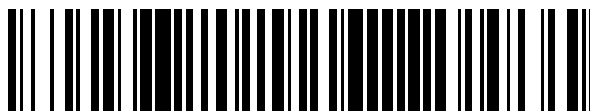


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 522 317**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/519** (2006.01)

**A61P 9/00** (2006.01)

**A61P 9/10** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.12.2008** **E 08857354 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.09.2014** **EP 2229172**

54 Título: **Ticagrelor para tratamiento de aneurismas aórticos abdominales**

30 Prioridad:

**03.12.2007 EP 07301616**

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

**14.11.2014**

73 Titular/es:

**ASTRAZENECA AB (100.0%)**  
**151 85 Södertälje, SE**

72 Inventor/es:

**MICHEL, JEAN-BAPTISTE**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

ES 2 522 317 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

Ticagrelor para tratamiento de aneurismas aórticos abdominales

Campo de la Invención

La presente invención se dirige al uso de un antagonista del receptor  $P2Y_{12}$  (también conocido como  $P2T$ ,  $P2Y_{ADP}$  o  $P2T_{AC}$ ) en el tratamiento de aneurismas aórticos abdominales.

Antecedentes de la Invención

El aneurisma aórtico abdominal (AAA) es una forma frecuente de enfermedad aterotrombótica, que se relaciona altamente con la edad y género (Bengtsson H et al. (1996), Ann N Y Acad Sci 800:1-24). La fisiopatología del AAA implica la proteólisis de la matriz extracelular (Michel JB (2001), Arterioscler Thromb Vasc Biol 21: 1389-1392), la desaparición de células del músculo liso (SMC) (Michel JB (2003), Arterioscler Thromb Vasc Biol 23: 2146-2154), infiltración inflamatoria de células, y ausencia de curación y colonización celular (Fontaine V et al. (2004), Am J Pathol 164:2077-2087). Se ha mostrado recientemente que la biología dinámica del trombo mural, que incluye fibrinogénesis luminal (Touat Z et al. (2006), Am J Pathol 168: 1022-1030) y la fibrinólisis abluminal (Carrell TW et al. (2006), Vascular 14:9-16; Fontaine V et al. (2002), Am J Pathol 161:1701-1710), cumple una función significativa en la progresión del AAA. En este contexto, la interacción entre los agregados de plaquetas activadas y repoblación de leucocitos polimorfonucleares (PMN) (Sarda-Mantel L et al. (2006), Arterioscler Thromb Vasc Biol 26:2153-2159; Touat et al., 2006) cumple una función importante en ausencia de la curación celular (Fontaine V et al. (2004), Am J Pathol 164:2077-2087).

Se conocen los estudios que muestran que las plaquetas se acumulan en AAA y que apoyan el efecto de fármacos antiplaquetarios en el manejo de esta afección (Etani H et al., The Japanese Journal of Nuclear medicine (1992) 29(4): 651-657). El uso de agentes antiplaquetarios en pacientes con AAA se reporta en Lloyd GM et al. (2004), Journal of Vascular surgery 40(1): 691-697. Las terapias comunes de AAA se revisan por ejemplo en Diehm N et al. (2005), Vasa-Journal of Vascular Diseases 34(4): 217-223.

Se ha encontrado que la adenosina 5'-difosfato (ADP) actúa como un mediador clave de la trombosis. La agregación plaquetaria inducida por ADP está mediada por el subtipo de receptor  $P2Y_{12}$  se encuentra en la membrana de las plaquetas. El receptor  $P2Y_{12}$  (también conocido como  $P_{2T}$ ,  $P2Y_{ADP}$  o  $P2T_{AC}$ ) es un receptor acoplado a proteína G implicado principalmente en la mediación de la activación plaquetaria/agregación. Se han descrito las características farmacológicas de este receptor, por ejemplo, en las referencias de Humphries et al. (1994), Br. J. Pharmacology, 113, 1057-1063, y Fagura et al. (1998), Br. J. Pharmacology, 124, 157-164. Se ha demostrado que los antagonistas en este receptor ofrecen mejoras significativas sobre otros agentes antitrombóticos (véase J. Med. Chem. (1999) 42, 213).

La Solicitud de Patente Internacional WO 99/05143 describe genéricamente una serie de compuestos de triazolo [4,5-d] pirimidina que tienen actividad como antagonistas de  $P_{2T}$  (también conocidos como  $P2Y_{12}$ ,  $P2Y_{ADP}$  o  $P2T_{AC}$ ). Recientemente, se ha descrito una nueva clase de antagonistas del receptor  $P_{2T}$  directos (sin profármacos) que ofrece mejoras significativas sobre otros agentes antitrombóticos. La Solicitud de Patente Internacional WO 00/34283 describe nuevos antagonistas del receptor  $P_{2T}$  "directos", que incluyen los compuestos de fórmula (I). Las formas cristalinas y amorfas de un compuesto de triazolo (4,5-d) pirimidina se describen en el documento WO01/92262.

