

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 634 693**

51 Int. Cl.:

C07D 413/12 (2006.01)

A61K 31/422 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.06.2014 PCT/EP2014/063243**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.12.2014 WO14206966**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.06.2014 E 14732206 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.04.2017 EP 3013817**

54 Título: **Derivados de espiro[2.4]heptano puenteados sustituidos con difluoroetil-oxazol como agonistas del receptor de ALX**

30 Prioridad:

25.06.2013 WO PCT/IB2013/055220

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

28.09.2017

73 Titular/es:

**IDORSIA PHARMACEUTICALS LTD (100.0%)
Hegenheimermattweg 91
4123 Allschwil, CH**

72 Inventor/es:

**CORMINBOEUF, OLIVIER;
CREN, SYLVAIN y
POZZI, DAVIDE**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 634 693 T3

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

DESCRIPCIÓN

Derivados de espiro[2.4]heptano puenteados sustituidos con difluoroetil-oxazol como agonistas del receptor de ALX

La presente invención se refiere a derivados de espiro[2.4]heptano puenteados sustituidos con difluoroetil-oxazol de fórmula (I) y a su uso como agentes farmacéuticos. La invención también se refiere a aspectos relacionados, que incluyen procedimientos para la preparación de los compuestos, composiciones farmacéuticas que contienen uno o más compuestos de fórmula (I), y en especial a su uso como agonistas del receptor de ALX (ALXR).

ALXR (también conocido como receptor de la lipoxina A4, FPRL1, FPR2; divulgado en el documento WO2003/082314 como la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO:1 y como la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2) es un miembro de la familia de receptores acoplados a la proteína G. Se ha descubierto que ALXR participa en la movilización del calcio en respuesta a una alta concentración del péptido formil-metionina-leucil-fenilalanina. Más aún, se descubrió que un metabolito lipídico, la lipoxina A4 (LXA4), y sus análogos, se unen al ALXR con alta afinidad y aumentan la producción de ácido araquidónico y la activación de proteína G en células transfectadas con ALXR (Chiang y col., *Pharmacol. Rev.*, 2006, 58, 463-487). Los efectos de la LXA4 se han evaluado en una diversidad de modelos animales de enfermedades; y se ha demostrado que la LXA4 tiene potentes actividades antiinflamatorias y proresolución. Los modelos de enfermedades en los que la LXA4, o sus derivados o análogos estables, demostraron actividades *in vivo* son, por ejemplo, inflamación dérmica, bolsa de aire dorsal, lesión por isquemia/reperfusión, peritonitis, colitis, nefritis mesangioproliferativa, pleuritis, asma, fibrosis quística, sepsis, lesión de córnea, angiogénesis, periodontitis, hiperalgesia inducida por carragenina y enfermedad de injerto contra huésped (EICH) (Schwab y Serhan, *Current Opinion in Pharmacology*, 2006, 414-420). La lipoxina A4 inhibió la expresión de IL-6 en sinoviocitos tipo fibroblastos humanos (Sodin-Semrl y col., *Int J Immunopathol Pharmacol* (2004) 17:15-25) y un agonista de FPR2 estable, BML-111, redujo la severidad de la artritis inducida por colágeno (Zhang y col., (2008) *Inflamm Res* 57:157-162), lo que demuestra un posible uso de los agonistas de FPR2 en el tratamiento de la artritis reumatoide. Los ratones con lesión pulmonar aguda (ALI) mostraron una reducción de la inflamación pulmonar cuando fueron tratados con lipoxina A4 estable (Jin y col., (2007) *Anesth Analg* 104:369-377). Se han descrito niveles más bajos de lipoxina A4 en el asma grave (Celik y col., (2007) *Clin Exp Allergy* 37:1494-1501; Planaguma y col., (2008) *Am J Respir Crit Care Med* 178:574-582) y una mejora en las respuestas del asma en modelos de animales por parte de análogos de lipoxina A4 estable (Levy y col., (2002) *Nat Med* 8:1018-1023; Levy y col., (2007) *FASEB J* 21:3877-3884). En la fibrosis quística se demostró que los niveles de lipoxina A4 pulmonar están disminuidos tanto en el pulmón de los pacientes con fibrosis quística como en modelos de animales de la enfermedad (Karp y col., (2004) *Nat Immunol* 5:388-392); el tratamiento con un análogo de lipoxina estable mejoró la acumulación de células inflamatorias dentro del pulmón enfermo y redujo la pérdida de peso corporal en los mismos animales (Karp y col., (2004) *Nat Immunol* 5:388-392). El tratamiento tópico con lipoxina A4 aumenta la reepitelización y disminuye la inflamación de la superficie de la córnea seca (Gronert, (2005) *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 73:221-229; Gronert y col., (2005) *J Biol Chem* 280:15267-15278), lo que demuestra un posible uso de los agonistas de FPR2 en el tratamiento de la queratoconjuntivitis seca. La administración oral de análogos de lipoxina A4 redujo la gravedad de la colitis en un modelo de enfermedad intestinal inflamatoria en ratones (Gewirtz y col., (2002) *Eicosanoids and other Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation, and Radiation Injury*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, 229-236). También se identificó al ALXR como un receptor funcional de diversos péptidos, incluyendo un fragmento de la proteína prión, un péptido derivado de la gp120 de la cepa del virus de inmunodeficiencia humana (VIH)-1_{LAI}, y beta amiloide 1-42 (Ab42) (para una recapitulación, véase Le y col., *Protein Pept Lett.*, 2007, 14, 846-853), y se ha sugerido que participa en la patogenia de la enfermedad de Alzheimer (EA) de diversas maneras cruciales (Yazawa y col., *FASEB J.*, 2001, 15, 2454-2462). La activación de ALXR en macrófagos y en células microgliales inicia una cascada de señalización mediada por la proteína G que aumenta la migración celular direccional, la fagocitosis y la liberación de mediadores. Estos acontecimientos pueden explicar el reclutamiento de células mononucleares en la cercanía de las placas seniles en las áreas enfermas del cerebro con EA, en el que se sobreproduce y se acumula Ab42. Aunque la acumulación de leucocitos en los sitios de lesión tisular se puede considerar una respuesta de huésped innata dirigida a la eliminación de agentes nocivos, los fagocitos mononucleares activados también liberan una diversidad de sustancias, tales como aniones de superóxido, que pueden ser tóxicas para las neuronas. De esta manera, el ALXR puede participar en las respuestas proinflamatorias generadas por Ab42 en el cerebro con EA y exacerbar la evolución de la enfermedad. Además, la humanina es un ligando de alta afinidad para el ALXR y es neuroprotector en modelos de enfermedad de Alzheimer (Mamiya y col., (2001) *Br J Pharmacol* 134:1597-1599; Ying y col., (2004) *J Immunol* 172:7078-7085; Miao y col., (2008) *Neuropeptides* 42:557-567).

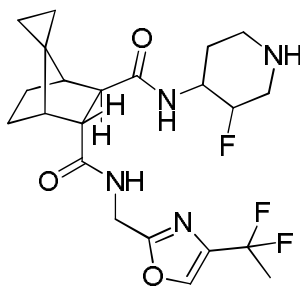
Las propiedades biológicas de los agonistas de ALXR incluyen, pero sin limitación, migración/ activación de células monocitos/macrófagos/microglía/dendríticas, migración/activación de neutrófilos, regulación de la activación, proliferación y diferenciación de linfocitos, regulación de la inflamación, regulación y/o liberación de citocinas, regulación de la producción y/o liberación de mediadores proinflamatorios, regulación de la reacción inmunitaria.

La presente invención proporciona derivados de espiro[2.4]heptano puenteados sustituidos con difluoroetil-oxazol, que son agonistas no peptídicos del receptor de ALX humano. Otros derivados de espiro[2.4]heptano puenteados con actividad agonista sobre el receptor de ALX humano se han divulgado en los documentos WO 2010/134014, WO2011/163502, WO2012/066488, WO2013/009543, WO2013/171694 y WO2013/171687. Se han divulgado

5 diferentes derivados de espiro[2.4]heptano puenteados en el documento WO95/02587. Los compuestos son útiles para la prevención o el tratamiento de enfermedades que responden a la modulación del receptor de ALX, tales como enfermedades inflamatorias, enfermedades obstructivas de las vías respiratorias, afecciones alérgicas, infecciones retrovirales mediadas por el VIH, trastornos cardiovasculares, neuroinflamación, trastornos neurológicos, dolor, enfermedades mediadas por priones y trastornos mediados por amiloides (en especial, la enfermedad de Alzheimer); asimismo, son útiles para la prevención o el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias y para la modulación de respuestas inmunitarias (en especial, aquellas generadas por la vacunación).

A continuación en el presente documento, se presentan diversas realizaciones de la invención:

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



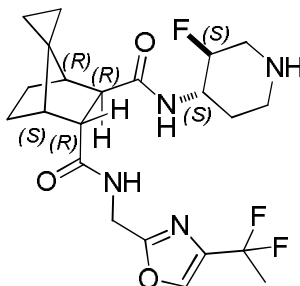
(I)

en la que los sustituyentes en el anillo piperidina están en disposición trans; y a las sales (en particular, las sales farmacéuticamente aceptables) de tales compuestos.

15 Para evitar cualquier duda, la configuración de los compuestos de fórmula (I) según una realización 1) es tal que los dos sustituyentes de amida en el resto espiro[2.4]heptano puenteados están en disposición trans y que el resto ciclopropilo está en relativa proximidad a la amida sustituida con piperidina (posición exo).

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

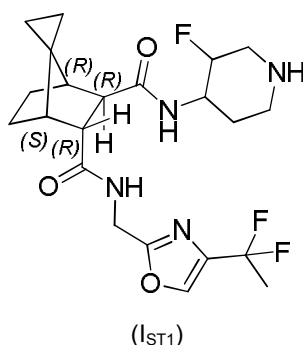
el estereoisómero puro de estructura



se denomina (1*S*,2*R*,3*R*,4*R*)-*N*²-((4-(1,1-difluoroetil)oxazol-2-il)metil)-*N*³-((3*S*,4*S*)-3-fluoropiperidin-4-il)espiro[biciclo[2.2.1]heptan-7,1'-ciclopropan]-2,3-dicarboxamida.

