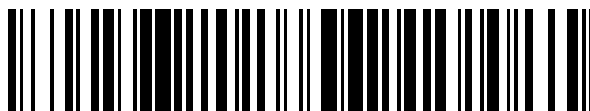


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 540 933**

51 Int. Cl.:

C12N 9/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.05.2007 E 07776985 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2015 EP 2152865**

54 Título: **Métodos de tratamiento y prevención de enfermedades y trastornos neurodegenerativos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.07.2015

73 Titular/es:

**THOMAS JEFFERSON UNIVERSITY (50.0%)
1020 Walnut Avenue
Philadelphia, Pennsylvania 19107, US y
ROWAN UNIVERSITY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SHI, YI y
NAGELE, ROBERT**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 540 933 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

Métodos de tratamiento y prevención de enfermedades y trastornos neurodegenerativos

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere en general a composiciones farmacéuticas para uso en el tratamiento y/o prevención de enfermedades y trastornos neurodegenerativos, y más particularmente al tratamiento y/o prevención de enfermedades neurodegenerativas asociadas con la permeabilidad de la barrera de la sangre anormal usando agentes que inhiben la expresión y/o actividad de la proteína Lp-PLA₂.

Antecedentes

15 La lipoproteína asociada a la fosfolipasa A₂ (Lp-PLA₂), también conocida previamente en la técnica como acetilhidrolasa del factor activador de plaquetas (PAF acetil hidrolasa) es un miembro de la superfamilia de las enzimas fosfolipasa A₂ que están implicadas en la hidrólisis de los lípidos de lipoproteínas o fosfolípidos. Es secretada por varias células que juegan un papel importante en la respuesta inflamatoria sistémica a la lesión, incluyendo linfocitos, monocitos, macrófagos, linfocitos T y mastocitos.

20 Durante la conversión de LDL a su forma oxidada, Lp-PLA₂ es responsable de hidrolizar el éster sn-2 de la fosfatidilcolina modificada por oxidación para dar la lisofosfatidilcolina y un ácido graso modificado oxidativamente. Lp-PLA₂ hidroliza la posición sn-2 de un fosfolípido truncado asociado a LDL oxidadas. Como resultado, hay una generación de dos mediadores de acogimiento de células inflamatorias (ácidos grasos no esterificados (NEFA) y LYSO PC). Tanto NEFA como LYSO PC son quimioatrayentes para los monocitos circulantes, juegan un papel en la activación de los macrófagos y aumentan el estrés oxidativo, así como afectan las respuestas funcionales y las inmediatas de los linfocitos T. La Lp-PLA₂ está unida en los seres humanos y los cerdos a la molécula de LDL a través de la lipoproteína B, y una vez en la pared arterial de la LDL oxidada es susceptible a la hidrólisis por LpPLA₂.

30 Ambos de estos productos de la acción de Lp-PLA₂ son quimioatrayentes potentes para los monocitos circulantes. Como tal, se cree que esta enzima es responsable de la acumulación de células cargadas con el éster de colesterol en las arterias, causando la característica "estría grasa" asociada con las primeras etapas de la aterosclerosis, y la inhibición de la enzima Lp-PLA₂ puede ser útil en la prevención de la acumulación de esta estría grasa (mediante la inhibición de la formación de lisofosfatidilcolina), y útil en el tratamiento de la aterosclerosis.

35 Además, se propone que la Lp-PLA₂ juega un papel directo en la oxidación de las LDL. Esto es debido a los productos de peróxido de lípidos derivados del ácido graso poliinsaturado de acción Lp-PLA₂ que contribuyen a y mejorar el proceso global oxidativo. En consonancia con esta idea, los inhibidores de Lp-PLA₂ inhiben la oxidación de LDL. Por lo tanto, los inhibidores de Lp-PLA₂ pueden tener una aplicación general en cualquier trastorno que implica la peroxidación de lípidos en conjunción con la actividad de la enzima, por ejemplo, en adición a condiciones tales como la aterosclerosis y la diabetes otras condiciones tales como la artritis reumatoide, infarto de miocardio y lesión por perfusión.

45 El manejo clínico de numerosos trastornos neurológicos se ha visto frustrado por el carácter progresivo de las enfermedades neurológicas degenerativas, traumáticas o destructivas y la limitada eficacia y los efectos secundarios graves de los agentes farmacológicos disponibles. Las condiciones tales como la enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, trastornos convulsivos graves (por ejemplo, la epilepsia y la disautonomía familiar), han eludido a los intentos farmacológicos más convencionales para aliviar o curar las condiciones.

50 La demencia, una disfunción cerebral progresiva, conduce a un aumento gradual de la restricción de las actividades diarias. El tipo más conocido de la demencia es la enfermedad de Alzheimer. Afecta a aproximadamente el 10% de la población mayor de 65 años de edad y aproximadamente el 40% de la población mayor de 80 años de edad. Aproximadamente 4.5 millones de personas en los Estados Unidos se ven afectados en la actualidad con este trastorno; y se espera que la cifra aumente considerablemente en los próximos años, ya que esta población demográfica es el segmento de más rápido crecimiento en nuestra sociedad. Para el año 2050, si no hay tratamientos preventivos que estén disponibles, se espera que el número de estadounidenses con la enfermedad de Alzheimer se triplicará (de 4.6 a 14 millones) y el costo del cuidado de las personas con la enfermedad en Estados Unidos será más de \$100 mil millones anuales. Esta epidemia tiene enormes implicaciones para la sociedad, tanto en términos de sufrimiento humano como en el coste monetario.

60 La demencia vascular se define como la pérdida de la función cognitiva, resultante de lesiones isquémicas, isquémicas-hipóxicas, o cerebrales hemorrágicas como resultado de las enfermedades cardiovasculares y los cambios patológicos cardiovasculares. Véase, por ejemplo, G. C. Roman, Med. Clin. North. Am., 86, pp. 477-99 (2002). La demencia vascular es un trastorno crónico y progresivo. Los síntomas de la demencia vascular incluyen la pérdida cognitiva, dolores de cabeza, el insomnio y la pérdida de memoria. La demencia vascular puede ser causada por múltiples infartos

lacunares y lesiones de hipoperfusión como infartos de zonas fronterizas y leucoencefalopatía periventricular isquémica (enfermedad de Binswanger). Véase, G. C. Roman, supra. En los países asiáticos como China, Japón y Corea, la demencia vascular se observa en más del 60% de los pacientes con demencia.

5 El tratamiento de la demencia vascular normalmente implica el control de factores de riesgo (i.e. la hipertensión, la diabetes, la dieta rica en grasas, fumar, hiperfibrinogenemia, hiperhomocisteinemia, hipotensión ortostática, arritmias cardíacas). Véase, G. C. Roman, supra. Los investigadores también han investigado si la terapia de reemplazo hormonal y la terapia de reemplazo de estrógeno podrían retrasar la aparición de la demencia en las mujeres. Véase, E. Hogervorst et al., *Cochrane Database Syst. Rev.*, 3, CD003799 (2002). Sin embargo, dicha terapia de reemplazo hormonal tiene efectos secundarios negativos.

10 Por otra parte, aunque la aspirina es ampliamente prescrita para la demencia vascular, hay evidencia muy limitada de que la aspirina sea realmente eficaz en el tratamiento de los pacientes con demencia vascular. Véase, P. S. Williams et al., *Cochrane Database Syst. Rev.*, 2, CD001296 (2000). El nimodipino se ha implicado como un fármaco que demuestra los beneficios a corto plazo en pacientes con demencia vascular, pero no se ha justificado como un medicamento contra la demencia a largo plazo. Véase, J. M. Lopez-Arrieta and J. Birks, *Cochrane Database Syst. Rev.*, 3, CD000147 (2002). Además, los datos de eficacia clínica del piracetam no es compatible con el uso de este fármaco en el tratamiento de la demencia o deterioro cognitivo. L. Flicker and G. (irimley Evans, *Cochrane Database Syst. Rev.*, 2, CD001011 (2001).