El uso de  $\{1S-[1\alpha,2\alpha,3\beta(1S^*,2R^*),5\beta]]-3-(7-[[2-(3,4-difluorofenil) ciclopropil]amino]-5-(propiltio)-3H-1,2,3-triazolo[4,5-d] pirimidin-3-il)-5-(2-hidroxietoxi)ciclopentano-1,2-diol$  como agente terapéutico antiplaquetario, su acción como antagonista de  $P2Y_{12}(P_{2T})$  y estudios pre-clínicos y clínicos se revisan en Owen RT et al. (2007), Drugs of the Future 32(10): 845-853. El documento EP 1 493 745 A1 describe el uso de este compuesto como agente antiplaquetario para uso en el tratamiento de complicación trombótica arterial.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Prevención de expansión aneurismática mediante el tratamiento del Compuesto (A). La medición del diámetro aneurismático externo después de inducción de aneurisma en el Día 10 (a) y Día 42 (b). El diámetro externo es similar en control (cuadrado blanco) y ratas tratadas con Compuesto (A) (cuadrado negro) después de 10 días (a), pero es significativamente inferior en el grupo de compuesto (A) después de 42 días de tratamiento (b). (c) El aumento en el diámetro aneurismático es similar para los dos grupos en el Día 10 pero se reduce significativamente en las ratas tratadas con el compuesto (A) (barras negras) en el Día 42. De hecho, no se observa aumento en el diámetro aneurismático entre los Días 10 y 42 para las ratas tratadas con el compuesto (A). \*\*,  $P < 0.001$ .

Figura 2. Inhibición del desarrollo de trombo mural mediante el tratamiento del Compuesto (A). (a) tñido rojo con Picro sirius de aneurismas representativos de ratas de control (izquierda) y ratas tratadas con el compuesto (A) (derecha) en el Día 42. El diámetro del área aórtica y del trombo (T) es más grande en aneurismas de ratas de control cuando se compara con ratas tratadas con el compuesto (A). Observe que la deposición de colágeno (teñido rojo) dentro del trombo solo se observa en el grupo de compuesto (A). (b) El área del trombo/área de la pared aumenta entre los Días 10 y 42 en ambos grupos de ratas pero se reduce significativamente mediante el tratamiento del Compuesto (A) (barras negras) ambos en los Días 10 y 42. (c) Los análisis intragrupo muestran que el diámetro aneurismático más grande en el Día 42 se asocian con un área de trombo mayor ( $R^2 = 0.13$  y  $R^2 = 0.40$  para ratas de control (círculos blancos) y ratas tratadas con el compuesto (A) (círculos negros), respectivamente,  $P < 0.05$ ). (d) Inmunoteñido de CD41 (integrina alib, un marcador de plaquetas) dentro del trombo mural de aneurismas de ratas de control (izquierda) y ratas tratadas con el compuesto (A) (derecha) en el Día 42. L: lumen aórtico. La cuantificación de tñido muestra que el tratamiento para 42 días con Compuesto (A) reduce significativamente el tamaño relativo del área positiva a CD41 dentro del trombo mural cuando se compara con aquel observado en el grupo de control. Aumentos originales, x200. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ .

Figura 3. Inhibición de infiltración inflamatoria mediante el tratamiento del Compuesto (A). (a) Inmunoteñido de PMNs dentro del trombo mural de aneurismas de ratas de control (izquierda) y ratas tratadas con el compuesto (A) (derecha) en el Día 42. Cuantificación de infiltración PMN dentro del trombo mural y la pared en el Día 10 (panel medio) y 42 (panel inferior). Después de 10 y 42 días, los PMN se encuentran principalmente dentro del trombo mural de aneurismas de control (barras blancas). El tratamiento con Compuesto (A) (barras negras) inhiben la infiltración de PMNs en el trombo en ambos momentos. (b) Inmunoteñido de macrófagos dentro del trombo mural de aneurismas de ratas de control (izquierda) y ratas tratadas con el compuesto (A) (derecha) en el Día 42. Cuantificación de infiltración de macrófago en el trombo mural y la pared en el Día 10 (panel medio) y 42 (panel inferior). Se encuentran los macrófagos dentro del trombo mural así como también en la pared de aneurismas de control (barras blancas). Después de 42 días, se presentan más macrófagos dentro de la pared que en el trombo. El tratamiento del Compuesto (A) (barras negras) inhibe la infiltración de macrófagos dentro del trombo en ambos momentos. La reducción en el contenido de macrófago dentro de la pared después de 10 o 42 días del tratamiento del Compuesto (A) no alcanza significancia estadística. L: lumen aórtico. Aumentos originales, x200. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ .

Figura 4. Expresión de MMP-9 reducida con el tratamiento del Compuesto (A). (a) inmunoteñido de MMP-9 dentro del trombo mural de aneurismas de ratas de control (izquierda) y ratas tratadas con el compuesto (A) (derecha) en el Día 42. Cuantificación de tñido de MMP- 9 en el Día 42 muestra que el área ocupada por el tñido de MMP-9 con relación al área de la pared más grande dentro del trombo que dentro de la pared en aneurismas de control (barras blancas). El tratamiento del Compuesto (A) reduce fuertemente el tamaño del área positiva a MMP-9 tanto dentro del trombo como la pared (barras negras). L: lumen aórtico. Aumentos originales, x200. \*\*,  $P < 0.001$ ; \*\*\*,  $P < 0.0001$ . (b) Se presenta una correlación positiva entre el tamaño del área positiva a MMP- 9 dentro del trombo y el área de trombo total en el Día 42 cuando todas las ratas se consideran (controla, círculos blancos; tratado con Compuesto (A), círculos negros),  $R^2 = 0.79$ ,  $P < 0.0001$ .