25 Los compuestos de fórmula (I) según la realización 1) pueden contener uno o más centros estereogénicos o asimétricos, tales como uno o más átomos de carbono asimétricos. Los sustituyentes en un doble enlace pueden estar presentes en la configuración (*Z*) o (*E*), a menos que se indique lo contrario. De este modo, los compuestos de fórmula (I) pueden estar presentes como mezclas de estereoisómeros o, preferentemente, como estereoisómeros puros. Las mezclas de estereoisómeros se pueden separar de una manera conocida por el especialista en la materia.

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



en la que los sustituyentes en el anillo de piperidina están en disposición trans;
y a las sales (en particular, las sales farmacéuticamente aceptables) de tales compuestos.

5 3) Un compuesto preferido de fórmula (I) según se define en la realización 1) es:

(1*S*,2*R*,3*R*,4*R*)-*N*²-((4-(1,1-difluoroetil)oxazol-2-il)metil)-*N*³-((3*S*,4*S*)-3-fluoropiperidin-4-il)espiro[biciclo[2.2.1]heptan-7,1'-ciclopropan]-2,3-dicarboxamida;
o una sal (en particular, una sal farmacéuticamente aceptable) de tal compuesto.

4) Otro compuesto preferido de fórmula (I) según se define en la realización 1) es:

10 (1*S*,2*R*,3*R*,4*R*)-*N*²-((4-(1,1-difluoroetil)oxazol-2-il)metil)-*N*³-((3*R*,4*R*)-3-fluoropiperidin-4-il)espiro[biciclo[2.2.1]heptan-7,1'-ciclopropan]-2,3-dicarboxamida;
o una sal (en particular, una sal farmacéuticamente aceptable) de tal compuesto.

La presente invención también incluye compuestos isotópicamente marcados, en especial los compuestos de fórmula (I) marcados con ²H (deuterio), compuestos que son idénticos a los compuestos de fórmula (I), salvo que uno o más átomos han sido reemplazados, cada uno, por un átomo que tiene el mismo número atómico pero una masa atómica diferente de la masa atómica encontrada habitualmente en la naturaleza. Los compuestos de fórmula (I) isotópicamente marcados, en especial los marcados con ²H (deuterio) y las sales de los mismos se encuentran dentro del alcance de la presente invención. La sustitución de hidrógeno con el isótopo ²H (deuterio) más pesado puede conducir a una mayor estabilidad metabólica, lo que da como resultado, por ejemplo, una mayor semivida *in vivo* o menores requisitos de dosificación, o puede conducir a una menor inhibición de las enzimas del citocromo P450, lo que da como resultado, por ejemplo, un mejor perfil de seguridad. En una realización de la invención, los compuestos de fórmula (I) no están marcados isotópicamente, están marcados únicamente con uno o más átomos de deuterio. En una subrealización, los compuestos de fórmula (I) no están marcados isotópicamente en absoluto. Los compuestos de fórmula (I) isotópicamente marcados se pueden preparar por analogía con los procedimientos descritos más adelante en el presente documento, pero usando una variante isotópica adecuada de los reactivos o materias primas.

La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales que conservan la actividad biológica deseada del presente compuesto y presentan mínimos efectos toxicológicos no deseados. Tales sales incluyen sales de adición de ácidos y/o bases inorgánicas u orgánicas, dependiendo de la presencia de grupos básicos y/o ácidos en el presente compuesto. A modo de referencia, véase, por ejemplo, 'Handbook of Pharmaceutical Salts. Properties, Selection and Use', de P. Heinrich Stahl, Camille G. Wermuth (Eds.), Wiley-VCH, 2008 y 'Pharmaceutical Salts and Co-crystals', de Johan Wouters y Luc Quére (Eds.), RSC Publishing, 2012.

Cuando se usa la forma plural para los compuestos, sales, composiciones farmacéuticas, enfermedades y similares, se pretende decir también un único compuesto, sal, composición farmacéutica, enfermedad o similar.

Los compuestos de fórmula (I) según una cualquiera de las realizaciones 1) a 4), o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, son adecuados para su uso como medicamentos. En particular, los compuestos de fórmula (I) modulan el receptor de ALX, es decir, actúan como agonistas del receptor de ALX, y son útiles para la prevención o el tratamiento de enfermedades que responden a la activación del receptor de ALX, tales como enfermedades inflamatorias, enfermedades obstructivas de las vías respiratorias, afecciones alérgicas, infecciones retrovirales mediadas por el VIH, trastornos cardiovasculares, neuroinflamación, trastornos neurológicos, dolor, enfermedades mediadas por priones, leucemias y trastornos mediados por amiloides (en especial, la enfermedad de Alzheimer); asimismo, son útiles para la modulación de respuestas inmunitarias (en especial, aquellas generadas por la vacunación).

En particular, los compuestos de fórmula (I) según una cualquiera de las realizaciones 1) a 4), o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, son adecuados para la prevención o el tratamiento de enfermedades seleccionadas entre enfermedades inflamatorias, enfermedades obstructivas de las vías respiratorias y afecciones alérgicas.

Las enfermedades inflamatorias, enfermedades obstructivas de las vías respiratorias y afecciones alérgicas incluyen, pero sin limitación, uno, varios o todos los siguientes grupos de enfermedades y trastornos:

1) Lesión pulmonar aguda (ALI); síndrome de dificultad respiratoria aguda/edema pulmonar fulminante (ARDS); enfermedad pulmonar obstructiva crónica, de las vías respiratorias o del pulmón (EPOC, COAD o COLD), incluyendo bronquitis crónica o disnea asociada a la misma; enfisema; así como la exacerbación de la hiperreactividad de las vías respiratorias consecuente de otra terapia farmacológica, en particular otra terapia farmacológica inhalatoria. En especial, las enfermedades inflamatorias, enfermedades obstructivas de las vías respiratorias y afecciones alérgicas incluyen EPOC, COAD y COLD.

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

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

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

5) En una realización adicional, los compuestos de fórmula (I) según una cualquiera de las realizaciones 1) a 4), o sus las farmacéuticamente aceptables de los mismos, son particularmente adecuados para la prevención o el tratamiento de enfermedades inflamatorias. Las enfermedades inflamatorias incluyen uno, varios o todos los siguientes grupos de enfermedades y trastornos:

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

5b) Otras enfermedades inflamatorias incluyen enfermedades cutáneas, tales como soriasis, dermatitis por contacto, dermatitis atópica, dermatitis herpetiforme, escleroderma, vasculitis por hipersensibilidad, urticaria, lupus eritematoso, lupus discoide y epidermólisis.

5c) Otras enfermedades inflamatorias también se refieren a enfermedades o afecciones que tienen un componente inflamatorio. Las enfermedades o afecciones que tienen un componente inflamatorio incluyen, pero sin limitación, enfermedades y afecciones que afectan al ojo, tales como uveítis (anterior, intermedia y posterior), uveítis del síndrome de Behçet, conjuntivitis, queratoconjuntivitis seca, síndrome de queratoconjuntivitis seca de Sjögren, y conjuntivitis primaveral; enfermedades que afectan a la nariz, incluyendo rinitis y rinitis alérgica (y especialmente rinitis alérgica); y enfermedades inflamatorias en las que están implicadas reacciones autoinmunitarias o que poseen un componente o una etiología autoinmunitaria, tales como lupus sistémico eritematoso, espondilitis anquilosante, síndrome de Behçet, síndrome de Sjögren, policondritis, escleroderma, granulomatosis de Wegener, arteritis de células gigantes, dermatosis neutrofílicas, dermatomiositis, hepatitis activa crónica, miastenia grave, síndrome de Stevens–Johnson, esprúe idiopático, enfermedad intestinal inflamatoria autoinmunitaria (por ejemplo, colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn), oftalmopatía endocrina, neumonitis crónica por hipersensibilidad, cirrosis biliar primaria, queratoconjuntivitis seca y queratoconjuntivitis primaveral, fibrosis pulmonar intersticial, artritis soriásica y glomerulonefritis.

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

Además, los compuestos de fórmula (I) según una cualquiera de las realizaciones 1) a 4), o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, son adecuados para la prevención o el tratamiento del rechazo al trasplante de órganos o tejidos, por ejemplo, para el tratamiento de los receptores de trasplantes de corazón, pulmón, corazón y pulmón combinados, hígado, riñón, páncreas, piel o córnea, y para la prevención de la enfermedad de injerto frente a huésped, tal como la que a veces se produce tras el trasplante de médula ósea, en particular, en el tratamiento del rechazo agudo o crónico de aloinjertos y xenoinjertos o en el trasplante de células productoras de insulina, por ejemplo, células de islotes pancreáticos.

Además, los compuestos de fórmula (I) según una cualquiera de las realizaciones 1) a 4), o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, son adecuados para la prevención o el tratamiento de infecciones retrovirales mediadas por el VIH. Las infecciones retrovirales mediadas por el VIH incluyen, pero sin limitación, uno, varios o todos los grupos de enfermedades y trastornos causados por las cepas VIH–1 y VIH–2, tales como GUN–4v, GUN–7wt, AG204, AG206, AG208, HCM305, HCM308, HCM342, mSTD104 y HCM309.