20 Hasta la fecha, ningún tratamiento puede prevenir la demencia vascular o detener la enfermedad de Alzheimer. Para las personas en las etapas tempranas y medias de la enfermedad, los medicamentos actuales (Cognex, Aricept, Exelon, Reminyl, Namenda) pueden reducir algunos de los síntomas por un tiempo limitado. Dado que la inflamación en el cerebro puede contribuir a la enfermedad de Alzheimer, los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID, Vioxx, Aleve, Celebrex) han sido probados en ensayos clínicos y no mostraron beneficios.

Resumen

30 La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende 1-(N-(2-(diethylamino)etil)-N-(4-(4-trifluorometilfenil)bencil)-aminocarbonilmetil)-2-(4-fluorobencil)tio-5,6-trimetilenopirimidin-4-ona (SB480848) o una sal de este farmacéuticamente aceptable, y un portador farmacéuticamente aceptable para uso en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad o trastorno neurodegenerativo, en donde el trastorno neurodegenerativo es la Demencia Vascular.

35 También se describen los métodos para el tratamiento y/o prevención de enfermedades y trastornos neurodegenerativos mediante la inhibición de la Lp-PLA₂, por ejemplo la inhibición de la expresión y/o actividad de la proteína Lp-PLA₂. Las enfermedades neurodegenerativas susceptibles de tratamiento y/o prevención por estos métodos están asociadas con la función anormal de la barrera hematoencefálica (BBB), por ejemplo enfermedad neurodegenerativa con una BBB permeable, e incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a, enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Parkinson, Demencia Vascular y similares.

40 Los métodos descritos en el presente documento comprenden administrar a un sujeto en necesidad de tratamiento y/o prevención de una enfermedad neurodegenerativa, una composición farmacéutica que comprende un agente que inhibe Lp-PLA₂, por ejemplo un agente que inhibe la expresión de Lp-PLA₂ y/o la actividad de la proteína Lp-PLA₂. No se pretende que los métodos se limiten a cualquier etapa particular de la enfermedad (por ejemplo, precoz o avanzada).

45 Como se describe en este documento los métodos para prevenir fugas en BBB son proporcionados mediante la inhibición de la Lp-PLA₂, por ejemplo la inhibición de la expresión de Lp-PLA₂ y/o inhibición de la actividad de la proteína Lp-PLA₂. En consecuencia, algunos métodos inhiben Lp-PLA₂ mediante el bloqueo de la actividad enzimática y algunos métodos inhiben Lp-PLA₂ mediante la reducción y/o la regulación negativa de la expresión de ARN de Lp-PLA₂. La prevención y/o reducción de la fuga en BBB o permeabilidad de BBB pueden conducir a la prevención y/o reducción de los síntomas asociados con las enfermedades o trastornos neurodegenerativos.

50 También se describen los métodos de tratamiento y/o prevención de un enfermedad o trastorno neurodegenerativo en un sujeto, en donde los métodos comprenden administrar al sujeto en necesidad del mismo una composición farmacéutica que comprende un agente que inhibe la actividad y/o expresión de la proteína Lp-PLA₂. Dicha enfermedad o trastorno neurodegenerativo puede ser una enfermedad o trastorno neurodegenerativo y pueden ser, por ejemplo, pero sin limitación, enfermedad de Alzheimer, Demencia Vascular, enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Huntington. La enfermedad o trastorno neurodegenerativo puede estar asociados con una barrera hematoencefálica anormal. El sujeto administrado con un agente que inhibe la actividad o expresión de la proteína Lp-PLA₂ puede ser un humano.

55 También se describen los métodos de tratamiento y/o prevención de un sujeto con o en riesgo de demencia vascular, que comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende un agente que inhibe la actividad y/o la expresión de la proteína Lp-PLA₂, en donde la inhibición de la proteína Lp-PLA₂ reduce o detiene un síntoma de la demencia vascular. La demencia vascular puede estar asociada con la enfermedad de Alzheimer.

- 5 También se describen los métodos de tratamiento y/o prevención de una enfermedad o trastorno asociado con una barrera hematoencefálica anormal en un sujeto en necesidad del mismo, que comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende un agente que inhibe la expresión y/o actividad de la proteína Lp-PLA₂. La acreditación anormal puede ser una barrera hematoencefálica permeable y la enfermedad o trastorno puede ser una enfermedad o trastorno neurodegenerativo. Tales enfermedades y trastornos neurodegenerativos pueden ser, por ejemplo, pero no se limitan a la demencia vascular, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Huntington y similares.
- 10 También se describen los métodos para disminuir beta amiloide, y se refiere como la acumulación de "Aβ" en el cerebro de un sujeto, que comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende un agente que inhibe la expresión y/o la actividad de la proteína Lp-PLA₂, en donde la inhibición de la proteína Lp-PLA₂ reduce o detiene un síntoma de la acumulación de beta amiloide en el cerebro. La beta amiloide puede ser Abeta-42.
- 15 Cuando las enfermedades neurodegenerativas dan lugar a disminución de la función cognitiva, por ejemplo donde la enfermedad neurodegenerativa es, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer y/o la demencia vascular, el método de tratamiento y/o prevención de la enfermedad usando los métodos según se describe en este documento puede comprender, además, la evaluación de la función cognitiva del sujeto después de la administración de la composición farmacéutica que comprende un agente que inhibe la expresión y/o actividad de Lp-PLA₂.
- 20 En los métodos según se describe en el presente documento para el tratamiento y/o prevención de enfermedades neurodegenerativas, y/o tratamiento y/o prevención de BBB anormal en un sujeto, el método además puede comprender el seguimiento del tratamiento mediante la evaluación de la función de flujo sanguíneo cerebral o de la barrera hematoencefálica. Tales métodos pueden ser realizados por una persona con experiencia normal en la técnica, por ejemplo, pero no se limitan a la evaluación de la presencia de tau y Aβ-42 en el CSF.
- 25 Los métodos según se describen en el presente documento, para el tratamiento y/o prevención de enfermedades neurodegenerativas son aplicables a sujetos, por ejemplo, sujetos mamíferos. El sujeto puede ser un ser humano.
- 30 Breve descripción de las figuras
- 35 La Figura 1 muestra evidencia de hemorragia inducida por DM/HC y la fuga en BBB. El panel A muestra la no hemorragia en el cerebro de control, en comparación con el cerebro en el cerebro DM/HC en el panel B, las flechas de color negro muestran células inflamatorias fuera del vaso sanguíneo, y la flecha blanca muestra el aumento de la adhesión de células inflamatorias en la superficie del endotelio las células. El panel C muestra la no permeabilidad vascular y BBB intacta en el animal control, en comparación con la fuga en BBB en el cerebro de animales DM/HC como se muestra en el panel D, las flechas en C y D muestran el límite de la inmunoglobulina (Ig)-positiva "nube de fuga" que rodea a los vasos sanguíneos pequeños.
- 40 La Figura 2 muestra que Ig filtrada en cerebros DM/HC se une a las neuronas e induce el colapso de las dendritas. Los paneles izquierdo y derecho muestran neuronas Ig positivas (Ig-pos) con colapso dendrita característico, según lo revelado por la "morfología sacacorchos" de los troncos de dendritas que emergen del cuerpo celular neuronal.
- 45 La Figura 3 muestra evidencia de activación de astrocitos inducidos por DM/HC, y muestra la inmunotinción de GFAP como un marcador para astrocitos activados en la proximidad de las "neuronas enfermas" en el cerebro de animales tratados con DM/HC.
- 50 La Figura 4 muestra evidencia de acumulación de Abeta-42 inducida por DM/HC en las neuronas y en la microvasculatura cerebral local. El Panel A muestra las neuronas que son intensamente inmunopositivas de Abeta-42 y una arteriola que muestra la deposición de Abeta-42 en la capa de músculo liso vascular (amiloidosis cerebrovascular), y el Panel B muestra que las neuronas inmunopositivas de Abeta-42 tienen "dendritas sacacorchos" indicativos de retracción dendrita.
- 55 La Figura 5 muestra que el inhibidor de Lp-PLA₂ impide las fugas en BBB y enlace de Ig con las neuronas. Los paneles A F son imágenes representativas del compromiso de BBB (permeabilidad) de los cerebros de animales DM/HC sin tratamiento (n = 6) y los paneles de G a L son imágenes representativas de BBB intacta de regiones comparables en el cerebro de los animales DM/HC tratados con un inhibidor de Lp-PLA₂ (n = 6). Los paneles A-F muestran abundante pérdida de Ig de la microvasculatura cerebral local en el tejido cerebral y el enlace de Ig con neuronas en comparación con los paneles de G-L.
- 60 La Figura 6 muestra que el inhibidor de Lp-PLA₂ preserva la salud de las neuronas en animales DM/HC, mediante el bloqueo del eflujo de componentes del plasma (incluyendo Ig) de los vasos sanguíneos. Como resultado, Ig se limita a la luz de los vasos sanguíneos en animales tratados con DM/HC con un inhibidor de Lp-PLA₂, haciendo tanto las paredes de las arteriolas como las neuronas inmunonegativas para Ig.

