticos y trombocitopénicos autoinmunitarios, síndrome de Goodpasture, inmunovasculitis, rechazo del injerto tisular y rechazo hiperagudo de órganos trasplantados.

14. El compuesto para el uso de la reivindicación 7, donde la enfermedad o trastorno es una secuela patológica asociada con el grupo que consiste en diabetes mellitus insulinodependiente, nefropatía lúpica, nefritis de Heyman, nefritis membranosa, glomerulonefritis, respuestas de sensibilidad de contacto, e inflamación como resultado del contacto de la sangre con superficies artificiales.

FIG. 1A

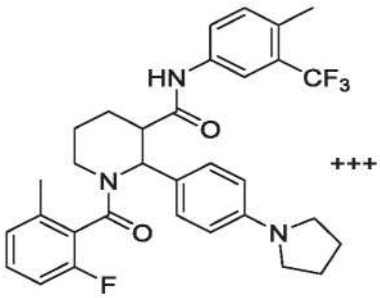
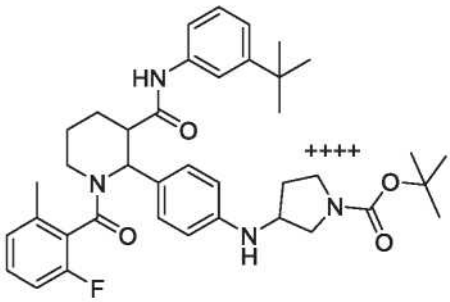
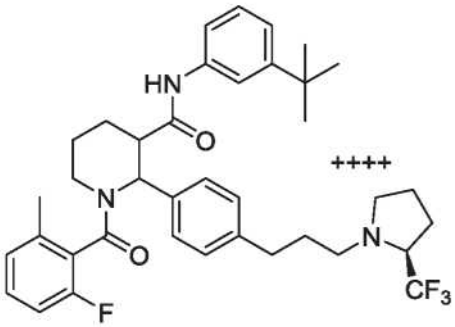
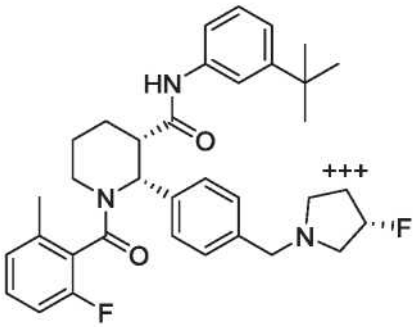
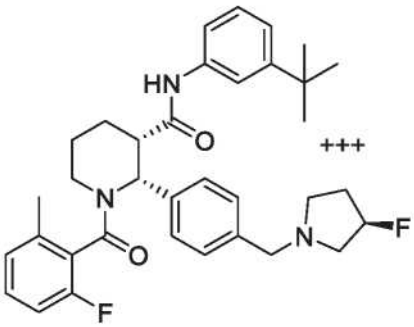
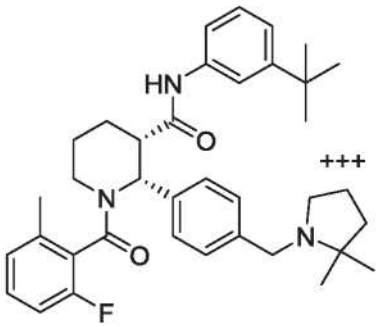
n.º	Estructura	Unión C5aR	n.º	Estructura	Unión C5aR
1.334		+++	1.371		++++
1.390		++++	1.394		+++
1.396		+++	1.399		+++

FIG. 1B

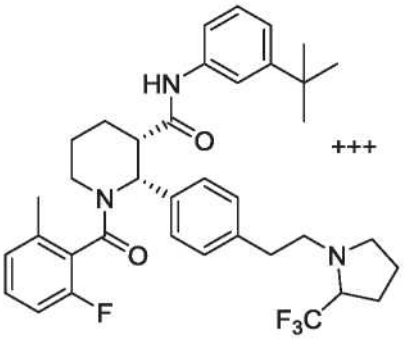
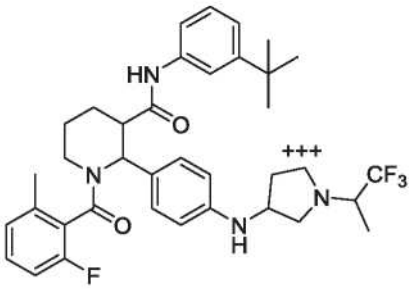
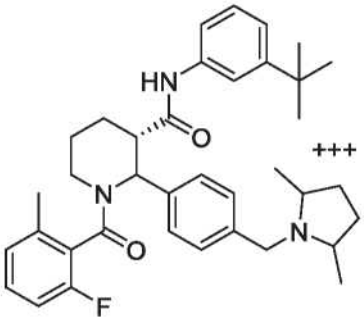
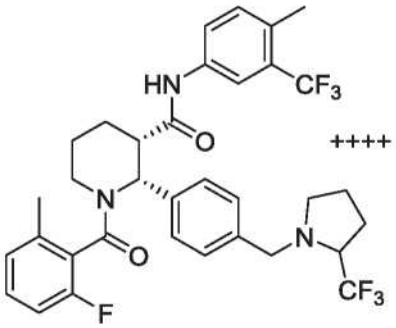
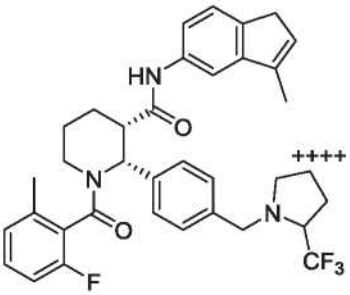
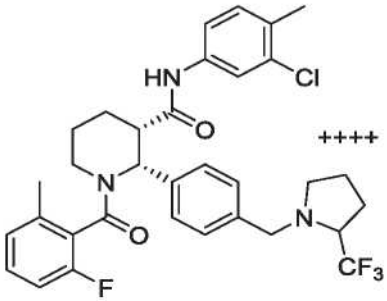
n.º	Estructura	Unión C5aR	n.º	Estructura	Unión C5aR
1.403		+++	1.406		+++
1.412		+++	1.421		++++
1.426		++++	1.428		++++