Además, los compuestos de fórmula (I) según una cualquiera de las realizaciones 1) a 4), o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, son adecuados para la prevención o el tratamiento de trastornos cardiovasculares. Los trastornos cardiovasculares se refieren a uno o más estados de enfermedad del árbol cardiovascular (incluyendo el corazón) y a enfermedades de los órganos dependientes. Los estados de enfermedad del árbol cardiovascular y las enfermedades de los órganos dependientes incluyen, pero sin limitación, trastornos del músculo cardíaco (cardiomiopatía o miocarditis), tales como cardiomiopatía idiopática, cardiomiopatía metabólica

que incluye cardiomiopatía diabética, cardiomiopatía alcohólica, cardiomiopatía inducida por fármacos, cardiomiopatía isquémica y cardiomiopatía hipertensiva; trastornos ateromatosos de los vasos sanguíneos mayores (enfermedades macrovasculares), tales como la aorta, las arterias coronarias, las arterias carótidas, las arterias cerebrovasculares, las arterias renales, las arterias ilíacas, las arterias femorales y las arterias poplíteas; trastornos tóxicos, inducidos por fármacos y metabólicos (incluidos hipertensivos y/o diabéticos) de los vasos sanguíneos pequeños (enfermedades microvasculares), tales como las arteriolas retinianas, las arteriolas glomerulares, los vasos nerviosos, las arteriolas cardíacas, y los lechos capilares asociados del ojo, el riñón, el corazón, y los sistemas nerviosos central y periférico; y la ruptura de placas de lesiones ateromatosas en vasos sanguíneos mayores, tales como la aorta, las arterias coronarias, las arterias carótidas, las arterias cerebrovasculares, las arterias renales, las arterias ilíacas, las arterias femorales y las arterias poplíteas.

Además, los compuestos de fórmula (I) según una cualquiera de las realizaciones 1) a 4), o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, son adecuados para la prevención o el tratamiento de la neuroinflamación. La neuroinflamación se refiere a producción de moléculas de señalización celular, activación de la glia o vías y respuestas de activación gliales, citocinas o quimiocinas proinflamatorias, activación de astrocitos o vías y respuestas de activación de astrocitos, activación de microglia o vías y respuestas de activación microgliales, respuestas relacionadas con estrés oxidativas tales como producción de óxido nítrico sintasa y acumulación de óxido nítrico, proteínas de fase aguda, pérdida de sinaptofisina y proteína post sináptica de densidad 95 (PSD-95), componentes de la cascada de complementos, pérdida o reducción de la función sináptica, actividad de la proteína quinasa (por ejemplo, actividad de la proteína quinasa asociada a la muerte), deficiencias conductuales, daño celular (por ejemplo, daño celular neuronal), muerte celular (por ejemplo, muerte celular neuronal), y/o deposición de β amiloide de placas amiloides.

Además, los compuestos de fórmula (I) según una cualquiera de las realizaciones 1) a 4), o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, son adecuados para la prevención o el tratamiento de trastornos neurológicos. En particular, los trastornos neurológicos incluyen, pero sin limitación, epilepsia, apoplejía, isquemia cerebral, parálisis cerebral, esclerosis múltiple remitente recurrente, esclerosis múltiple progresiva, neuromielitis óptica, síndrome clínicamente aislado, enfermedad de Alpers, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), demencia senil, demencia con cuerpos de Lewy, síndrome de Rett, traumatismo de médula espinal, lesión cerebral traumática, neuralgia del trigémino, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome de Guillain-Barré, neuralgia glossofaríngea, parálisis de Bell, miastenia grave, distrofia muscular, atrofia muscular progresiva, atrofia muscular bulbar progresiva hereditaria, síndromes de discos vertebrales herniados, rotos o prolapsados, espondilosis cervical, trastornos del plexo, síndromes de destrucción de salida torácica, neuropatías periféricas, deterioro cognitivo leve, deterioro cognitivo, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y corea de Huntington.

Además, los compuestos de fórmula (I) según una cualquiera de las realizaciones 1) a 4), o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, son adecuados para la prevención o el tratamiento del dolor. El dolor incluye, pero sin limitación, dolor neuropático ejemplificado por afecciones tales como neuropatía diabética, neuralgia postherpética, neuralgia del trigémino, polineuropatía diabética dolorosa, dolor postapoplejía, dolor postamputación, dolor mielopático o radiculopático, dolor facial atípico y síndromes tipo causalgia.

Además, los compuestos de fórmula (I) según una cualquiera de las realizaciones 1) a 4), o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, son adecuados para la prevención o el tratamiento de enfermedades mediadas por priones. Las enfermedades mediadas por priones, también conocidas como encefelopatías espongiiformes transmisibles (TSE), incluyen, pero sin limitación, kuru, síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (SGS), insomnio familiar letal (ILF) y enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ).

Además, los compuestos de fórmula (I) según una cualquiera de las realizaciones 1) a 4), o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, son adecuados para el tratamiento de trastornos mediados por amiloides. Los trastornos mediados por amiloides se definen como enfermedades y trastornos que son causados por amiloides o proteínas tipo amiloides, o que se asocian con ellos. Las enfermedades y los trastornos causados por amiloides o proteínas tipo amiloides, o que se asocian con ellos, incluyen, pero sin limitación, enfermedad de Alzheimer (AD), incluyendo enfermedades o afecciones caracterizadas por una pérdida de la capacidad cognitiva de la memoria, tales como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI); demencia con cuerpos de Lewy; síndrome de Down; hemorragia cerebral con amiloidosis. En otra realización, las enfermedades y los trastornos causados por amiloides o proteínas tipo amiloides, o que se asocian con ellos, incluyen parálisis supranuclear progresiva, amiloidosis de amiloide de cadena liviana, neuropatías amiloides familiares, esclerosis múltiple, enfermedad de Creutzfeldt Jakob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con el VIH, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), miositis de cuerpos de inclusión (IBM), diabetes de inicio en la edad adulta y amiloidosis cardíaca senil.

Además, los compuestos de fórmula (I) según una de las realizaciones 1) a 4), o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, son adecuados para la modulación de las respuestas inmunitarias. La modulación de las respuestas inmunitarias incluye, pero sin limitación, procedimientos basados en la administración a un sujeto de una composición de al menos un antígeno y al menos un compuesto de fórmula (I) según una cualquiera de las realizaciones 1) a 4), o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. En algunos casos, la composición que contiene el antígeno se administra primero, seguida de la administración de una composición de al menos un compuesto de fórmula (I) según una cualquiera de las realizaciones 1) a 4), o las sales farmacéuticamente

aceptables de los mismos. En otros casos, la composición que contiene el antígeno se administra en último lugar. Las diferentes composiciones se pueden administrar de manera simultánea, cercanas en secuencia, o separadas en el tiempo. Estos procedimientos y composiciones se proporcionan para fines de inmunización terapéutica y profiláctica (es decir, la deliberada provocación, potenciación, intensificación o modulación de una respuesta inmunitaria adaptativa y/o innata). Las ventajas particulares pueden incluir una o más de las siguientes:

- 1) una respuesta inmunitaria acelerada tras la administración de al menos un compuesto de fórmula (I) según una cualquiera de las realizaciones 1) a 4), o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, y el antígeno, en comparación con la administración del antígeno únicamente;
- 2) una mayor sensibilidad a pequeñas cantidades de antígeno (por ejemplo, una toxina o patógeno) o antígenos que habitualmente no inducen respuestas inmunitarias fuertes; y
- 3) terapias antitumorales más eficaces.

Además, los compuestos de fórmula (I) según una cualquiera de las realizaciones 1) a 4), o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, son adecuados para la prevención o el tratamiento de fibrosis quística, fibrosis pulmonar, hipertensión pulmonar, curación de heridas, nefropatía diabética, reducción de la inflamación en tejido trasplantado y enfermedades inflamatorias causadas por organismos patógenos.

En especial, los compuestos de fórmula (I) según una cualquiera de las realizaciones 1) a 4), o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, son adecuados para la prevención o el tratamiento de enfermedades seleccionadas entre uno, varios o todos los siguientes grupos de enfermedades y trastornos:

- 1) enfermedades inflamatorias, enfermedades obstructivas de las vías respiratorias y afecciones alérgicas tales como lesión pulmonar aguda (ALI); síndrome de dificultad respiratoria aguda/edema pulmonar fulminante (ARDS); enfermedad pulmonar obstructiva crónica, de las vías respiratorias o del pulmón (EPOC, COAD o GOLD), incluyendo bronquitis crónica o disnea asociada con la misma; y asma de cualquier tipo u origen, incluyendo asma intrínseca (no alérgica) y asma extrínseca (alérgica), asma leve, asma moderada, asma grave, asma bronquítica, asma inducida por ejercicio, asma ocupacional y asma inducida tras una infección bacteriana;
- 2) enfermedades inflamatorias tales como trastornos relacionados con los neutrófilos, en especial trastornos relacionados con los neutrófilos de las vías respiratorias, incluyendo hiperneutrofilia, ya que afecta a las vías respiratorias y/o los pulmones; periodontitis; glomerulonefritis; fibrosis quística; y enfermedades cutáneas, tales como soriasis, dermatitis por contacto, dermatitis atópica, dermatitis herpetiforme, escleroderma, vasculitis por hipersensibilidad, urticaria, lupus eritematoso y epidermólisis;
- 3) enfermedades que tienen un componente inflamatorio, tales como enfermedades y afecciones que afectan al ojo, tales como conjuntivitis, queratoconjuntivitis seca y conjuntivitis primaveral; enfermedades inflamatorias en las que están implicadas reacciones autoinmunitarias o que poseen un componente o una etiología autoinmunitaria; y enfermedad intestinal inflamatoria autoinmunitaria (por ejemplo, colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn);
- 4) infecciones retrovirales mediadas por el VIH, tales como enfermedades y trastornos causados por cepas VIH-1 y VIH-2, tales como GUN-4v, GUN-7wt, AG204, AG206, AG208, HCM305, HCM308, HCM342, mSTD104 y HCM309;
- 5) neuroinflamación, que se refiere a producción de moléculas de señalización celular, activación de glia o vías y respuestas de activación gliales, citocinas o quimiocinas proinflamatorias, activación de astrocitos o vías y respuestas de activación de astrocitos, activación de microglia o vías y respuestas de activación microgliales, respuestas relacionadas con estrés oxidativas tales como deposición de β amiloide de placas amiloides;
- 6) trastornos neurológicos, tales como apoplejía, isquemia cerebral, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson;
- 7) enfermedades mediadas por priones, también conocidas como encefalopatías espongiiformes transmisibles (TSE), tales como kuru, síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS), insomnio familiar letal (FFI) y enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD);
- 8) trastornos mediados por amiloides;
- 9) fibrosis quística, curación de heridas y enfermedades inflamatorias causadas por organismos patógenos.