La Figura 7 muestra que el inhibidor de Lp-PLA₂ impide la acumulación de Abeta-42 en las neuronas. Los paneles A F son imágenes representativas de inmunotinción de Abeta-42 de los cerebros de animales DM/HC sin tratamiento (n = 6) y los paneles de G a L son imágenes representativas de inmunotinción de Abeta-42 en las regiones comparativas en el cerebro de animales tratados con DM/HC con un inhibidor de Lp-PLA₂ (n = 6). Como se muestra en los paneles de A-F, el aumento de la inmunoreactividad de Abeta-42 muestra el enlace de Abeta-42 con y la acumulación dentro de las neuronas en comparación con las neuronas inmunonegativas para Abeta-42 en los paneles de G-L.

La Figura 8 muestra la amiloidosis cerebrovascular reducida por el inhibidor de Lp-PLA₂. El panel A muestra la inmunotinción de Abeta-42 en la capa de células del músculo liso de las arteriolas (i.e. la amiloidosis cerebrovascular) en cerebros de animales DM/HC sin tratamiento, en comparación con el Panel B, que muestra poca o ninguna inmunotinción de Abeta-42 arterial en regiones comparables del cerebro de animales tratados con DM/HC con un inhibidor de la Lp-PLA₂.

La Figura 9 muestra una imagen representativa del cerebro de porcino, que muestra el cerebro intacto completo en el panel A y hemiseccionado a lo largo de la línea media en el panel B con flechas que indican la ubicación del tronco cerebral y el hipocampo, así como una cuadrícula de las regiones del cerebro utilizadas para análisis inmunohistoquímico.

Descripción detallada

Como se revela en el presente documento, los inventores han descubierto que los animales propensos a las características patológicas de la demencia vascular, incluyendo la fuga y la permeabilidad y la hemorragia de BBB, cuando se tratan con un inhibidor de Lp-PLA₂, se ha encontrado que muestran signos y síntomas de la reducción de permeabilidad de BBB y la reducción de BBB anormal. Por ejemplo, los animales tratados con un inhibidor de Lp-PLA₂ demostraron una reducida permeabilidad de BBB, menor activación de células gliales y menos daño neuronal. En particular, los animales tratados con un inhibidor de Lp-PLA₂ también tuvieron menos acumulación de amiloide, por ejemplo acumulación de beta-amiloide (o Abeta -42) en el cerebro y la vasculatura del cerebro. Por lo tanto, los inventores han descubierto que los inhibidores de Lp-PLA₂ se pueden utilizar en el tratamiento y/o prevención de enfermedades y trastornos neurodegenerativos, en particular enfermedades y trastornos neurodegenerativos asociados con la función anormal de la barrera hematoencefálica, por ejemplo las enfermedades neurodegenerativas con permeabilidad de BBB o aumento de la permeabilidad de BBB. Tales enfermedades incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a la demencia vascular, enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson y similares.

Definiciones

Por conveniencia, ciertos términos empleados en toda la aplicación (incluyendo la especificación, ejemplos y reivindicaciones adjuntas) se recogen en este documento. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por un experto en la técnica a la cual esta invención pertenece.

El término "enfermedad neurodegenerativa", como se utiliza en este documento se refiere a un surtido variado de trastornos del sistema nervioso central que se caracteriza por la pérdida gradual y progresiva del tejido neural y/o la función del tejido neural. Una enfermedad neurodegenerativa es una clase de trastorno o enfermedad neurológica, y donde la enfermedad neurológica se caracteriza por una pérdida gradual y progresiva del tejido neural, y/o la función neurológica alterada, por lo general la función neurológica reducida como un resultado de una pérdida gradual y progresiva de tejido neural. Las enfermedades neurodegenerativas susceptibles de prevención y/o tratamiento usando los métodos según se describe en el presente documento son enfermedades neurodegenerativas por lo que existe una barrera hematoencefálica anormal, por ejemplo una barrera hematoencefálica permeable. Ejemplos de enfermedades neurodegenerativas donde hay una barrera hematoencefálica defectuosa incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a la Enfermedad de Alzheimer, la Enfermedad de Huntington, Enfermedad de Parkinson, la demencia vascular y similares.

El término "demencia vascular" también se conoce como "demencia multi-infarto" en la técnica se refiere a un grupo de síndromes causados por diferentes mecanismos todas dando lugar a lesiones vasculares en el cerebro. Los principales subtipos de demencia vascular son, por ejemplo deterioro cognitivo leve vascular, demencia multi-infarto, demencia vascular debido a un infarto estratégico único (que afecta el tálamo, la arteria cerebral anterior, los lóbulos parietal o la circunvolución del cíngulo), demencia vascular debido a las lesiones hemorrágicas, enfermedad de vasos pequeños (incluyendo, por ejemplo, la demencia vascular debido a lesiones lacunares y la enfermedad de Binswanger) y Enfermedad mixta de Alzheimer con demencia vascular.

El término "enfermedad" o "trastorno" se usa indistintamente en el presente documento, y se refiere a cualquier alteración en el estado del cuerpo o de algunos de los órganos, que interrumpe o que altera el desempeño de las funciones y/o que causa síntomas tales como malestar, disfunción, la angustia, o incluso la muerte a la persona afectada o los que están en contacto con una persona. Una enfermedad o trastorno también puede referirse a una

perturbación, enfermo con dolor, dolencia, afección, trastorno, indisposición, malestar, padecimiento, indisposición o afectación.

5 Los términos "barrera hematoencefálica" o "BBB" se utilizan indistintamente en este documento, y se utilizan para referirse a la permeabilidad de la barrera que existe en los vasos sanguíneos a medida que viajan a través del tejido cerebral que restringe severamente y regula de cerca lo que se intercambia entre la sangre y el tejido cerebral. Los componentes de la barrera hematoencefálica incluyen las células endoteliales que forman el recubrimiento más interno de todos los vasos sanguíneos, las uniones estrechas entre las células endoteliales adyacentes que son el correlato estructural de la BBB, la membrana basal de las células endoteliales y los procesos de pie expandidos de astrocitos adyacentes que cubren casi la totalidad de la superficie exterior expuesta del vaso sanguíneo. La BBB impide que la mayoría de las sustancias en la sangre entren en el tejido cerebral, incluyendo la mayoría de las moléculas grandes tales como Ig, anticuerpos, complemento, la albúmina y los fármacos y moléculas pequeñas.