FIG. 1C

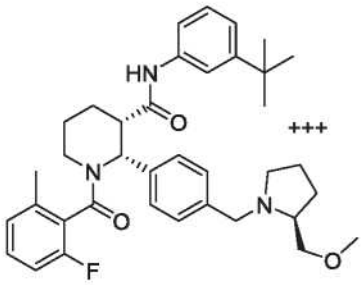
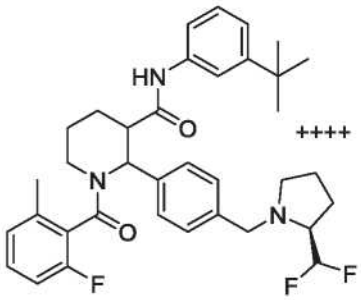
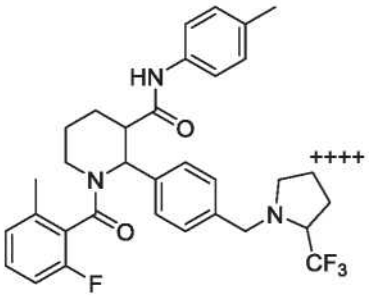
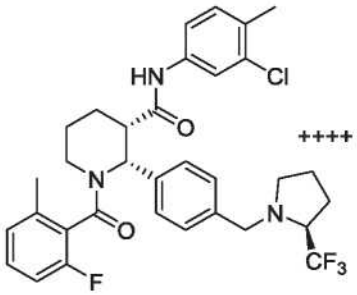
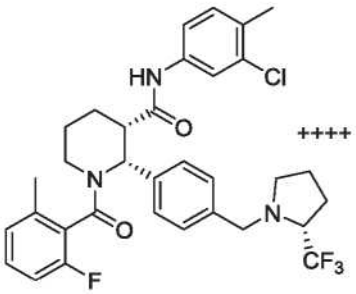
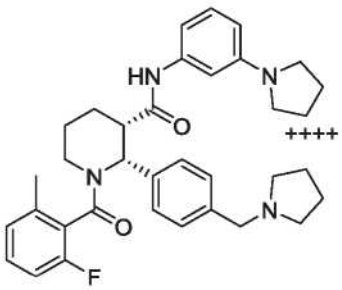
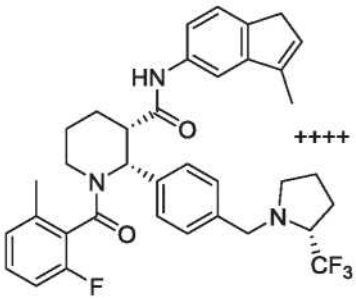
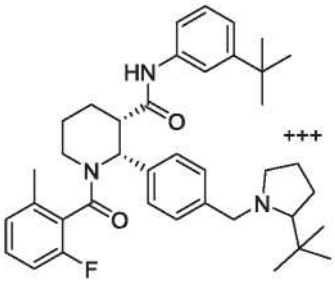
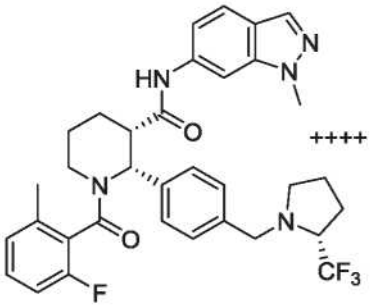
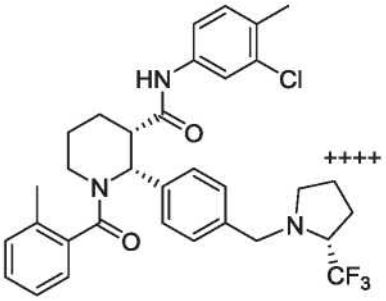
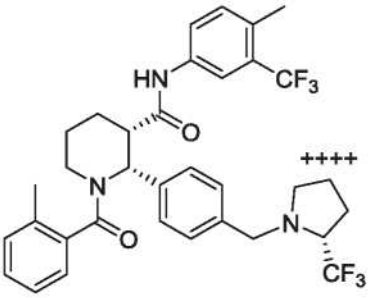
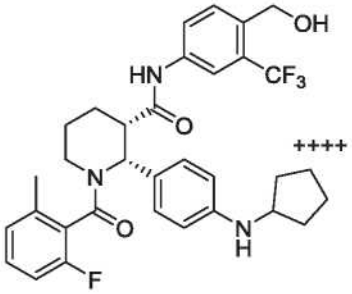
n.º	Estructura	Unión C5aR	n.º	Estructura	Unión C5aR
1.435		+++	1.438		++++
1.441		++++	1.445		++++
1.451		++++	1.452		++++
1.460		++++	1.495		+++

FIG. 1D

n.º	Estructura	Unión C5aR	n.º	Estructura	Unión C5aR
1.499		++++	1.536		++++
1.538		++++	1.543		++++