Más preferentemente, los compuestos de fórmula (I) según una cualquiera de las realizaciones 1) a 4), o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, son adecuados para la prevención o el tratamiento de enfermedades seleccionadas entre el grupo que consiste en lesión pulmonar aguda (ALI); asma; fibrosis quística; queratoconjuntivitis seca; enfermedad intestinal inflamatoria; artritis reumatoide; y enfermedad de Alzheimer.

La invención también se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I) según una cualquiera de las realizaciones 1) a 4) para la preparación de composiciones farmacéuticas para el tratamiento y/o la profilaxis de las enfermedades mencionadas anteriormente.

La presente invención también se refiere a sales farmacéuticamente aceptables y a composiciones y formulaciones farmacéuticas de compuestos de fórmula (I) según una cualquiera de las realizaciones 1) a 4).

Una composición farmacéutica según la presente invención contiene al menos un compuesto de fórmula (I) según una cualquiera de las realizaciones 1) a 4) (o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo) como agente activo y

opcionalmente vehículos y/o diluyentes y/o adyuvantes.

Los compuestos de fórmula (I) según una cualquiera de las realizaciones 1) a 4) y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos se pueden usar como medicamentos, por ejemplo, en forma de composiciones farmacéuticas para administración entérica (tal como administración oral especialmente) o parenteral (incluida la aplicación tópica o inhalación).

La producción de las composiciones farmacéuticas se puede efectuar de una manera que sea conocida para cualquier experto en la materia (véase, por ejemplo, Remington, *The Science and Practice of Pharmacy*, 21ª edición (2005), Parte 5, “*Pharmaceutical Manufacturing*” [publicado por Lippincott Williams & Wilkins]) combinando los compuestos de fórmula (I) descritos, o sus sales farmacéuticamente aceptables, opcionalmente en combinación con otras sustancias terapéuticamente valiosas, hasta dar una forma de administración galénica junto con materiales de vehículo adecuados, no tóxicos, inertes, terapéuticamente compatibles, sólidos o líquidos, y, si así se desea, adyuvantes farmacéuticos útiles.

La presente invención también se refiere a un procedimiento para la prevención o el tratamiento de una enfermedad o trastorno mencionado en el presente documento, que comprende administrar a un sujeto una cantidad farmacéuticamente activa de un compuesto de fórmula (I) según una cualquiera de las realizaciones 1) a 4), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Toda referencia a un compuesto de fórmula I o I_{ST1} en este texto debe entenderse como una referencia también a las sales (y especialmente a las sales farmacéuticamente aceptables) de tales compuestos, según corresponda y resulte conveniente. Las preferencias indicadas para los compuestos de fórmula I por supuesto se aplican *mutatis mutandis* a los compuestos de fórmula I_{ST1}, así como a las sales y las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de fórmula I o de fórmula I_{ST1}. Lo mismo se aplica a estos compuestos como medicamentos, a composiciones farmacéuticas que contienen estos compuestos como principios activos o a los usos de estos compuestos para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de las enfermedades según la presente invención.

A menos que se use con referencia a temperaturas, el término “aproximadamente” (o alternativamente “alrededor de”), ubicado antes de un valor numérico “X”, se refiere en la presente solicitud a un intervalo que se extiende desde X menos el 10 % de X hasta X más el 10 % de X, y preferentemente a un intervalo que se extiende desde X menos el 5 % de X hasta X más el 5 % de X. En el caso particular de las temperaturas, el término “aproximadamente” (o alternativamente “alrededor de”), ubicado antes de una temperatura “Y”, se refiere en la presente solicitud a un intervalo que se extiende desde la temperatura Y menos 10 °C hasta Y más 10 °C, y preferentemente a un intervalo que se extiende desde Y menos 5 °C hasta Y más 5 °C. Además, el término “temperatura ambiente” (ta), según se usa en el presente documento, se refiere a una temperatura de aproximadamente 25 °C.

Siempre que se use el término “entre” para describir un intervalo numérico, se entiende que los puntos finales del intervalo indicado están explícitamente incluidos en el intervalo. Por ejemplo, si un intervalo de temperatura se describe como entre 40 °C y 80 °C, esto significa que los puntos finales 40 °C y 80 °C están incluidos en el intervalo; o si una variable se define como un número entero entre 1 y 4, esto significa que la variable es el número entero 1, 2, 3 o 4.

Los compuestos de fórmula (I) se pueden fabricar mediante los procedimientos proporcionados en los Ejemplos o mediante procedimientos análogos. Las condiciones de reacción óptimas pueden variar en función de los reactivos o disolventes particulares usados, pero tales condiciones podrán ser determinadas por el experto en la materia a través de procedimientos de optimización de rutina.

Parte experimental

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

Ac	acetilo
AcCN	acetonitrilo
AcOH	ácido acético
ac.	acuoso
Boc	<i>tert</i> -butoxicarbonilo
p.eb.	punto de ebullición
ca.	circa (aproximadamente)
COAD	enfermedad obstructiva crónica de las vías respiratorias
COLD	enfermedad obstructiva crónica del pulmón
EPOC	enfermedad pulmonar obstructiva crónica
DAD	detectador de matriz de diodos
DEA	dietilamina
Deoxo-Fluor	trifluoruro de bis(2-metoxietil)aminoazufre
DIPEA	diisopropiletilamina
DMEM	medio Eagle modificado por Dulbecco

	DMF	dimetilformamida
	DMSO	dimetilsulfóxido
	EA	acetato de etilo
	EC ₅₀	concentración semimáxima eficaz
5	EDC	N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etil-carbodiimida
	ELSD	detección por dispersión de luz evaporativa
	eq.	equivalente(s)
	Et	etilo
	Et ₂ O	dietiléter
10	Et ₃ N	trietilamina
	EtOH	etanol
	FC	cromatografía en columna ultrarrápida en gel de sílice
	FLIPR	lector de placas de imágenes fluorescentes
	FPRL1	receptor de formil-péptido tipo 1
15	FPRL2	receptor de formil-péptido tipo 2
	h	hora(s)
	Hank's BSS	solución salina equilibrada de Hank
	HEPES	ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazinetsulfónico
	hept	heptano
20	VIH	virus de inmunodeficiencia humana
	HOBt	hidroxibenzotriazol
	HPLC	cromatografía líquida de alto rendimiento
	IpAc	acetato de isopropilo
	LC-MS	cromatografía líquida - espectrometría de masas
25	lem	longitud de onda de emisión
	lex	longitud de onda de excitación
	Me	metilo
	MeOH	metanol
	min	minuto(s)
30	(m)M	(mili)molar
	μM	micromolar
	MPLC	cromatografía líquida de presión media
	MS	espectrometría de masas
	nm	nanómetro
35	nM	nanomolar
	RMN	resonancia magnética nuclear
	org.	orgánico
	p	para
	PG	grupo protector
40	rf	factor de retención
	rpm	revoluciones por minuto
	ta	temperatura ambiente
	sat.	saturado
	TFA	ácido trifluoroacético
45	THF	tetrahidrofurano
	TLC	cromatografía en capa fina
	TMS	trimetil-sililo
	t _R	tiempo de retención
	UV	ultravioleta
50	Vis	visible

I. Química

General. Todas las temperaturas se indican en grados Celsius (°C). A menos que se indique lo contrario, las reacciones se llevan a cabo a ta.

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

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

La MPLC se realizó usando columnas Isolute® SPE Flash SI II, de International Sorbent Technology, elución con EA, Et₂O, hept., hexano, CH₂Cl₂, CHCl₃, MeOH, NH₄OH o mezclas de los mismos.

Condiciones de LC-MS 01 (si no se indica lo contrario): analíticas: Thermo Finnigan MSQ Plus MS con bomba binaria Agilent 1100 y DAD. Columna: Zorbax SB-AQ 5 μm , 4,6 x 50 mm de DI de Agilent Technologies. Eluyentes: A: H_2O + 0,04 % de TFA; B: CH_3CN ; Gradiente: 5 % de B \rightarrow 95 % de B en 1 min. Flujo: 4,50 ml/min. Detección: UV/Vis y/o ELSD, y MS, t_R se proporciona en min.

- 5 Condiciones de LC-MS 02 (si no se indica lo contrario): analíticas: bomba binaria Dionex HPG-3000, MS: Thermo MSQ MS, DAD: dionex 3000RS, ELSD: Sedere Sedex 85. Columna: Atlantis T3, 5 μm , 4,6 x 30 mm de Waters, con termostato en el compartimento Dionex TCC-3200. Eluyentes: A: H_2O + 0,04 % de TFA; B: CH_3CN ; Gradiente: 5 % de B \rightarrow 95 % de B en 1,00 min. Flujo: 4,5 ml/min. Detección: UV/Vis y/o ELSD, y MS, t_R se proporciona en min.

- 10 Condiciones de LC-MS 03 (si no se indica lo contrario): analíticas: bomba: Dionex HPG-3200RS, MS: Thermo MSQ Plus, DAD: Dionex DAD-3000RS, ELSD: Sedere Sedex 85. Columna: Zorbax SB-AQ 3,5 μm , 4,6 x 50 mm de DI de Agilent Technologies, con termostato en el compartimento Dionex TCC-3200. Eluyentes: A: H_2O + 0,04 % de TFA; B: CH_3CN . Procedimiento: gradiente: 5 % de B \rightarrow 95 % de B en 1,00 min. Flujo: 4,5 ml/min. Detección: UV/Vis y/o ELSD, y MS, t_R se proporciona en min.