15 El término "BBB anormal" se utiliza para referirse a una BBB disfuncional, por ejemplo, donde la BBB no permite el tránsito de moléculas que normalmente transportan una BBB funcional, por ejemplo, nutrientes y azúcares tales como glucosa. Una BBB anormal también puede hacer referencia a cuando la BBB es permeable a moléculas, que una BBB que funciona normalmente por lo general serían excluidas, que se denomina normalmente como "permeabilidad de BBB" en el presente documento.

20 Los términos "permeabilidad de BBB" o "BBB permeable" se refieren comúnmente por las personas en la técnica como "BBB con fugas". Los términos se utilizan indistintamente en este documento para hacer referencia a la alteración de la integridad de BBB y el aumento de la permeabilidad vascular. Por ejemplo, una BBB permeable permite el tránsito de moléculas a través de la BBB que una BBB intacta normalmente excluirían del tejido cerebral, por ejemplo, moléculas de Ig, proteínas complemento, albúmina de suero y numerosas otras proteínas. Un ensayo para determinar la presencia de una BBB permeable puede ser, por ejemplo, evaluar la presencia de Ig extravascular en el tejido cerebral que normalmente se limita al lumen de los vasos sanguíneos, cuando la BBB está funcionando normalmente (i.e. cuando la BBB no es permeable).

30 El término "agente" se refiere a cualquier entidad que normalmente no está presente o no está presente en los niveles que se administra en la célula. El agente puede ser seleccionado de un grupo que comprende: los productos químicos; moléculas pequeñas; secuencias de ácido nucleico; análogos de ácido nucleico; proteínas; péptidos; aptámeros; anticuerpos; o sus fragmentos. Una secuencia de ácido nucleico puede ser ARN o ADN, y puede ser monocatenaria o bicatenaria, y se puede seleccionar de un grupo que comprende; ácido nucleico que codifica una proteína de interés, oligonucleótidos, análogos de ácidos nucleicos, por ejemplo, ácido peptidonucleico (PNA), pseudo-PNA complementario (pc-PNA), ácido nucleico bloqueado (LNA), etc. Tales secuencias de ácidos nucleicos incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a, las secuencias de ácido nucleico codificantes de proteínas, por ejemplo, que actúan como represores transcripcionales, moléculas antisentido, ribozimas, secuencias de ácido nucleico inhibidoras pequeñas, por ejemplo, pero no se limitan a ARNi, shARNi, ARNip, ARNi micro (mARNi), oligonucleótidos antisentido, etc. Una proteína y/o péptido o fragmento del mismo pueden ser cualquier proteína de interés, por ejemplo, pero no se limitan a: proteínas mutadas; proteínas terapéuticas y proteínas truncadas, en donde la proteína es normalmente ausente o expresada a niveles más bajos en la célula. Las proteínas también se pueden seleccionar de un grupo que comprende; proteínas mutadas, proteínas genéticamente modificadas, péptidos, péptidos sintéticos, proteínas recombinantes, proteínas quiméricas, anticuerpos, anticuerpos, minicuerpos, diacuerpos, proteínas humanizadas, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, proteínas modificadas y fragmentos de los mismos. Alternativamente, el agente puede ser intracelular dentro de la célula como resultado de la introducción de una secuencia de ácido nucleico en la célula y su transcripción resulta en la producción del ácido nucleico y/o inhibidor de la proteína de Lp-PLA₂ dentro de la célula. El agente puede ser cualquier producto químico, entidad o fracción, incluyendo sin limitación entidades no proteicas sintéticas y de origen natural. El agente puede ser una molécula pequeña que tiene una fracción química. Por ejemplo, las fracciones químicas incluyen fracciones heterocíclica o aromática, alquilo sustituido o no sustituido, incluyendo macrólidos, leptomicinas y productos naturales relacionados o análogos de los mismos. Los agentes pueden ser conocidos por tener una actividad y/o propiedad deseada, o se pueden seleccionar de una biblioteca de diversos compuestos.

55 El término "inhibición" como se utiliza en este documento significa que la expresión o actividad de la proteína de Lp-PLA₂ o variantes u homólogos de los mismos se reduce a un grado, y/o durante un tiempo, suficiente para producir el efecto deseado. La reducción de la actividad puede ser debido a que afecta a una o más características de Lp-PLA₂ incluyendo la disminución de su actividad catalítica o mediante la inhibición de un cofactor de Lp-PLA₂ o mediante el enlace a Lp-PLA₂ con un grado de avidéz que es tal que el resultado es el de tratar o prevenir un trastorno neurodegenerativo o BBB anormal tal como una BBB permeable. En particular, la inhibición de Lp-PLA₂ puede ser determinada utilizando un ensayo para la inhibición de Lp-PLA₂, por ejemplo, pero no se limita a, el uso del bioensayo para la proteína Lp-PLA₂ según se describe en el presente documento.

60 Tal como se utiliza en este documento, el término "Lp-PLA₂" se refiere a la proteína objetivo a ser inhibida por los métodos descritos en el presente documento. Lp-PLA₂ se utiliza indistintamente con Lp-PLA₂ y la fosfolipasa A₂ asociada a lipoproteína, también conocida previamente en la técnica como acetilhidrolasa del factor activador de

plaquetas (acetil hidrolasa de PAF). La Lp-PLA₂ humana está codificada por el ácido nucleico correspondiente al No de acceso: U20157 (SEQ ID NO: 1) o Ref Seq ID: NM_005084 (SEQ ID NO: 2) o/y la Lp-PLA₂ humana corresponde a la secuencia de proteína correspondiente al No de acceso: NP_005075 (SEQ ID NO: 3), que se revela en la solicitud de patente de EE:UU. 5,981,252.

5

Tal como se usa en el presente documento, "silenciamiento génico" o "gen silenciado" en referencia a una actividad de una molécula de ARNi, por ejemplo un ARNip o ARNmi se refiere a una disminución en el nivel de ARNm en una célula de un gen diana por al menos aproximadamente el 5%, aproximadamente 10%, aproximadamente el 20%, aproximadamente el 30%, aproximadamente el 40%, aproximadamente el 50%, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 99%, aproximadamente 100 % del nivel de ARNm que se encuentra en la célula sin la presencia de la molécula de interferencia de ARNmi o ARN. Los niveles de ARNm pueden ser disminuidos por al menos aproximadamente 70%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 99%, aproximadamente el 100%.

10

15

Tal como se usa en el presente documento, el término "ARNi" se refiere a cualquier tipo de ARN de interferencia, incluyendo, pero no se limitan a, siARNi, shARNi, microARN endógeno y microARN artificial. Por ejemplo, incluye secuencias identificadas anteriormente como ARNip, independientemente del mecanismo de procesamiento en dirección 3' del ARN (i.e. aunque se cree que el siRNAs tiene un método específico del procesamiento *in vivo* dando como resultado de la escisión del ARNm, tales secuencias pueden ser incorporadas en los vectores en el contexto de las secuencias flanqueantes descritas en el presente documento).