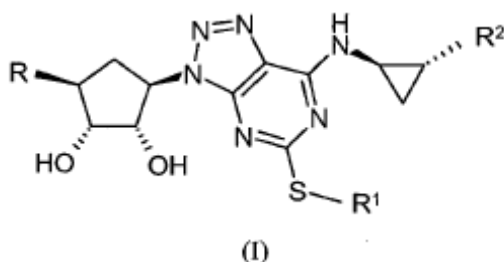
Figura 5. Colonización SMC del trombo mural y conservación de laminillas elásticas dentro de la pared aneurismática con el tratamiento del Compuesto (A). (a) tñido Orcein de aneurismas de ratas de control (izquierda) y ratas tratadas con el compuesto (A) (derecha) en el Día 42. Las flechas indican las laminillas elásticas. Cuantificación del área de laminillas elásticas muestra el efecto benéfico del tratamiento del Compuesto (A) (barras negras) en ambos Día 10 y 42. (b) Inmunoteñido de SMCs dentro del trombo mural de aneurismas de ratas de control (izquierda) y ratas tratadas con el compuesto (A) (derecha) en el Día 42. La flecha indica SMCs dentro del trombo. La densidad de SMCs dentro del trombo mural y la pared en el Día 10 (panel medio) y 42 (panel inferior) aumenta entre los Días 10 y 42 en ambos grupos. El tratamiento del Compuesto (A) (barras negras) mejora la colonización del trombo mediante SMCs después de 42 días en comparación con el control (barras blancas), mientras que no se puede observar el efecto del Compuesto (A) dentro de la pared. L: lumen; M: medio; A: adventicia. Aumentos originales, x100. \*\*,  $P < 0.001$ .

#### Esquema de la invención

La presente invención se dirige al uso del compuesto {1S-[1 $\alpha$ ,2 $\alpha$ ,3 $\beta$ (1S\*,2R\*), 5 $\beta$ ]-3-(7-[[2-(3,4-difluorofenil)ciclopropil] amino]-5-(propiltio)-3H-1,2,3-triazolo [4,5-d] pirimidin-3-il)-5-(2-hidroxietoxi)ciclopentano- 1,2-diol para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de aneurismas aórticos abdominales.

La presente invención se dirige al compuesto {1S-[1 $\alpha$ ,2 $\alpha$ ,3 $\beta$ (1S\*,2R\*),5 $\beta$ ]-3-(7-[[2-(3,4-difluorofenil)ciclopropil] amino]-5-(propiltio)-3H-1,2,3-triazolo[4,5-d] pirimidin-3-il)-5-(2-hidroxietoxi) ciclopentano-1,2-diol para uso en el tratamiento de aneurismas aórticos abdominales.

Se describe aquí el uso de un compuesto de la fórmula (I):



en donde: R es CH<sub>2</sub>OH u O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OH;

R<sup>1</sup> es alquilo C<sub>3-4</sub> opcionalmente sustituido por tres átomos de halógeno;

R<sup>2</sup> es fenilo o 3,4-difluorofenilo;

- 5 o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo, para el tratamiento o prevención de aneurismas aórticos abdominales.

Los derivados farmacéuticamente aceptables de un compuesto de la fórmula (I) incluye sales (por ejemplo, sales de adición de ácidos orgánicos o inorgánicos no tóxicos farmacéuticamente aceptables, tales como una sal de ácido clorhídrico, bromhídrico, nítrico, sulfúrico o acético), los solvatos y los solvatos de las sales.

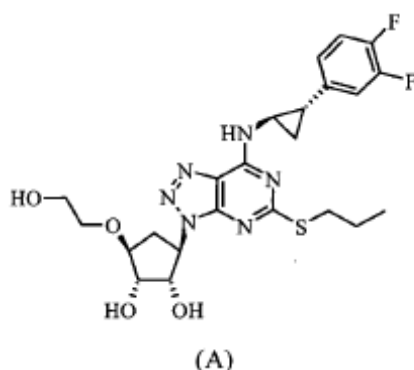
- 10 Se describe aquí un compuesto de la fórmula (I) para el tratamiento o prevención de aneurismas aórticos abdominales.

Se describe aquí el uso de un compuesto de la fórmula (I) para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de aneurismas aórticos abdominales.

- 15 Se describe aquí el uso de un compuesto de la fórmula (I) en un método para el tratamiento o prevención de aneurismas aórticos abdominales, en donde una cantidad farmacéuticamente o farmacológicamente efectiva del compuesto de la fórmula (I) se administra a un sujeto en necesidad de dicho tratamiento o prevención.

El uso de un compuesto de la fórmula (I) en un método para el tratamiento o prevención de aneurismas aórticos abdominales en donde el compuesto de la fórmula (I) se administra a un sujeto en necesidad de dicho tratamiento o prevención se describe aquí.