- 15 Condiciones de LC-MS 04 (si no se indica lo contrario): analíticas: bomba: Agilent _G4220A_, MS: Thermo MSQ Plus, DAD: Agilent _G4212A_, ELSD: Sedere Sedex 90. Columna: Zorbax SB-AQ 3,5 μm , 4,6 x 50 mm de DI de Agilent Technologies, con termostato en el compartimento Dionex TCC-3200. Eluyentes: A: H_2O + 0,04 % de TFA; B: CH_3CN . Elaboración del eluyente: $\text{CH}_3\text{CN} / \text{H}_2\text{O}$ 7:3 a 0,250 ml/min. Procedimiento: gradiente: 5 % de B \rightarrow 95 % de B en 1,07 min. Flujo: 4,5 ml/min. Detección: UV/Vis y/o ELSD, y MS, t_R se proporciona en min.

- 20 HPLC preparativa: X-Bridge C18 5 μm , 50 x 19 mm de DI de Waters. Eluyentes: A: H_2O + 0,5 % de NH_4OH ; B: CH_3CN ; Gradiente: 10 % de B \rightarrow 90 % de B en 5 min. Flujo: 40,0 ml/min. Detección: UV/Vis y/o ELSD, y MS, t_R se proporciona en min.

HPLC quiral, analítica: (*R,R*) Whelk-01 250 x 4,6 mm de DI, 5 μm . Eluyente A (80 %): heptano + 0,05 % de DEA. Eluyente B (20 %): etanol + 0,05 % de DEA. Flujo: 0,8 ml/min. Detección: UV/Vis, t_R se proporciona en min.

- 25 RMN: *Bruker Avance 400* (400 MHz); *Varian Mercury 300* (300 MHz); los desplazamientos químicos se proporcionan en ppm relativos al disolvente usado; multiplicidades: s = singlete, d = doblete, t = triplete, q = cuadruplete, p = pentuplete, hex = hexteto, hept = hepteto, m = multiplete, br = ancho; las constantes de acoplamiento se dan en Hz.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención, pero no limitan el alcance de la misma en absoluto.

Síntesis de intermediarios:

Procedimiento general A: desprotección de Boc

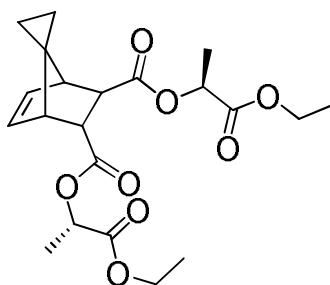
- 30 En un vial de vidrio, en atmósfera inerte (N_2), una solución de la amina Boc protegida (1,0 eq.) en CH_2Cl_2 se trató con HCl 4N en dioxano (10,0 eq.), y la mezcla de reacción se agitó a 0 $^\circ\text{C}$ o a ta hasta que se completó la reacción. La mezcla de reacción se concentró después a presión reducida, y el residuo se purificó, cuando fue necesario, por FC o HPLC para proporcionar el compuesto deseado.

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



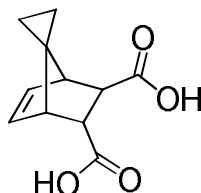
- 40 En un matraz de fondo redondo secado al fuego, equipado con barra de agitación magnética y en atmósfera inerte (N_2), una mezcla de cloruro de benciltriethylamonio (18,0 g, 78 mmol) en solución acuosa al 50 % de NaOH (1,2 l) se calentó hasta 45 $^\circ\text{C}$. Una solución enfriada de ciclopentadieno (formada por ruptura del dímero de ciclopentadieno a 180 $^\circ\text{C}$, 140 ml, 1,70 mol) en 1,2-dicloroetano (122 ml, 1,55 mol) se añadió a la solución agitada de NaOH mientras se mantenía la temperatura interna por debajo de 55 $^\circ\text{C}$. Tras completarse la adición (ca. 1,75 h), la mezcla de reacción se agitó a 50 $^\circ\text{C}$ durante 2 h y se dejó enfriar hasta ta. Las capas se separaron, la capa orgánica se lavó con 1M NaOH, se secó (Na_2SO_4) y se filtró. El líquido marrón en bruto se destiló a presión reducida (0,085 MPa-0,095 MPa (85-95 mbar)) y se obtuvo el compuesto del título en forma de líquido incoloro (bp = 45-50 $^\circ\text{C}$ a 0,008 MPa (80 mbar)). ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 6,58 (m, 2H), 6,19 (m, 2H), 1,71 (s, 4H).

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



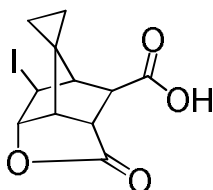
5 En un matraz de fondo redondo secado al fuego, equipado con barra de agitación magnética y en atmósfera inerte (N_2), a una solución de (*E*)-1,2-bis-(((1*S*)-1-etoxicarbonil)-etoxi-carbonil)-eteno (7,40 g, 22,7 mmol) en *n*-hexano (76 ml) se le añadió espiro[2.4]hepta-4,6-dieno (3,14 g, 34,0 mmol) a ta. La mezcla de reacción se agitó a esta temperatura durante una noche. La mezcla se concentró a presión reducida y el residuo en bruto se purificó por FC (hept/EA, 9:1). Se obtuvo el compuesto del título en forma de aceite amarillo pálido. TLC: rf (hept/EA, 9:1) = 0,25. Condiciones de LC-MS 01: t_R = 1,12 min; $[M+H]^+$ = 409,00. 1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 6,44 (dd, J = 5,5, 3,0 Hz, 1 H), 6,32 (dd, J = 5,5, 2,8 Hz, 1 H), 5,12 (q, J = 7,1 Hz, 1 H), 5,06 (q, J = 7,1 Hz, 1 H), 4,28-4,14 (m, 4 H), 3,76 (app, t, J = 4,0 Hz, 1 H), 2,92 (d, J = 4,8 Hz, 1 H), 2,86 (m, 1 H), 2,80 (m, 1 H), 1,55-1,47 (m, 6 H), 1,29 (t, J = 7,3 Hz, 3 H), 1,29 (t, J = 7,3 Hz, 3 H), 0,70 (m, 1 H), 0,56-0,44 (m, 3 H).

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



15 A una solución de (5*R*,6*R*)-5,6-bis-[(1-(1*S*)-etoxicarbonil)-etoxi-carbonil]- (4*S*,7*R*)-[4,7-etenilén-espiro[2.4]heptano] (9,51 g, 23,28 mmol) en THF/ H_2O (1:1, 232 ml) se le añadió LiOH (3,91 g, 93,13 mmol). La mezcla de reacción se agitó a ta durante una noche. Se añadió HCl 1N a fin de ajustar el pH de la mezcla de reacción a pH = 3, las capas se separaron y la capa acuosa se extrajo con EA (3x). Los extractos orgánicos combinados se secaron en $MgSO_4$, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo en bruto se purificó por FC (CH_2Cl_2 /MeOH, 9:1) para proporcionar el compuesto del título en forma de aceite incoloro. TLC: rf (CH_2Cl_2 /MeOH, 9:1) = 0,31. Condiciones de LC-MS 01: t_R = 0,72 min; $[M+CH_3CN+H]^+$ = 250,18.

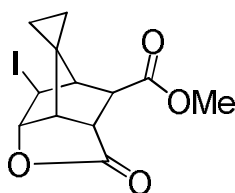
20 **Yodolactonización: formación de ácido 6-yodo-2-oxohexahidroespiro[3,5-metanciclopenta[b]furan-4,1'-ciclopropan]-7-carboxílico:**



25 A una solución de ácido (4*S*,7*R*)-[4,7-etenilén-espiro[2.4]heptan]- (5*R*,6*R*)-5,6-bis-carboxílico (5,60 g, 22,32 mmol) en CH_2Cl_2 (33 ml) se le añadió $NaHCO_3$ (2,06 g, 24,56 mmol), agua (100 ml), KI (1,37 g, 82,60 mmol) e I_2 (6,80 g, 26,79 mmol). La mezcla de reacción se agitó a ta durante 3 h. La reacción se interrumpió mediante la adición de solución acuosa saturada de $Na_2S_2O_3$. Las capas se separaron y la capa acuosa se extrajo con CH_2Cl_2 (3x). Los extractos orgánicos combinados se secaron en $MgSO_4$, se filtraron y se concentraron a presión reducida.

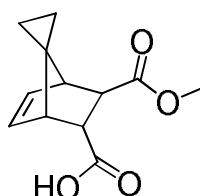
La espuma en bruto se purificó por FC (EA) para proporcionar el compuesto del título en forma de sólido blanco. TLC: rf (EA) = 0,33.

30 **Esterificación: formación de 6-yodo-2-oxohexahidroespiro[3,5-metanciclopenta[b]furan-4,1'-ciclopropan]-7-carboxilato de metilo:**



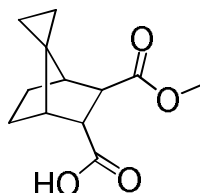
- 5 En un matraz de fondo redondo secado al fuego, equipado con barra de agitación magnética y en atmósfera inerte (N_2), a una solución de ácido 6-yodo-2-oxohexahidroespiro[3,5-metanciclopenta[b]furan-4,1'-ciclopropan]-7-carboxílico (5,00 g, 14,96 mmol) en MeOH seco (75 ml) se le añadió $TMSCH_2N_2$ (2,0 M en hexanos, 37,0 ml, 74,83 mmol). La mezcla de reacción se agitó a ta durante una noche, se concentró a presión reducida y se purificó por FC (hept/EA, 4:1) para proporcionar el compuesto del título en forma de sólido blanco. TLC: rf (hept/EA, 4:1) = 0,18.