20

Tal como se usa en el presente documento un "ARNip" se refiere a un ácido nucleico que forma un ARN bicatenario, cuyo ARN de doble cadena tiene la capacidad de reducir o inhibir la expresión de un gen o genes diana cuando el ARNip está presente o expresado en la misma célula como el gen diana, por ejemplo, la Lp-PLA₂. El ARN bicatenario, ARNip puede estar formado por las cadenas complementarias. Un ARNip se puede referir a un ácido nucleico que puede formar un ARNip de doble cadena. La secuencia del ARNip puede corresponder al gen diana de longitud completa, o una subsecuencia del mismo. Por lo general, el ARNip tiene al menos aproximadamente 15-50 nucleótidos de longitud (por ejemplo, cada secuencia complementaria del ARNip de doble cadena tiene aproximadamente 15-50 nucleótidos de longitud, y el ARNip de doble cadena tiene aproximadamente 15-50 pares de bases de longitud, preferiblemente aproximadamente 19 - 30 nucleótidos de base, preferiblemente alrededor de 20 - 25 nucleótidos de longitud, por ejemplo, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 nucleótidos de longitud).

25

30

Como se usa en el presente documento "ARNsh" o "ARN de horquilla pequeño" (también llamado tallo bucle) es un tipo de ARNip. Estos ARNsh pueden estar compuestos de uno corto, por ejemplo, aproximadamente 19 a aproximadamente 25 nucleótidos, cadena antisentido, seguido por un bucle de nucleótidos de aproximadamente 5 a aproximadamente 9 nucleótidos, y la cadena sentido análoga. Alternativamente, la cadena sentido puede preceder a la estructura de bucle de nucleótidos y la cadena antisentido puede seguir.

35

Los términos "microARN" o "ARNmi" se usan indistintamente en el presente documento son los ARN endógenos, algunos de los cuales se sabe que regulan la expresión de genes codificantes de proteínas a nivel postranscripcional. El microARN endógeno son ARNs pequeños presentes de forma natural en el genoma que son capaces de modular la utilización productiva de ARNm. El término microARN artificial incluye cualquier tipo de secuencia de ARN, que no sea microARN endógeno, que es capaz de modular la utilización productiva de ARNm. Secuencias de microARN se han descrito en publicaciones tales como Lim, et al., *Genes & Development*, 17, p. 991-1008 (2003), Lim et al *Science* 299, 1540 (2003), Lee and Ambros *Science*, 294, 862 (2001), Lau et al., *Science* 294, 858-861 (2001), Lagos-Quintana et al, *Current Biology*, 12, 735-739 (2002), Lagos Quintana et al, *Science* 294, 853-857 (2001), and Lagos-Quintana et al, *ARN*, 9, 175-179 (2003). Múltiples micro-ARN también se pueden incorporar en una molécula precursora. Además, los tallo-bucles similares a ARNmi se pueden expresar en células como un vehículo para entregar ARNmi artificiales y ARN de interferencia pequeño (ARNip) con el fin de modular la expresión de genes endógenos a través de las vías de ARNmi y o ARNi.

40

45

50

Tal como se usa en el presente documento, "ARN de doble cadena" o "ARNds" se refiere a moléculas de ARN que se componen de dos cadenas. Las moléculas de doble cadena incluyen aquellas compuestas de una sola molécula de ARN que se doblan sobre sí misma para formar una estructura dos cadenas. Por ejemplo, la estructura de tallo bucle de las moléculas precursoras de la que se deriva el ARNmi monocatenario, llamado el pre-ARNmi (Bartel et al. 2004. *Cell* 116:281-297), comprende una molécula de ARNds.

55

Los términos "paciente", "sujeto" y "persona" se utilizan indistintamente en este documento, y se refieren a un animal, particularmente un ser humano, a quien se le proporciona tratamiento, incluyendo el tratamiento profiláctico. El término "sujeto" como se utiliza en este documento, se refiere a los animales humanos y no humanos. El término "animales no humanos" y "mamíferos no humanos" se usan indistintamente en el presente documento, incluye todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos, tales como primates no humanos, (en particular primates superiores), ovejas, perros, roedores (por ejemplo, ratón o rata), conejillo de indias, cabra, cerdo, gato, conejos, vacas, y no mamíferos tales como pollos,

60

anfibios, reptiles, etc. El sujeto puede ser humano. El sujeto puede ser un animal experimental o animal sustituto como un modelo de enfermedad.

5 El término "gen" utilizado en este documento puede ser un gen genómico que comprende secuencias reguladoras transcripcionales y/o traduccionales y/o una región codificante y/o secuencias no traducidas (por ejemplo, intrones, secuencias no traducidas 5'-y 3'- y secuencias reguladoras). La región codificante de un gen puede ser una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos o un ARN funcional, tal como ARNt, ARNr, ARN catalítico, ARNip, ARNmi y ARN antisentido. Un gen también puede ser un ARNm o ADNc correspondiente a las regiones codificantes (por ejemplo, exones y ARNmi) que opcionalmente comprende secuencias no traducidas en dirección 5 'o 3' relacionadas con las mismas. Un gen también puede ser una molécula de ácido nucleico amplificado producida *in vitro* que comprende la totalidad o una parte de la región codificante y/o secuencias no traducidas en dirección 5 'o 3' relacionadas con las mismas.

15 El término "ácido nucleico" u "oligonucleótido" o "polinucleótido" utilizado en este documento puede significar al menos dos nucleótidos unidos juntos covalentemente. Como será apreciado por aquellos en la técnica, la representación de una sola cadena también define la secuencia de la cadena complementaria. Por lo tanto, un ácido nucleico también abarca la cadena complementaria de una sola cadena representada. Como también será apreciado por los expertos en la técnica, muchas variantes de un ácido nucleico se pueden utilizar para el mismo propósito como un ácido nucleico dado. Por lo tanto, un ácido nucleico también abarca ácidos nucleicos sustancialmente idénticos y complementos de los mismos. Como también será apreciado por aquellos en la técnica, una sola cadena provee una sonda para una sonda que puede hibridar a la secuencia diana en condiciones de hibridación rigurosas. Por lo tanto, un ácido nucleico también abarca una sonda que se hibrida en condiciones de hibridación rigurosas.

25 Los ácidos nucleicos pueden ser de cadena sencilla o de cadena doble, o pueden contener porciones tanto de secuencia de doble cadena como de cadena sencilla. El ácido nucleico puede ser ADN, tanto genómico como ADNc, ARN, o un híbrido, donde el ácido nucleico puede contener combinaciones de nucleótidos desoxirribo- y ribonucleótidos, y combinaciones de bases incluyendo uracilo, adenina, timina, citosina, guanina, inosina, xantina, hipoxantina, isocitosina e isoguanina. Los ácidos nucleicos pueden ser obtenidos por métodos de síntesis química o por métodos recombinantes

30 Un ácido nucleico generalmente contendrá enlaces fosfodiéster, aunque los análogos de ácidos nucleicos pueden ser incluidos, que puede tener al menos un enlace diferente, por ejemplo, enlaces fosforamidato, fosforotioato, fosforoditioato, o O-metilfosforoamidita y esqueletos y enlaces de ácido peptidonucleico. Otros ácidos nucleicos análogos incluyen aquellos con esqueletos positivos; esqueletos no iónicos y esqueletos no ribosa, incluyendo los descritos en la Patente de EE.UU. Nos. 5,235,033 y 5, 034,506. Los ácidos nucleicos que contienen uno o más nucleótidos modificados o de origen no natural también se incluyen dentro de una definición de ácidos nucleicos. El análogo de nucleótido modificado puede estar situado por ejemplo en el extremo 5' y/o el extremo 3' de la molécula de ácido nucleico. Los ejemplos representativos de análogos de nucleótidos se pueden seleccionar de ribonucleótidos modificados de esqueleto o azucareros. Cabe señalar, sin embargo, que también son apropiados los ribonucleótidos modificados en la nucleobase, i.e. ribonucleótidos, que contienen una nucleobase de origen no natural en lugar de una nucleobase de origen natural tal como uridinas o citidinas modificadas en la posición 5, por ejemplo, 5-(2-amino) propil uridina, 5-bromo uridina; adenosinas y guanosinas modificadas en la posición 8, por ejemplo, 8-bromo guanosina; desaza nucleótidos, por ejemplo 7 deaza-adenosina; nucleótidos O- y N- alquilados, por ejemplo N6-metil adenosina. El grupo OH- 2' puede ser sustituido por un grupo seleccionado de H, OR, R, halo, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂ o CN, en donde R es alquilo C- C₆, alquenilo o alquinilo y halo es F, Cl, Br o I.