- 20 R<sup>1</sup> puede ser n-propil, 3,3,3-trifluoropropilo o n-butilo. En una realización, R<sup>2</sup> puede ser 3,4-difluorofenilo. En una realización, el compuesto de la fórmula (I) es el compuesto (A):



- 25 El compuesto (A) antes se denominaba convencionalmente {1S-[1α,2α,3β(1S\*,2R\*),5β]}-3-(7-[[2-(3,4-difluorofenil)ciclopropil] amino]-5-(propiltio)-3H-1,2,3-triazolo[4,5-d] pirimidin-3-il)-5-(2-hidroxiethoxi)ciclopentano-1,2-diol.

- 30 Se conocen en la técnica las formulaciones adecuadas para la administración de un compuesto de fórmula (I), e incluyen aquellas conocidas de los documentos WO00/34283, WO2008/024044 y WO2008/024045. Una formulación farmacéutica del compuesto (I) puede y de hecho, usualmente contendrá, varios otros ingredientes conocidos en la técnica, por ejemplo conservantes, agentes estabilizantes, agentes reguladores de viscosidad, agentes

emulsionantes o agentes reguladores. De esta manera, la formulación farmacéutica del compuesto (I) comprenderá típicamente una cantidad total del compuesto de fórmula (I) en el rango de 0.05 a 99% en peso (por ciento en peso), tal como en el rango de 0.10 a 70%w, o en el rango de 0.10 a 50% en peso, todos los porcentajes en peso se basan en la formulación total.

- 5 Se pueden determinar las dosis adecuadas del compuesto de fórmula (I) por el médico u otro experto, y dependerá de la severidad de la afección, y de la persona que se va a tratar, así como de los compuestos que se emplean. Las dosis adecuadas del compuesto activo en el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de pacientes mamíferos, especialmente humanos, incluyen aquellas que dan una concentración en plasma promedio de hasta 10  $\mu\text{mol/L}$ , por ejemplo en el rango de 0.001 a 10  $\mu\text{mol/L}$  en el curso de tratamiento de la afección pertinente. En cualquier evento, el médico, o el experto, será capaz de determinar la dosificación real que será la más adecuada para una persona, que es probable que varíe con la afección de que se va a tratar, así como la edad, peso, sexo y respuesta de la persona en particular que se va a tratar. Las dosis mencionadas anteriormente son de ejemplo del caso promedio. Por lo tanto, por supuesto, se pueden presentar casos individuales en los que se requieren mayores o menores rangos de dosificación, y estos se encuentran dentro del alcance de esta invención.
- 15 Para evitar dudas, el término "tratamiento" incluye el tratamiento terapéutico y/o profiláctico.

#### Evaluación biológica

##### Agregación de plaquetas

- Ratas Lewis macho saludables (Iffa Credo, Lyon, Francia) reciben una dosis oral única del Compuesto (A) (10 mg/kg de peso corporal). Se toman muestras de sangre venosa fresca de dos ratas antes, y a las 2, 10, y 24 h después de administración del compuesto (A), y se centrifuga a 250 g durante 3 min. a temperatura ambiente. Se prepara plasma rico en plaquetas como se describió previamente (Eckly et al., 2001). Una suspensión de plaquetas de 450  $\mu\text{l}$  se agita a 1100 rpm y se activa por la adición de ADP 5  $\mu\text{M}$  (Sigma, Saint Quentin-Fallavier, Francia) en un volumen final de 500  $\mu\text{l}$ . La agregación se mide a temperatura ambiente mediante un método turbidimétrico en un agregómetro de doble canal (Chrono-Log, West Havertown, PA, EE.UU.). El grado de agregación se estima al medir la altura máxima de la curva por encima del valor de referencia.

##### Modelo AAA

- Se inducen aneurismas aórticos experimentales al implantar un segmento de aorta de conejillo de Indias descelulariza con dodecil sulfato de sodio (matriz xenogénica) en aortas de rata (Allaire E. et al. (1994), J Vasc Surg 19: 446-456). Este modelo AAA se caracteriza por lesiones inmunoinflamatorias de la matriz extracelular xenogénica (Allaire E et al. (1997), Surgery 122:73-81; Allaire E et al. (1996), Transplantation 62:794-803). En resumen, 46 ratas macho Lewis (250 g) y 46 conejillos de Indias (280 g) (Iffa Credo, Lyon, Francia) se alojan de acuerdo con los principios del Laboratorio de Cuidado Animal formulados por la Unión Europea. Los animales se anestesian mediante inyección intraperitoneal de pentobarbital (5 mg/100 g de peso corporal). Las aortas infrarrenales de conejillos de Indias (1.5 cm) se muestrean y descelularizan mediante tratamiento con dodecil sulfato de sodio para obtener tubos de matriz extracelular intacta, que se transplanta ortotópicamente en la aorta de ratas Lewis con suturas interrumpidas de nylon 10/0 (xenoinjerto) (Allaire et al., 1997; Allaire et al., 1996). El diámetro inicial del injerto se mide in situ, inmediatamente después de despinzamiento, bajo un microscopio binocular. Después de 24 h, las ratas se asignan aleatoriamente a dos grupos iguales, tratados con Compuesto (A) (10 mg/kg de peso corporal dos veces al día mediante administración oral) o con el diluyente del Compuesto (A) (1% de carboximetilcelulosa/0.1% Tween-80 en agua) durante 10 días (D 10, n = 9 para cada grupo) o 6 semanas (D42, n = 14 para cada grupo). En el sacrificio, las ratas se anestesian profundamente, el diámetro del injerto se mide de nuevo, y la aorta se disecciona y se fija en paraformaldehído al 4%. Las muestras aórticas se incluyen en parafina y se cortan a 5  $\mu\text{m}$ .