Retro-yodolactonización: formación de ácido (6R)-6-metoxicarbonil-(4S,7R)-[4,7-etenilenespiro[2.4]heptan]-(5R)-5-carboxílico:



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

Reducción de doble enlace: formación de ácido (6R)-6-metoxicarbonil-(4S,7R)-[4,7-etilenespiro[2.4]heptan]-(5R)-5-carboxílico:



- 20 En un matraz de fondo redondo secado al fuego, equipado con barra de agitación magnética y en atmósfera inerte (N_2), una suspensión desoxigenada de ácido (6R)-6-metoxicarbonil-(4S,7R)-[4,7-etenilenespiro[2.4]heptan]-(5R)-5-carboxílico (220 mg, 0,99 mmol), Pd/C 10 % (44 mg) y ciclohexeno (0,20 ml, 1,98 mmol) en THF seco (2,5 ml) se agitó a reflujo durante 2 h. La mezcla de reacción se filtró a través de Celite, y la torta de filtración se lavó con THF. El filtrado se concentró a presión reducida, y se obtuvo el compuesto del título en forma de sólido blanco. TLC: rf (hept/EA, 2:3) = 0,48.

2-(clorometil)oxazol-4-carbaldehído:

- 30 En un matraz de fondo redondo secado al fuego, equipado con barra de agitación magnética y en atmósfera inerte (N_2), a una solución enfriada a -78 °C de 2-(clorometil)oxazol-4-carboxilato de metilo (25,00 g, 142,00 mmol) en CH_2Cl_2 (475 ml) se le añadió una solución 1M de hidruro de diisobutilaluminio en CH_2Cl_2 (285,00 ml, 285,00 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 3 horas a -78 °C. Se añadió metanol (125 ml) cuidadosamente, y la mezcla de reacción se calentó hasta ta. La mezcla de reacción se diluyó después con CH_2Cl_2 (500 ml) y se lavó con una solución acuosa saturada de sal de Rochelle. La capa orgánica se secó en $MgSO_4$, se filtró, y el disolvente se retiró a presión reducida para proporcionar el compuesto del título en forma de aceite color naranja. Condiciones de LC-MS 02: t_R = 0,40 min; $[M+CH_3CN+H]^+$ = 187,44.

35 **1-(2-(clorometil)oxazol-4-il)etanol:**

En un matraz de fondo redondo secado al fuego, equipado con barra de agitación magnética y en atmósfera inerte (N_2), una solución de 2-(clorometil)oxazol-4-carbaldehído (18,10 g, 124,36 mmol) en CH_2Cl_2 (625 ml) se trató a 0 °C con trimetilaluminio (311,00 ml de una solución 2M en heptano, 621,80 mmol). La mezcla de reacción se agitó después a 0 °C durante 60 min. Después se añadió solución acuosa saturada de NH_4Cl y la capa acuosa se extrajo

dos veces con CH₂Cl₂ y dos veces con EA. Los extractos orgánicos combinados se secaron en MgSO₄, se filtraron, y los disolventes se retiraron a presión reducida. El residuo en bruto se purificó por FC (hept/EA, 3:7), y se obtuvo el compuesto del título en forma de aceite amarillo. TLC: rf (hept/EA, 3:7) = 0,38. Condiciones de LC-MS 02: t_R = 0,43 min, [M+H]⁺ = 162,12.

5 **1-(2-(clorometil)oxazol-4-il)etanona:**

En un matraz de fondo redondo secado al fuego, equipado con barra de agitación magnética y en atmósfera inerte (N₂), una solución de 1-(2-(clorometil)oxazol-4-il)etanol (14,90 g, 92,20 mmol) en AcCN (458 ml) se trató a ta con MnO₂ (44,54 g, 461,00 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 5 horas a ta antes de filtrarse a través de Celite. El disolvente se retiró a presión reducida. El residuo en bruto se purificó por MPLC (hept/EA, 1:1), y se obtuvo el compuesto del título en forma de sólido blanco. TLC: rf (hept/EA, 1:1) = 0,50. Condiciones de LC-MS 02: t_R = 0,47 min, [M+H]⁺ = 160,11.

2-(clorometil)-4-(1,1-difluoroetil)oxazol:

En un matraz de fondo redondo secado al fuego, equipado con barra de agitación magnética y en atmósfera inerte (N₂), 1-(2-(clorometil)oxazol-4-il)etanona (1,55 g, 9,71 mmol) en CH₂Cl₂ (2,5 ml) se trató con Deoxo-Fluor (14,30 ml de una solución al 50 % en tolueno, 38,90 mmol) y se agitó a 45 °C durante 72 horas. La solución se enfrió hasta 0 °C, se añadió NaOH 1M acuoso (35 ml) cuidadosamente (exotérmico), y la mezcla resultante se diluyó con CH₂Cl₂. Las capas se separaron y la capa orgánica se lavó con solución acuosa saturada de NaCl y agua, se secó en MgSO₄, se filtró y el disolvente se retiró a presión reducida. El residuo se purificó por FC (hept/lpAc 5:1) para proporcionar el compuesto del título en forma de aceite amarillo. Condiciones de LC-MS 03: t_R = 0,72 min, [M+H]⁺ = 182,06.

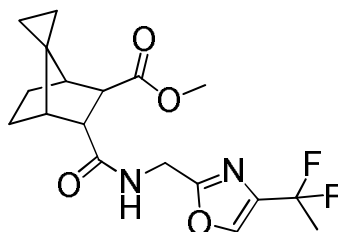
2-(azidometil)-4-(1,1-difluoroetil)oxazol:

En un matraz de fondo redondo, equipado con barra de agitación magnética y en atmósfera inerte (N₂), se añadió azida sódica (380 mg, 5,78 mmol) a una solución de 2-(clorometil)-4-(1,1-difluoroetil)oxazol (1,00 g, 5,51 mmol) en DMF (25 ml) y se calentó hasta 80 °C durante 4 horas. La mezcla de reacción se diluyó con agua y se extrajo con Et₂O. La fase orgánica se secó en MgSO₄, se filtró y el disolvente se retiró a presión reducida para proporcionar el compuesto del título en forma de aceite amarillo. Condiciones de LC-MS 04: t_R = 0,73 min, [M+H]⁺ = 189,35.

(4-(1,1-difluoroetil)oxazol-2-il)metanamina:

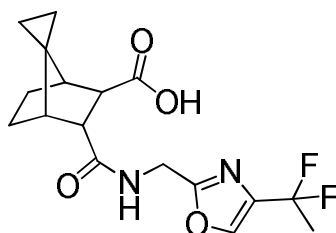
En un matraz de fondo redondo, equipado con barra de agitación magnética y condensador, a una solución de 2-(azidometil)-4-(1,1-difluoroetil)oxazol (1,253 g, 6,66 mmol) en THF (90 ml) se le añadió trifenilfosfina en poliestireno (1,60 mmol/g, malla de 100-200, 2,096 g, 7,99 mmol) y agua (5 ml). La mezcla resultante se calentó hasta 60 °C durante 3 horas. La mezcla se filtró y el filtrado se secó en MgSO₄, se filtró y el disolvente se retiró a presión reducida para proporcionar el compuesto del título. Condiciones de LC-MS 04: t_R = 0,24 min, [M+H]⁺ = 163,21.

Acoplamiento con (4-(1,1-difluoroetil)oxazol-2-il)metanamina: formación de 3-(((4-(1,1-difluoroetil)oxazol-2-il)metil)carbamoil)espiro[biciclo[2.2.1]heptan-7,1'-ciclopropan]-2-carboxilato de (1R,2R,3R,4S)-metilo:



En un matraz de fondo redondo secado al fuego, equipado con barra de agitación magnética y en atmósfera inerte (N₂), a una solución de ácido (6R)-6-metoxicarbonil-(4S,7R)-[4,7-etilen-espiro[2.4]heptan]-5-carboxílico (1,00 g, 4,46 mmol) en CH₂Cl₂ seco (16 ml) se le añadieron 3 gotas de DMF y cloruro de oxalilo (0,426 ml, 4,93 mmol). La mezcla de reacción se agitó a ta durante 60 minutos y se concentró a presión reducida. A una solución de (4-(1,1-difluoroetil)oxazol-2-il)metanamina (0,723 g, 4,46 mmol) en piridina (1,08 ml) se le añadió una solución de cloruro de acilo en acetona (6 ml). La mezcla de reacción se agitó a ta durante 1 h, se diluyó con EA y se lavó sucesivamente con HCl 1N acuoso, NaHCO₃ acuoso saturado y salmuera. La capa orgánica se secó en MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por FC (hept → hept/EA, 7:3) para proporcionar el compuesto del título en forma de aceite amarillo. Condiciones de LC-MS 04: t_R = 0,84 min; [M+H]⁺ = 369,20.

45 **Ácido (1R,2R,3R,4S)-3-(((4-(1,1-difluoroetil)oxazol-2-il)metil)carbamoil)espiro[biciclo[2.2.1]heptan-7,1'-ciclopropan]-2-carboxílico:**



A una solución de 3-(((4-(1,1-difluoroetil)oxazol-2-il)metil)carbamoil)espiro[biciclo[2.2.1]heptan-7,1'-ciclopropan]-2-carboxilato de (1R,2R,3R,4S)-metilo (1,27 g, 3,45 mmol) en THF (20 ml) se le añadió NaOH 2N acuoso (16,00 ml, 32,00 mmol). La mezcla de reacción se agitó a ta hasta que se completó la reacción. La mezcla se vertió después en HCl 1N acuoso y se extrajo con EA (3x). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron en MgSO₄, se filtraron, y se concentraron a presión reducida para proporcionar el compuesto del título en forma de espuma de color blanco. Condiciones de LC-MS 04: t_R = 0,75 min; [M+H]⁺ = 355,25.