50 Las modificaciones del esqueleto de ribosa-fosfato se puede hacer por una variedad de razones, por ejemplo, para aumentar la estabilidad y vida media de tales moléculas en entornos fisiológicos o como sondas en un biochip. Se pueden hacer las mezclas de ácidos nucleicos de origen natural y análogos; alternativamente, las mezclas de diferentes análogos de ácidos nucleicos, y se pueden hacer mezclas de ácidos nucleicos de origen natural y análogos.

55 El término "vector" utilizado en este documento se refiere a una secuencia de ácido nucleico que contiene un origen de replicación. Un vector puede ser un plásmido, bacteriófago, cromosoma artificial bacteriano o cromosoma artificial de levadura. Un vector puede ser un vector de ADN o ARN. Un vector puede ser un vector extracromosómico auto replicante o un vector que se integra en un genoma huésped.

60 Tal como se utiliza en este documento, el término "tratar" incluye reducir o aliviar al menos un efecto adverso o síntoma de una afección, enfermedad o trastorno asociado con BBB permeable y/o la demencia vascular y/o la enfermedad de Alzheimer. Tal como se utiliza en este documento, el término tratamiento se utiliza para referirse a la reducción de un síntoma y/o un marcador bioquímico de la enfermedad de Alzheimer por lo menos un 10%. Por ejemplo, pero no se limitan a, una reducción en un marcador bioquímico de la enfermedad de Alzheimer, por ejemplo una reducción en la deposición de la placa amiloide en un 10%, o una reducción en la activación de células gliales, por ejemplo una reducción en células que expresan GFAP por 10 %, serían considerados tratamientos eficaces por los métodos descritos en el presente documento. Como ejemplos alternativos, una reducción en un síntoma, por ejemplo, una disminución de la tasa de pérdida de memoria en un 10% o un cese de la tasa de disminución de la memoria, o una

reducción en la pérdida de memoria en un 10% o una mejora en la memoria por 10% también serían considerados como tratamientos eficaces por los métodos descritos en el presente documento.

5 El término "cantidad eficaz" como se utiliza en este documento se refiere a la cantidad de agente terapéutico de la composición farmacéutica para reducir o detener al menos un síntoma de la enfermedad o trastorno, por ejemplo un síntoma o trastorno de una BBB defectuosa o demencia vascular. Por ejemplo, una cantidad eficaz utilizando los métodos según se describe en este documento sería considerada como la cantidad suficiente para reducir un síntoma de la enfermedad o trastorno, por ejemplo demencia vascular o permeabilidad de BBB por al menos un 10%. Una cantidad eficaz como se usa en el presente documento también incluiría una cantidad suficiente para prevenir o retrasar el desarrollo de un síntoma de la enfermedad, alterar el curso de un síntoma de la enfermedad (por ejemplo, pero no limitando a, retardar el progreso de un síntoma de la enfermedad), o revertir un síntoma de la enfermedad.

15 Tal como se usa en este documento, los términos "administración" e "introducción" se utilizan indistintamente y se refieren a la colocación de los agentes que inhiben la Lp-PLA₂ según se describe en este documento en un sujeto por un método o ruta que se traduce en al menos la localización parcial de los agentes en un sitio deseado. Los compuestos se pueden administrar por cualquier vía apropiada que da como resultado un tratamiento eficaz en el sujeto.

20 El término "vectores" se utiliza indistintamente con "plásmido" para referirse a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Los vectores capaces de dirigir la expresión de secuencias de genes y/o de ácido nucleico al cual están unidos operativamente se denominan en este documento como "vectores de expresión". En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinantes están a menudo en forma de "plásmidos" que se refieren a bucles de ADN bicatenario circular que, en su forma de vector no están unidos al cromosoma. Se pueden utilizar otros vectores de expresión, por ejemplo, pero no se limitan a, plásmidos, episomas, bacteriófagos o vectores virales, y dichos vectores pueden integrarse en el genoma del huésped o replicarse de forma autónoma en la célula particular. También pueden ser utilizadas otras formas de vectores de expresión conocidas por los expertos en la técnica que prestan las funciones equivalentes. Los vectores de expresión comprenden vectores de expresión para la expresión estable o transitoria que codifica el ADN.

30 Los artículos "un" y "una" se utilizan en este documento para referirse a uno o a más de uno (i.e. a al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

Lp-PLA₂: Información General

35 La Lp-PLA₂ también se conoce en la técnica como alias Lp-PLA₂, LDL-PLA₂, fosfolipasa A₂ asociada a la lipoproteína, PLA2G7, fosfolipasa A₂ (grupo VII), o acetil hidrolasa del factor activador de plaquetas (acetil hidrolasa de PAF o PAFAH) . La Lp-PLA₂ humana está codificada por el ácido nucleico correspondiente a GenBank No de acceso: U20157 (SEQ ID NO: 1) o Ref Seq ID: NM_005084 (SEQ ID NO: 2) y la Lp-PLA₂ humana corresponde a la secuencia de proteína correspondiente a GenBank No de acceso: NP_005075 (SEQ ID NO: 3), que se revelan en la Patente de EE.UU. 5,981,252..

40 La lipoproteína asociada a la fosfolipasa A₂(Lp-PLA₂) de la enzima fosfolipasa A₂, la secuencia, el aislamiento y la purificación de la misma, los ácidos nucleicos aislados que codifican la enzima, y las células huésped recombinantes transformadas con ADN que codifican la enzima se describen en el documento WO 95/00649 (SmithKline Beecham plc). Una publicación posterior del mismo grupo adicionalmente describe esta enzima (Tew D et al, *Arterioscler Thromb Vas Biol* 1996: 16; 591-9) en donde se denomina como LDL-PLA₂ y la solicitud de patente posterior (WO 95/09921, Icos Corporation) y una publicación relacionada en *Nature* (Tjoelker et al, vol 374, 6 abril de 1995, 549) describen la enzima PAF-AH que tiene esencialmente la misma secuencia que la Lp-PLA₂.

50 Se ha demostrado que la Lp-PLA₂ es responsable de la conversión de la fosfatidilcolina a lisofosfatidilcolina, durante la conversión de la lipoproteína de baja densidad (LDL) a su forma oxidada. La enzima es conocida por hidrolizar el éster sn-2 de la fosfatidilcolina oxidada para dar la lisofosfatidilcolina y un ácido graso modificado oxidativamente. Ambos productos de la acción de Lp-PLA₂ son biológicamente activos con la lisofosfatidilcolina, en particular que tiene varias actividades proaterogénicas atribuidas a ella, incluyendo la quimiotaxis de monocitos y la inducción de disfunción endotelial, las cuales facilitan la acumulación de macrófagos derivados de los monocitos dentro de la pared de la arteria.