##### Análisis histológico e inmunohistoquímico

- 45 Las secciones se tiñen con rojo picro Sirius para visualizar colágeno y la fibrina y con orceína para visualizar la elastina. La inmunohistoquímica se realiza utilizando la actina  $\alpha$  anti-humana (dilución 1: 500, Dako, Trappes, Francia), anti-CD68 (macrófagos, dilución 1: 1000, Serotec, Cergy Saint-Christophe, Francia), leucocitos polimorfonucleares anti-rata (dilución 1: 3000, Cedarlane, Ontario, Canadá), anti-CD41 (integrina  $\alpha\text{IIb}$ , plaquetas, dilución 1:50, Santa Cruz Biotechnologies) y anti-MMP-9 (dilución 1:50, Calbiochem, Darmstadt, Alemania) como anticuerpos primarios y un kit de Vector ABC de peroxidasa para detección (Vector Labs, Burlingame, CA, EE.UU.). Las células se cuentan con una rejilla en el ocular del microscopio y se promedian en 4 campos simétricos en el mismo portaobjetos. El tamaño de las áreas representadas por trombo, fibra elástica, pared del AAA, y teñido positivo a MMP-9 y CD41 se miden mediante análisis morfométrico utilizando el software Histolab (Microvision Instruments, Evly, Francia). Se determinan las áreas trombo sobre portaobjetos Sirius rojos. El área ocupada por

teñido positivo se cuantifica por el modo de detección de color del programa de ordenador en el trombo interno y la pared externa.

#### Análisis Estadístico

- 5 Los resultados se expresan como la media  $\pm$  D.E. El porcentaje de aumento de diámetro se calcula como sigue: (diámetro en cosecha - diámetro en injerto)  $\times$  100/diámetro en injerto. Las comparaciones entre los dos grupos se realizan mediante la prueba de Mann-Whitney U no paramétrica (Statview, versión 4.5). Se analiza la frecuencia de los aneurismas de gran diámetro en los 2 grupos diferentes mediante la prueba de  $\chi^2$ . Se utiliza análisis de regresión simple para probar la correlación entre diferentes parámetros. El  $P < 0.05$  se considera significativo.

#### Resultados de Diámetro Aneurismático

- 10 Los xenoinjertos de matriz extracelular descelularizada desarrollados en aneurismas, como se muestra por el aumento en el diámetro aneurismático externo observado en ratas de control no tratadas 10 días ( $204.6 \pm 71.2\%$ ,  $n = 9$ ) y 42 días ( $359.1 \pm 113.3\%$ ,  $n = 14$ ) después de injerto (Figura 1). El tratamiento del Compuesto (A) durante 10 días no modifica el aumento en diámetro aneurismático externo ( $197.3 \pm 52.8\%$ ,  $n = 9$ ), cuando se compara con ratas no tratadas; el diámetro aneurismático externo medio es similar entre los dos grupos ( $2.22 \pm 0.56$  mm vs.  $2.22 \pm 0.70$  mm, en ratas tratadas con Compuesto (A) y ratas de control, respectivamente) (Figura 1a,c). Sin embargo, después de 42 días de tratamiento, el diámetro aneurismático externo medio es significativamente menor en el grupo tratado con Compuesto (A) ( $3.61 \pm 1.46$  mm,  $n = 14$  vs.  $5.21 \pm 1.22$  mm,  $n = 14$ , en ratas tratadas con Compuesto (A) y de control, respectivamente), y se reducen significativamente el aumento en el porcentaje del diámetro externo (Figura 1b,c). El tratamiento con Compuesto (A) previene de esta manera expansión de aneurisma, como se muestra por la diferencia en el aumento de porcentaje en diámetro aórtico observado en ratas de control entre los Días 10 y 42, que se reducen en el grupo de compuesto (A) (Figura 1c). Adicionalmente, la incidencia de los aneurismas mayores en el Día 42 (diámetro  $> 4$  mm) predominan en el grupo de control, cuando se compara con el grupo tratado con Compuesto (A) ( $\chi^2=11.6, P<0.001$ ).

#### Formación de Trombo Mural

- 25 Los aneurismas experimentales que desarrollan de los xenoinjertos de matriz extracelular descelularizada se caracterizan por la presencia de un trombo mural, como se describió previamente (Touat et al., 2006) (Figura 2a). En el grupo de control, los índices de área de trombo /área de pared representa  $0.22 \pm 0.14$  en el Día 10 y aumenta a  $0.78 \pm 0.89$  por Día 42 (Figura 2b). El tratamiento con Compuesto (A) reduce significativamente el área de trombo/pared, en los Días 10 y 42 ( $0.07 \pm 0.05$  y  $0.35 \pm 0.44$ , respectivamente) (Figura 2b). Esta reducción relativa en el área de trombo se asocia con una reducción significativa en el área positiva de CD41 (integrina  $\alpha_{IIb}$ , un marcador de plaquetas) dentro del trombo a 42 días ( $0.13 \pm 0.16$  y  $0.68 \pm 1.36$  para ratas tratadas con Compuesto (A) y del grupo de control, respectivamente,  $P = 0.005$ ) (Figura 2c). Por último, existe una correlación significativa entre el área del trombo y el diámetro de aneurisma en el Día 42 cuando se consideran todas las ratas ( $R^2 = 0.25$ ,  $P = 0.0003$ ). El análisis intragrupo muestra que el tratamiento del Compuesto (A) reduce significativamente la pendiente de la correlación cuando se compara con el grupo de control (Compuesto (A):  $s = 0.17$ ,  $R^2 = 0.40$ ; control:  $s = 0.30$ ,  $R^2 = 0.13$ ) (Figura 2c), que proporciona evidencia para esa inhibición de activación de plaquetas mediante el Compuesto (A) limitará la progresión AAA de experimental.