3-fluoro-4-oxopiperidin-1-carboxilato de *terc*-butilo:

En un matraz de fondo redondo secado al fuego, equipado con barra de agitación magnética y en atmósfera inerte (N₂), a una solución de 4-oxopiperidin-1-carboxilato de *terc*-butilo (5,00 g, 25,09 mmol) en DMF seca (25 ml) se le añadió cloruro de trimetilsililo (5,77 ml, 45,17 mmol), seguido de Et₃N (8,38 ml, 60,23 mmol) a ta. La mezcla de reacción se agitó a 80 °C durante 24 h. La mezcla luego se enfrió hasta ta, se diluyó con hexanos y se lavó con NaHCO₃ acuoso saturado. Las capas se separaron y la capa orgánica se secó en MgSO₄, se filtró, y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por FC (hexanos/EA, 9:1) para proporcionar 4-((trimetilsilil)oxi)-5,6-dihidropiperidin-1(2H)-carboxilato de *terc*-butilo en forma de aceite incoloro. TLC: rf (hexanos/EA, 9:1) = 0,50.

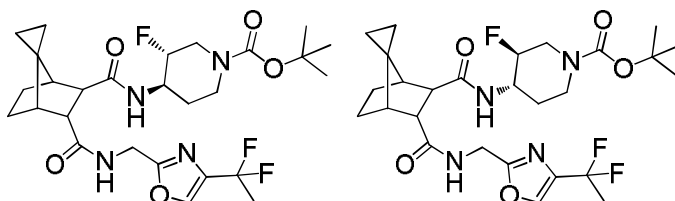
En un matraz de fondo redondo secado al fuego, equipado con barra de agitación magnética y en atmósfera inerte (N₂), a una solución de 4-((trimetilsilil)oxi)-5,6-dihidropiperidin-1(2H)-carboxilato de *terc*-butilo (5,00 g, 18,40 mmol) en acetonitrilo seco (25 ml) se le añadió ditetrafluoroborato de 1-(clorometil)-4-fluoro-1,4-diazoniabicyclo[2.2.2]octano (7,55 g, 20,3 mmol) a ta. La mezcla de reacción se agitó a ta durante 2 horas, después se vertió en EA y se lavó sucesivamente con NaHCO₃ al 1 % acuoso y salmuera. La capa orgánica se secó en MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por FC (hexanos/EA, 4:1) para proporcionar el compuesto del título en forma de sólido de color amarillo pálido. Condiciones de LC-MS 03: t_R = 0,55 min; [M-CH₃+H]⁺ = 203,23; TLC: rf (hexanos/EA, 4:1) = 0,17.

4-amino-3-fluoropiperidin-1-carboxilato de *trans-terc*-butilo y 4-amino-3-fluoropiperidin-1-carboxilato de *cis-terc*-butilo:

En un matraz de fondo redondo secado al fuego, equipado con barra de agitación magnética y en atmósfera inerte (N₂), a una solución de 3-fluoro-4-oxopiperidin-1-carboxilato de *terc*-butilo (0,80 g, 3,68 mmol) en MeOH (10 ml) se le añadió acetato de amonio (1,99 g, 25,80 mmol), y la solución resultante se agitó a ta durante 2 horas. Después se añadió NaCNBH₃ (0,29 g, 4,42 mmol), y la solución se agitó a ta durante la noche. La mezcla de reacción se concentró hasta la sequedad y los orgánicos se extrajeron con EA a partir de una solución acuosa al 1 % de Na₂CO₃. Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron en MgSO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó con FC (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1) para proporcionar 4-amino-3-fluoropiperidin-1-carboxilato de *trans-terc*-butilo como primer diastereómero de elución y 4-amino-3-fluoropiperidin-1-carboxilato de *cis-terc*-butilo como segundo diastereómero de elución, ambos en forma de aceites incoloros, que se solidificaron tras dejarse en reposo. Diastereómero *trans*: condiciones de LC-MS 03: t_R = 0,48 min; [M-CH₃+H]⁺ = 204,25; TLC: rf (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1) = 0,30. Diastereómero *cis*: condiciones de LC-MS 03: t_R = 0,46; [M+H]⁺ = 219,26; TLC: rf (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1) = 0,09.

Preparación de los Ejemplos:

4-(((1R,2R,3R,4S)-3-(((4-(1,1-difluoroetil)oxazol-2-il)metil)carbamoil)espiro[biciclo[2.2.1]heptan-7,1'-ciclopropan]-2-il)carboxamido)-3,4-*trans*-fluoropiperidin-1-carboxilato de *terc*-butilo:



En un matraz de fondo redondo secado al fuego, equipado con barra de agitación magnética y en atmósfera inerte (N₂), a una solución de ácido (1R,2R,3R,4S)-3-(((4-(1,1-difluoroetil)oxazol-2-il)metil)carbamoil)espiro[biciclo[2.2.1]heptan-7,1'-ciclopropan]-2-carboxílico (0,200 g, 0,564 mmol) en CH₂Cl₂ (8,5

ml) se le añadió 4-amino-3-fluoropiperidin-1-carboxilato de *trans-terc*-butilo (0,148 g, 0,677 mmol), EDC.HCl (0,224 g, 1,130 mmol), HOBt (0,092 g, 0,68 mmol) y DIPEA (0,29 ml, 1,69 mmol). La mezcla de reacción se agitó a ta hasta que se completó la reacción. Después se añadió agua, las capas se separaron, y la capa orgánica se secó en MgSO₄, se filtró, y se concentró a presión reducida. Los diastereómeros se separaron por FC (EA/hexanos, 7:3). Primer diastereómero de elución: condiciones de LC-MS 04: t_R = 0,90 min; [M+H]⁺ = 555,29; TLC: rf (hexanos/EA, 3:7) = 0,54. Segundo diastereómero de elución: condiciones de LC-MS 04: t_R = 0,90 min; [M+H]⁺ = 555,30; TLC: rf (hexanos/EA, 3:7) = 0,35.

Ejemplo 1: (1*S*,2*R*,3*R*,4*R*)-*N*²-((4-(1,1-difluoroetil)oxazol-2-il)metil)-*N*³-(*trans*-3-fluoropiperidin-4-il)espiro[biciclo[2.2.1]heptan-7,1'-ciclopropan]-2,3-dicarboxamida (diastereoisómero 1):

10 Siguiendo el procedimiento general A, partiendo del primer diastereoisómero de elución 4-((1*R*,2*R*,3*R*,4*S*)-3-(((4-(1,1-difluoroetil)oxazol-2-il)metil)carbamoil)espiro[biciclo[2.2.1]heptan-7,1'-ciclopropan]-2-ilcarboxamido)-3,4-*trans*-fluoropiperidin-1-carboxilato de *terc*-butilo. Condiciones de LC-MS 04: t_R = 0,62 min; [M+H]⁺ = 455,28. HPLC quiral, analítica: t_R = 15,91 min.

Ejemplo 2: (1*S*,2*R*,3*R*,4*R*)-*N*²-((4-(1,1-difluoroetil)oxazol-2-il)metil)-*N*³-(*trans*-3-fluoropiperidin-4-il)espiro[biciclo[2.2.1]heptan-7,1'-ciclopropan]-2,3-dicarboxamida (diastereoisómero 2):

15 Siguiendo el procedimiento general A, partiendo del segundo diastereoisómero de elución, 4-((1*R*,2*R*,3*R*,4*S*)-3-(((4-(1,1-difluoroetil)oxazol-2-il)metil)carbamoil)espiro[biciclo[2.2.1]heptan-7,1'-ciclopropan]-2-ilcarboxamido)-3,4-*trans*-fluoropiperidin-1-carboxilato de *terc*-butilo. Condiciones de LC-MS 04: t_R = 0,61 min; [M+H]⁺ = 455,29. HPLC quiral, analítica: t_R = 13,043 min.

20 II. Ensayos biológicos

Ensayo FLIPR (receptor de ALX)

Procedimiento experimental:

Mediciones de calcio intracelular:

25 Las células que expresan el receptor de ALX humano recombinante y la proteína G Gα16 (HEK293-hALXR-Gα16) se cultivaron hasta el 80 % de confluencia en medio de crecimiento (GM). Las células se separaron de las placas de cultivo con un tampón de disociación celular (Invitrogen, 13151-014) y se recogieron por centrifugación a 1.000 rpm a ta durante 5 minutos en tampón de ensayo (AB) (partes iguales de BSS de Hank (Gibco, 14065-049) y DMEM sin rojo fenol (Gibco, 11880-028)). Después de 60 minutos de incubación a 37 °C en el 5 % de CO₂ en AB suplementado con 1 μM de Fluo-4 (AM) (Invitrogen, F14202) y 20 mM de HEPES (Gibco, 15630-056), las células se lavaron y se resuspendieron en AB. Después se sembraron en placas de ensayo FLIPR de 384 pocillos (Greiner, 781091) a razón de 50.000 células en 70 μl por pocillo y se sedimentaron por centrifugación a 1.000 rpm durante 1 min. Se prepararon soluciones madre de los compuestos de ensayo a una concentración de 10 mM en DMSO, y se diluyeron en serie en AB hasta las concentraciones requeridas para las curvas de respuesta a la dosis de activación. Se usó WKYMVm (Phoenix Peptides) como agonista de referencia. Se operó un instrumento FLIPR Tetra (Molecular Devices) según las instrucciones estándar del fabricante, añadiendo 4 μl del compuesto de ensayo disuelto a 10 mM en DMSO y diluido antes del experimento en tampón de ensayo para obtener la concentración final deseada. Los cambios en la fluorescencia se supervisaron antes y después de la adición de los compuestos de ensayo a lex=488 nm y lem=540 nm. Los valores pico de emisión sobre el nivel de base tras la adición de los compuestos se exportaron tras la sustracción del valor basal. Los valores se normalizaron a un control de alto nivel (compuesto WKYMVm, concentración final de 10 nM) tras la sustracción del valor basal (adición de AB).