55 Los inventores han descubierto que han encontrado animales propensos a trastornos caracterizados por la fuga en BBB que muestran una BBB intacta y reducen los signos de la permeabilidad de BBB, cuando se tratan con un inhibidor de Lp-PLA₂. Tales animales tratados con un inhibidor de Lp-PLA₂ también mostraron signos reducidos de la demencia vascular, y acumulación reducida de betaamiloide en el tejido cerebral y en los vasos sanguíneos que circulan por el cerebro en comparación con los animales no tratados con el inhibidor. Por lo tanto, los inhibidores de Lp-PLA₂ se pueden utilizar para tratar y/o prevenir enfermedades y trastornos con permeabilidad de BBB, por ejemplo, pero no se limitan a enfermedades neurodegenerativas. Ejemplos de enfermedades neurodegenerativas susceptibles al tratamiento y/o prevención usando los métodos según se describe en el presente documento incluyen, pero no se limitan a la demencia vascular, enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades neurodegenerativas, por ejemplo la Enfermedad de Huntington y la Enfermedad de Parkinson.

Agentes que inhiben la Lp-PLA₂

Los métodos descritos en este documento se refieren a la inhibición de la Lp-PLA₂. La inhibición puede ser la inhibición de los transcritos de ácido nucleico que codifican Lp-PLA₂, por ejemplo la inhibición del ARN mensajero (ARNm). Alternativamente, la inhibición de Lp-PLA₂ puede ser la inhibición de la expresión y/o inhibición de la actividad del producto del gen de la Lp-PLA₂, por ejemplo, el polipéptido o proteína Lp-PLA₂, o isoformas de las mismas. Tal como se utiliza en este documento, el término "producto génico" se refiere a ARN transcrito a partir de un gen, o un polipéptido codificado por un gen o traducida de ARN.

La inhibición de la Lp-PLA₂ puede ser por un agente. Se puede usar cualquier agente, por ejemplo pero no se limita a los ácidos nucleicos, análogos de ácidos nucleicos, péptidos, fagos, fagémidos, polipéptidos, peptidomiméticos, ribosomas, aptámeros, anticuerpos, moléculas orgánicas o inorgánicas pequeñas o grandes, o cualquier combinación de los mismos. Los agentes útiles en los métodos descritos en este documento incluyen agentes que funcionan como inhibidores de la expresión de Lp-PLA, por ejemplo inhibidores de ARNm que codifican Lp-PLA.

Agentes útiles en los métodos según se describe en este documento también pueden inhibir la expresión génica (i.e. suprimir y/o reprimir la expresión del gen). Tales agentes se denominan en la técnica como "silenciadores de genes" y se conocen comúnmente por los expertos normales en la técnica. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a una secuencia de ácido nucleico, por un ARN, ADN o análogo de ácido nucleico, y pueden ser de cadena sencilla o doble, y pueden seleccionarse de un grupo que comprende ácido nucleico que codifica una proteína de interés, oligonucleótidos, ácidos nucleicos, análogos de ácidos nucleicos, por ejemplo, pero no se limitan al ácido peptidonucleico (PNA), pseudo-PNA complementario (pc-PNA), ácidos nucleicos bloqueados (LNA) y derivados de los mismos etc. Los agentes de ácidos nucleicos también incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a secuencias de ácido nucleico que codifican proteínas que actúan como represores de la transcripción, moléculas antisentido, ribozimas, secuencias de ácido nucleico inhibitoras pequeñas, por ejemplo, pero no se limitan a ARNi, shARNi, ARNip, ARNi micro (ARNmi), oligonucleótidos antisentido, etc.

Tal como se usa en el presente documento, los agentes útiles en los métodos descritos como inhibidores de la expresión de Lp-PLA₂ y/o inhibición de la función de la proteína de Lp-PLA₂ pueden ser cualquier tipo de entidad, por ejemplo, pero no se limitan a los productos químicos, las secuencias de ácidos nucleicos, análogos de ácido nucleico, proteínas, péptidos o fragmentos de los mismos. El agente puede ser cualquier producto químico, entidad o fracción, incluyendo sin limitación, entidades no proteicas sintéticas y de origen natural. El agente puede ser una molécula pequeña que tiene una fracción química. Por ejemplo, la fracción química puede ser un compuesto a base de pirimidina, según se describe en el presente documento.

Agentes útiles en los métodos según se describe en el presente documento pueden ser proteínas y/o péptidos o fragmento de los mismos, que inhiben la expresión génica de Lp-PLA₂ o la función de la proteína Lp-PLA₂. Tales agentes incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a variantes de proteínas, proteínas mutadas, proteínas terapéuticas, proteínas truncadas y fragmentos de proteínas. Los agentes de proteínas también se pueden seleccionar de un grupo que comprende proteínas mutadas, proteínas modificadas genéticamente, péptidos, péptidos sintéticos, proteínas recombinantes, proteínas quiméricas, anticuerpos, midibodies, minibodies, triabodies, proteínas humanizadas, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, proteínas modificadas y fragmentos de los mismos .

Alternativamente, los agentes útiles en los métodos según se describe en el presente documento como inhibidores de la Lp-PLA₂ pueden ser un producto químico, molécula pequeña, molécula grande o entidad o fracción, incluyendo sin limitación entidades no proteicas sintéticas y de origen natural. El agente puede ser una molécula pequeña que tiene las fracciones químicas según se describe en el presente documento.

Moléculas pequeñas

Los agentes que inhiben la Lp-PLA₂ pueden ser moléculas pequeñas. Los inhibidores irreversibles o reversibles de Lp-PLA₂ pueden ser utilizados en los métodos descritos en este documento.

Los inhibidores irreversibles de Lp-PLA₂ se revelan en las solicitudes de patente WO 96/13484, WO96/19451, WO97/02242, WO97/217675, WO97/217676, WO 97/41098, y WO97/41099 (SmithKline Beecham plc) y revelan *inter alia* varias series de compuestos de 4-tionilo/sulfinilo/sulfonilo azetidina que son inhibidores de la enzima Lp-PLA₂. Estos son inhibidores de acilación, irreversibles (Tew et al, Biochemistry 37, 10087, 1998).

Los inhibidores de Lp-PLA₂ eficaces en los seres humanos son comúnmente conocidos por personas de experiencia normal e incluyen los sometidos a evaluación, por ejemplo, que se someten a la evaluación preclínica y clínica, incluyendo los ensayos clínicos de Fase II. Se ha presentado y publicado por SmithKline Beecham y su sucesor GlaxoSmithKline un número de solicitudes. Una lista de las aplicaciones publicadas pertinentes asignadas a la misma es: WO01/60805, WO02/30904, WO03/016287, WO00/66567, WO03/042218, WO03/042206, WO03/042179, WO03/041712, WO03/086400, WO03/087088, WO02/30911, WO99/24420, WO00/66566, WO00/68208, WO00/10980,

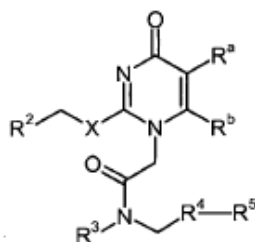
y WO2005/021002. Además, se hace referencia a las solicitudes provisionales de EE.UU. 60/829,328 y 60/829,327, siendo ambas presentadas el 13 de octubre de 2006.

Otros inhibidores de Lp-PLA₂ útiles en los métodos según se describe en el presente documento, se describen en las solicitudes de patentes publicadas, por ejemplo WO2006063791-A1, WO2006063811-A1, WO2006063812-A1, WO2006063813-A1, todas en el nombre de Bayer Healthcare; y US2006106017-A1 asignado a Korea Res. Inst. Bioscience & Biotechnology. Los inhibidores de Lp-PLA₂ también incluyen agentes conocidos, por ejemplo pero no limitando a incluir el uso de estatinas con Niacina (véase www.genengnews.com/news/bnitem.aspx?name=6724568) y fenofibrato (véase www.genengnews.com/news/bnitem.aspx?name=14817756&taxid=19).