#### Infiltración inflamatoria

- 40 Se asocia el desarrollo del aneurisma con un proceso inflamatorio que implica leucocitos polimorfonucleares (PMN) y macrófagos. Se presentan ambas células inflamatorias dentro del trombo mural y la pared aneurismática (Figura 3). Sin embargo, los PMN se encuentran principalmente dentro del trombo mural donde representan el tipo de célula inflamatoria principal. En contraste, los macrófagos predominan dentro de la pared. Mientras que la densidad del PMN se reduce entre los Días 10 y 42, aumenta la densidad del macrófago (Figura 3). El tratamiento del Compuesto (A) inhibe significativamente la infiltración de PMNs y macrófagos en el trombo mural en los Días 10 y 42 (Figura 3). No se presentan cambios en la infiltración de macrófago en la pared aneurismática.

#### Expresión de MMP-9 en Aneurisma y Fibras Elásticas Conservadas en el Medio

- 50 La expresión de MMP-9, revelada por inmunotefido, se detecta en ratas de control en el trombo y en la pared aneurismática (Figura 4a). El área positiva a MMP-9 es mayor dentro del trombo que en la pared en el Día 42. El tratamiento con Compuesto (A) reduce notablemente el área positiva a MMP-9, en el trombo y la pared (Figura 4a). Adicionalmente, se presenta una correlación positiva significativa entre el área del trombo y la expresión de MMP-9 dentro del trombo en el Día 42 cuando se consideran todas las ratas ( $R^2 = 0.79$ ,  $P < 0.0001$ ) (Figura 4b). Al reflejar la expresión de MMP-9 reducida, la conservación significativa de las fibras elásticas del medio se observa con el tratamiento del Compuesto (A) en ambos puntos de tiempo (Fig. 5a). Aunque el área relativa ocupada por las fibras

elásticas se mantiene constante en las ratas de control entre el Día 10 y el Día 42, el área de la fibra elástica aumenta fuertemente en ratas tratadas con el Compuesto (A) (Figura 5A).

#### VSMC Colonización del trombo mural

- 5 Los SMC colonizan el injerto descelularizado y la parte del trombo mural que se desarrolla cerca de la pared, como se revela por el teñido positivo a  $\alpha$ -actina dentro de la pared y el trombo (Figura 5b). Más aún, la densidad de SMC aumenta desde el Día 10 hasta el Día 42, dentro de la pared y el trombo, proporcionando evidencia de la tendencia del modelo para iniciar un proceso de curación espontánea con el tiempo. Mientras que el tratamiento con compuesto (A) durante 10 días no modifica la densidad de SMC dentro del trombo en comparación con los
- 10 controles, el tratamiento durante 42 días mejora significativamente la colonización SMC del trombo (Figura 5b). Esto se asocia con una deposición de colágeno, como se muestra por teñido con rojo Sirius (Figura 2a). En contraste, el tratamiento con el Compuesto (A) no afecta la colonización SMC de la pared después de 10 o 42 días (Fig. 5b).

#### Conclusión

- 15 La prevención de la formación de trombo mural en AAA a través de la inhibición de activación plaquetaria por el compuesto (A) limita la progresión de AAA experimental. Al bloquear la activación plaquetaria y reducir la formación de trombo mural, el Compuesto (A) reduce el repoblación de leucocitos en el trombo y su posterior enriquecimiento con proteasas, lo que conduce a la conservación de la integridad de la pared y para el inicio de la curación según se revela por la mejora de la colonización celular mesenquimatosa.

# REIVINDICACIONES

1. Uso del compuesto {1S-[1 $\alpha$ ,2 $\alpha$ ,3 $\beta$ (1S\*,2R\*),5 $\beta$ ]}-3-(7-[[2-(3,4-difluorofenil)ciclopropil]amino]-5-(propiltio)- 3H-1,2,3-triazolo[4,5-d] pirimidin-3-il)-5-(2-hidroxietoxi)ciclopentano-1,2-diol para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de aneurismas aórticos abdominales.
- 5 2. El compuesto {1S-[1 $\alpha$ ,2 $\alpha$ ,3 $\beta$ (1S\*,2R\*),5 $\beta$ ]}-3-(7-[[2-(3,4-difluorofenil)ciclopropil]amino]-5-(propiltio)-3H- 1,2,3-triazolo[4,5-d] pirimidin-3-il)-5-(2-hidroxietoxi) ciclopentano-1,2-diol para uso en el tratamiento de aneurismas aórticos abdominales.