40 Las actividades agonistas con respecto al receptor de ALX (valores de EC₅₀, mediana de n réplicas) de los compuestos ejemplificados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1

Compuesto	EC ₅₀ [nM]
<i>Ejemplo 1:</i> (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)- <i>N</i> ² -((4-(1,1-difluoroetil)oxazol-2-il)metil)- <i>N</i> ³ -(<i>trans</i> -3-fluoropiperidin-4-il)espiro[biciclo[2.2.1]heptan-7,1'-ciclopropan]-2,3-dicarboxamida (diastereómero 1)	6.6 (n = 6)
<i>Ejemplo 2:</i> (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)- <i>N</i> ² -((4-(1,1-difluoroetil)oxazol-2-il)metil)- <i>N</i> ³ -(<i>trans</i> -3-fluoropiperidin-4-il)espiro[biciclo[2.2.1]heptan-7,1'-ciclopropan]-2,3-dicarboxamida (diastereoisómero 2)	3.6 (n = 8)

Ensayo FLIPR (receptor de FPR1)Procedimiento experimental:**Mediciones de calcio intracelular:**

5 Las células que expresan el receptor de FPR1 humano recombinante y la proteína G Gα16 (HEK293-hFPR1-Gα16) se cultivaron hasta el 80 % de confluencia en medio de crecimiento (GM). Las células se separaron de las placas de cultivo con un tampón de disociación celular (Invitrogen, 13151-014) y se recogieron por centrifugación a 1.000 rpm a ta durante 5 minutos en tampón de ensayo (AB) (partes iguales de BSS de Hank (Gibco, 14065-049) y DMEM sin rojo fenol (Gibco, 11880-028)). Después de 60 minutos de incubación a 37 °C en el 5 % CO₂ en AB suplementado con 1 μM de Fluo-4 (AM) (Invitrogen, F14202) y 20 mM de HEPES (Gibco, 15630-056), las células se lavaron y se resuspendieron en AB. Después se sembraron en placas de ensayo FLIPR de 384 pocillos (Greiner, 781091) a razón de 50.000 células en 70 μl por pocillo, y se sedimentaron por centrifugación a 1.000 rpm durante 1 min. Se prepararon soluciones madre de los compuestos de ensayo a una concentración de 10 mM en DMSO, y se diluyeron en serie en AB hasta las concentraciones requeridas para las curvas de respuesta a la dosis de activación. Se usó WKYMVm (Phoenix Peptides) como agonista de referencia. Se operó un instrumento FLIPR Tetra (Molecular Devices) según las instrucciones estándar del fabricante, añadiendo 4 μl del compuesto de ensayo disuelto a 10 mM en DMSO y diluido antes del experimento en tampón de ensayo para obtener la concentración final deseada. Los cambios en la fluorescencia se monitorearon antes y después de la adición de los compuestos de ensayo a lex=488 nm y lem=540 nm. Los valores pico de emisión sobre el nivel de base tras la adición de los compuestos se exportaron tras la sustracción del valor basal. Los valores se normalizaron a un control de alto nivel (compuesto WKYMVm, concentración final de 10 nM) tras la sustracción del valor basal (adición de AB).

Las actividades agonistas con respecto al receptor de FPR1 (valores de EC₅₀, mediana de n réplicas) de los compuestos ejemplificados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2

Compuesto	EC₅₀ [nM]
<i>Ejemplo 1:</i> (1S,2R,3R,4R)-N²-((4-(1,1-difluoroetil)oxazol-2-il)metil)-N³-(trans-3-fluoropiperidin-4-il)espiro[biciclo[2.2.1]heptan-7,1'-ciclopropan]-2,3-dicarboxamida (diastereómero 1)	> 6000 (n = 4)
<i>Ejemplo 2:</i> (1S,2R,3R,4R)-N²-((4-(1,1-difluoroetil)oxazol-2-il)metil)-N³-(trans-3-fluoropiperidin-4-il)espiro[biciclo[2.2.1]heptan-7,1'-ciclopropan]-2,3-dicarboxamida (diastereoisómero 2)	> 7000 (n = 5)

25 Ensayo de estabilidad en plasma

El suero de rata o humano, ajustado a pH 7,4 con ácido láctico o hidróxido de amonio, se equilibró a 37 °C en agitación orbital en una incubadora que contenía el 5 % de CO₂. La reacción se inició mediante la adición de 1 μM de los compuestos (1 μl de solución madre 1 mM en DMSO en 999 μl de plasma). Al cabo de 0,01 h, 0,25 h, 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h y 6 h, se transfirieron alícuotas (30 μl) en una placa de 96 pocillos que contenía 90 μl de MeOH colocada sobre hielo para detener la reacción. Después de someter a vórtex durante 20 minutos a 1.400 rpm en una termomezcladora Eppendorf, las placas se centrifugaron a 3.220 g durante 20 minutos a 4 °C, y los sobrenadantes se analizaron por LC-MS/MS. Se prepararon muestras de calibración en suero que contenían el 0,1 % de diclorvos (2,2-diclorovinildimetil fosfato) y se analizaron en paralelo hasta las muestras de incubación para permitir la cuantificación. Después se calcularon las semividas (T_{1/2}) en horas. Además, se determinó la concentración restante del respectivo compuesto después del tiempo T_{last} relativo a la concentración del comienzo (Tabla 3).

Tabla 3: estabilidad en suero

compuesto	número de réplicas	especie	T _{1/2} [h]	T _{last} [h]	concentración restante a T _{last} [%]
<i>Ejemplo 1</i>	1	humano	>6	6	97
<i>Ejemplo 1</i>	1	rata	>6	6	>100

(continuación)

<i>compuesto</i>	número de réplicas	especie	T1/2 [h]	Tlast [h]	concentración restante a Tlast [%]
<i>Ejemplo 2</i>	1	humano	>6	6	>100
<i>Ejemplo 2</i>	1	rata	>6	6	>100

Ensayo de unión a proteínas plasmáticas

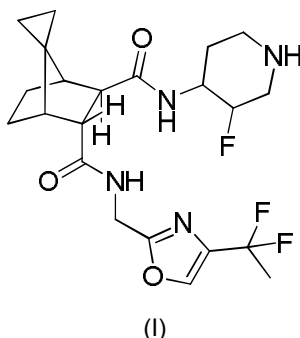
- 5 Los compuestos se añadieron a plasma humano ajustado a pH 7,4 con ácido láctico o hidróxido de amonio (concentración final de 1 μ M) y se dializaron mediante instrumentos de RED (diálisis de equilibrio rápida) frente a solución salina con tampón de fosfato (0,1 M fosfato de sodio y 0,15M cloruro de sodio) 0,1 M, pH 7,4 durante 4 horas a 37 °C en una incubadora que contenía el 5 % de CO₂. Después de la diálisis, se diluyó una alícuota de plasma y tampón con igual volumen de la matriz opuesta para anular el efecto de la matriz, y se preparó una calibración en la matriz mixta. Se transfirieron alícuotas de muestras y calibraciones (30 μ l) a una placa de 96 pocillos que contenía 90 μ l de MeOH para precipitar las proteínas. Después de someter a vórtex durante 20 minutos a 1400 rpm en una termomezcladora Eppendorf, las placas se centrifugaron en 3.220 g durante 20 min a 4 °C y los sobrenadantes se analizaron por LC-MS/MS. Las concentraciones del analito se usaron para el cálculo de la fracción unida al plasma. Se corrió propranolol [(±)-1-isopropilamino-3-(1-naftiloxi)-2-propanol], un compuesto de referencia, en paralelo.

compuesto	número de réplicas	especie	unión a proteínas plasmáticas (%)
<i>Ejemplo 1</i>	3	Humana	54,8
<i>Ejemplo 1</i>	3	Rata	50,7
<i>Ejemplo 2</i>	3	Humana	63,8
<i>Ejemplo 2</i>	3	Rata	47,7

15

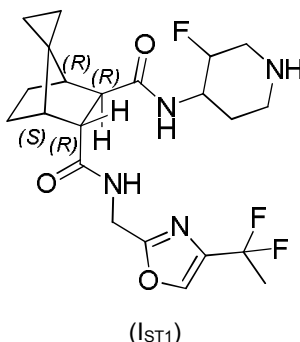
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I):



5 en la que los sustituyentes en el anillo piperidina están en disposición trans; o una sal de dicho compuesto.

2. Un compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 1, que también es un compuesto de fórmula (I_{ST1}):



10 en la que los sustituyentes en el anillo piperidina están en disposición trans; o una sal de dicho compuesto.

3. Un compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 1, en el que el compuesto es (1*S*,2*R*,3*R*,4*R*)-*N*²-((4-(1,1-difluoroetil)oxazol-2-il)metil)-*N*³-((3*S*,4*S*)-3-fluoropiperidin-4-il)espiro[biciclo[2.2.1]heptan-7,1'-ciclopropan]-2,3-dicarboxamida;

15 o una sal de dicho compuesto.

4. Un compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 1, en el que el compuesto es (1*S*,2*R*,3*R*,4*R*)-*N*²-((4-(1,1-difluoroetil)oxazol-2-il)metil)-*N*³-((3*R*,4*R*)-3-fluoropiperidin-4-il)espiro[biciclo[2.2.1]heptan-7,1'-ciclopropan]-2,3-dicarboxamida;

o una sal de dicho compuesto.

20 5. Un compuesto de fórmula (I) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso como medicamento.

6. Una composición farmacéutica que contiene, como principio activo, un compuesto de fórmula (I) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y al menos un excipiente terapéuticamente inerte.

25 7. El uso de un compuesto de fórmula (I) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de una enfermedad seleccionada entre enfermedades inflamatorias, enfermedades obstructivas de las vías respiratorias, afecciones alérgicas, infecciones retrovirales mediadas por el VIH, trastornos cardiovasculares, neuroinflamación, trastornos neurológicos, dolor, enfermedades mediadas por priones y trastornos mediados por amiloides; y para la modulación de las respuestas inmunitarias.

30 8. Un compuesto de fórmula (I) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad seleccionada entre enfermedades inflamatorias, enfermedades obstructivas de las vías respiratorias, afecciones alérgicas, infecciones retrovirales mediadas por el VIH, trastornos cardiovasculares, neuroinflamación, trastornos neurológicos, dolor, enfermedades mediadas por priones y trastornos mediados por amiloides; y para la modulación de las respuestas inmunitarias.