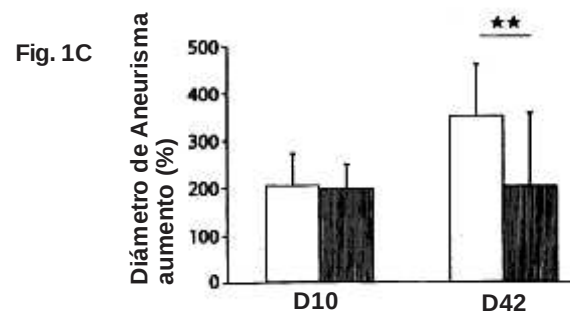
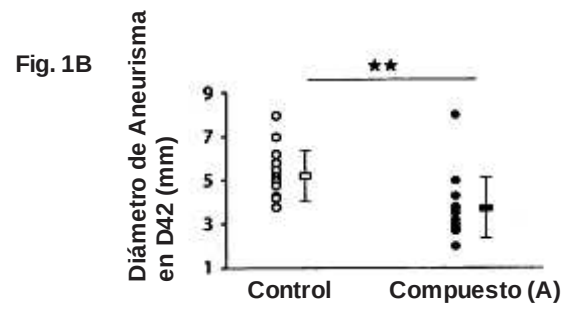
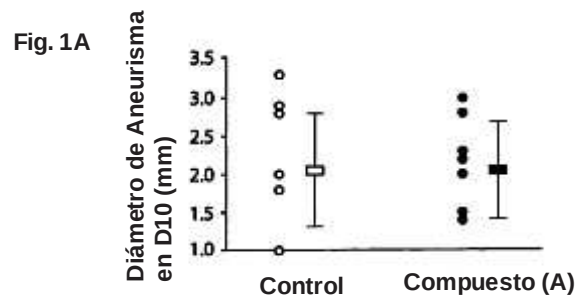


Fig. 2A

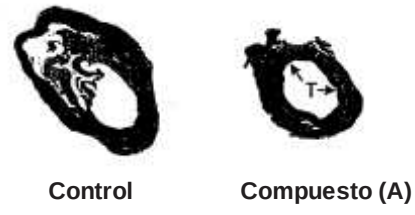


Fig. 2B

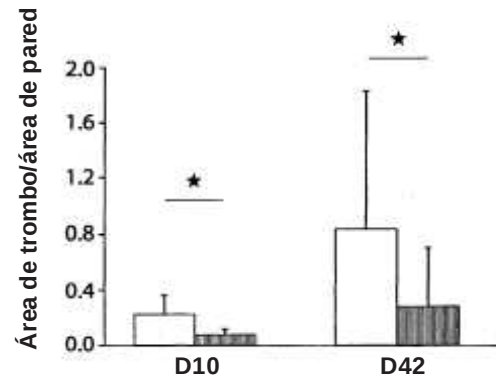


Fig. 2C

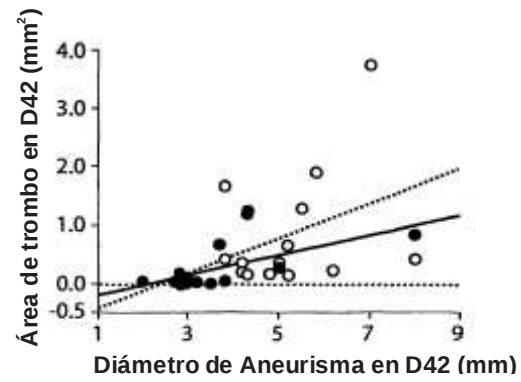


Fig. 2D

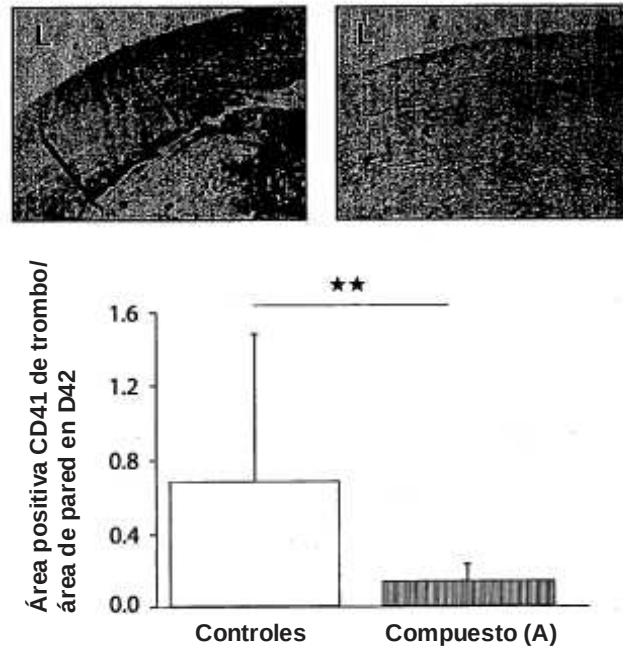


Fig. 3A

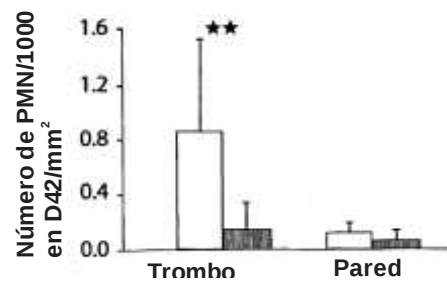
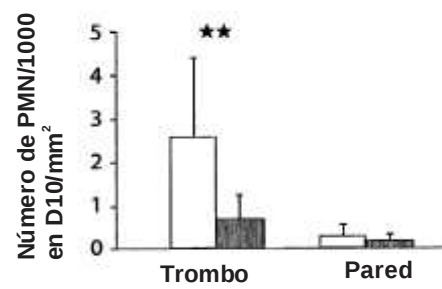
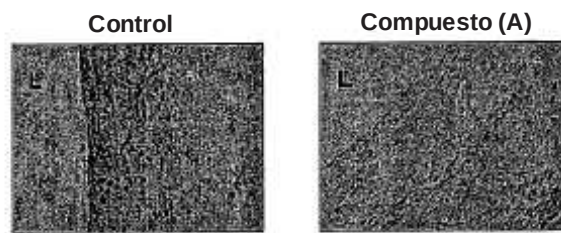
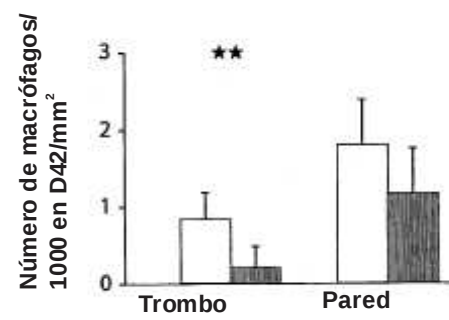
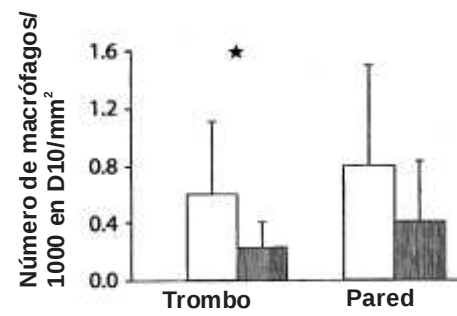
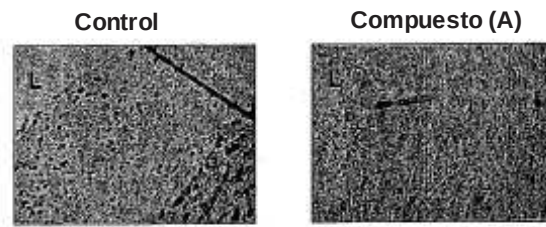


Fig. 3B



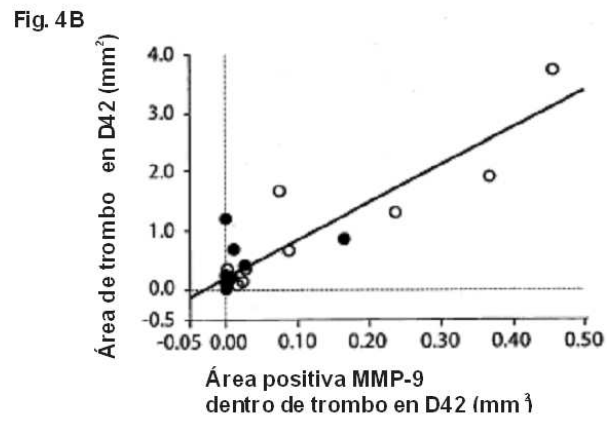
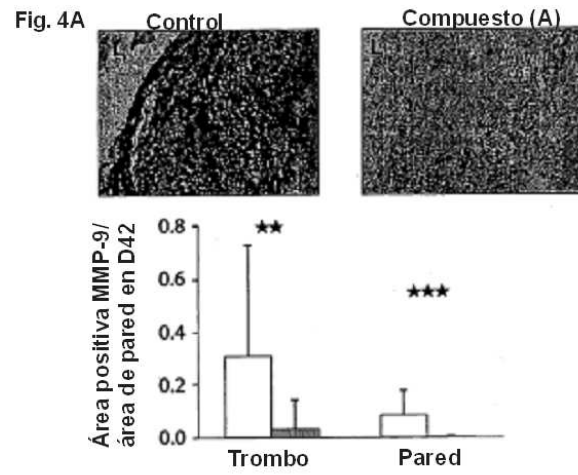


Fig. 5A

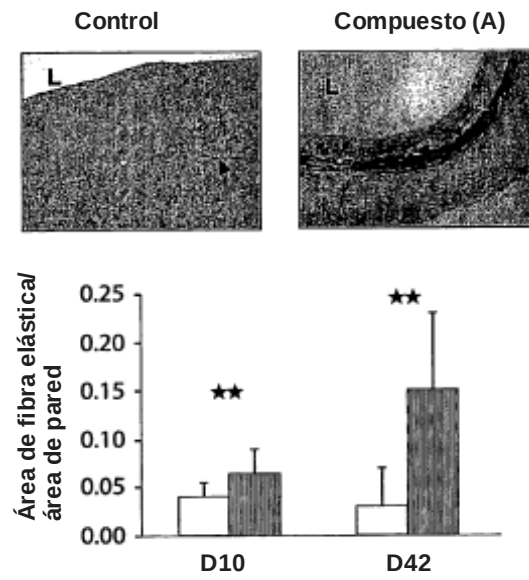


Fig. 5B