Se cree que cualquiera o todos los compuestos revelados en estos documentos son útiles para la profilaxis o tratamiento de enfermedades y trastornos neurodegenerativos, incluyendo, por ejemplo, pero no se limitan a la demencia vascular y la enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades neurodegenerativas como se revela en este documento donde se produce BBB anormal. El modelo de porcino de permeabilidad de BBB y la enfermedad neurodegenerativa se describe en el presente documento como se ejemplifica en los Ejemplos se puede utilizar por una persona con experiencia normal en la técnica para determinar cuál de los compuestos descritos u otros inhibidores de Lp-PLA₂, por ejemplo anticuerpos, o ARNi son eficaces para el tratamiento o prevención de enfermedades o trastornos neurodegenerativos como se reivindica en el presente documento. Los agentes que inhiben la Lp-PLA₂ se pueden evaluar en modelos de animales para el efecto en el alivio de la permeabilidad de BBB. Por ejemplo, se puede utilizar el modelo porcino de la hiperglicemia e hipercolesterolemia como se revela en los Ejemplos en este documento, donde la permeabilidad de BBB es anormal, por ejemplo, la BBB es permeable, en la cual la permeabilidad de BBB se puede evaluar en la presencia y ausencia de inhibidores para Lp-PLA₂ por métodos comúnmente conocidos por las personas en la técnica. Se pueden utilizar los marcadores de la función de BBB, por ejemplo, como se revela en la Patente de EE.UU. 6,884,591.

Los inhibidores de Lp-PLA₂ según se describe en la Patente de EE.UU. 6,649,619 y 7,153,861 (y la Solicitud Internacional WO 01/60805) y la Patente de EE.UU. 7,169,924 (y la Solicitud de Patente Internacional WO 02/30911), son útiles en los métodos descritos en el presente documento para la profilaxis o para el tratamiento de la demencia vascular, por ejemplo la enfermedad de Alzheimer y/o trastornos de la permeabilidad de BBB. Los inhibidores de Lp-PLA₂ como se revelan en la publicación No. 2005/0033052A1 y las Solicitudes de Patentes Internacionales WO 02/30904, WO 03/042218, WO 03/042206, WO03/042179, WO 03/041712, WO03/086400, y WO 03/87088 son inhibidores reversibles de Lp-PLA₂.

Fórmula (I) se puede utilizar un grupo de inhibidores reversibles de Lp-PLA₂ que se revelan en la solicitud internacional WO 01/60805, de la que surgieron las Patentes de EE:UU. 6,649,619 y 7,153,861. Un grupo más estrecho de compuestos de interés son aquellos de fórmula (I) descritos en el documento WO 01/60805 y reivindicados en las Patentes de EE:UU. 6,649,619 y 7,153,861, a saber:



(I)

en donde:

R^a y R^b junto con los átomos de carbono del anillo de pirimidina al cual están unidos forman un anillo carbocíclico de 5 miembros fusionado;

R² es fenilo, sustituido por uno a tres átomos de flúor;

R³ es metilo o alquilo C₍₁₋₃₎ sustituido por NR⁸R⁹; o

R³ es Het-alquilo C₍₀₋₂₎ en donde Het es un anillo heterocíclico de 5 a 7 miembros que tiene N y en la que N es no sustituido o sustituido por un alquilo C₍₁₋₆₎;

R⁴ y R⁵ juntos forman una fracción de 4- (4-trifluorometilfenil) fenilo;

R⁸ y R⁹, que pueden ser iguales o diferentes, se seleccionan del grupo que consiste de hidrógeno, o alquilo C₍₁₋₆₎;

X es S, o una sal de este farmacéuticamente aceptable.

De aún mayor interés son los siguientes compuestos, todos dentro del alcance de la fórmula (I) y revelados en la solicitud y patentes indicadas anteriormente:

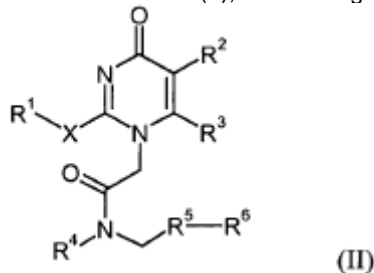
- 5 1-(N-(2-(dietilamino)etil)-N-(4-(4-trifluorometilfenil)bencil)-aminocarbonilmetil)-2-(4-fluorobencil)tio-5,6-trimetilenopirimidin-4-ona, utilizado en el estudio en porcinos descrito en este documento;
- 1-(N-(2-(dietilamino)etil)-N-(4-(4-trifluorometilfenil)bencil)-aminocarbonilmetil)-2-(2,3-difluorobencil)tio-5,6-trimetilenopirimidin-4-ona;
- 10 1-(N-(2-(dietilamino)etil)-N-(4-(4-trifluorometilfenil)bencil)amino-carbonilmetil)-2-(3,4-difluorobencil)tio-5,6-trimetilenopirimidin-4-ona;
- 1-(N-(2-(dietilamino)etil)-N-(4-(4-trifluorometilfenil)bencil)amino-carbonilmetil)-2-(2,3,4-trifluorobencil)tio-5,6-trimetilenopirimidin-4-ona;
- 15 1-(N-(2-(dietilamino)etil)-N-(4-(4-trifluorometilfenil)bencil)amino-carbonilmetil)-2-(2-fluorobencil)tio-5,6-trimetilenopirimidin-4-ona;
- 1-(N-metil-N-(4-(4-trifluorometilfenil)bencil)aminocarbonilmetil)-2-(4-fluorobencil)tio-5,6-trimetilenopirimidin-4-ona;
- 20 1-(N-(2-(1-piperidino)etil)-N-(4-(4-trifluorometilfenil)bencil)amino-carbonilmetil)-2-(4-fluorobencil)tio-5,6-trimetilenopirimidin-4-ona;
- 1-(N-(1-etilpiperidin-4-il)-N-(4-(4-trifluorometilfenil)bencil)amino-carbonilmetil)-2-(4-fluorobencil)tio-5,6-trimetilenopirimidin-4-ona;
- 25 1-(N-(2-etilamino-2-metilpropil)-N-(4-(4-trifluorometilfenil)bencil)-aminocarbonilmetil)-2-(4-fluorobencil)tio-5,6-trimetilenopirimidin-4-ona;
- N-(2-tert-butilaminoetil)-N-(4-(4-trifluorometilfenil)bencil)amino-carbonilmetil)-2-(4-fluorobencil)tio-5,6-trimetilenopirimidin-4-ona;
- 30 1-(N-(1-metilpiperidin-4-il)-N-(4-(4-trifluorometilfenil)bencil)-aminocarbonilmetil)-2-(4-fluorobencil)tio-5,6-trimetilenopirimidin-4-ona;
- 1-(N-(1-isopropilpiperidin-4-il)-N-(4-(4-trifluorometilfenil)bencil)-aminocarbonilmetil)-2-(4-fluorobencil)tio-5,6-trimetilenopirimidin-4-ona;
- 35 1-(N-(1-(2-metoxietil)piperidin-4-il)-N-(4-(4-trifluorometilfenil)bencil)-aminocarbonilmetil)-2-(4-fluorobencil)tio-5,6-trimetilenopirimidin-4-ona;
- 1-(N-(2-(etilamino)etil)-N-(4-(4-trifluorometilfenil)bencil)-aminocarbonilmetil)-2-(4-fluorobencil)tio-5,6-trimetilenopirimidin-4-ona; o una sal farmacéuticamente aceptable de estos compuestos.

Los Métodos de preparación de estos compuestos se revelan en los documentos señalados.

- 45 Un segundo proceso de fabricación de 1-(N-(2-(dietilamino)etil)-N-(4-(4-trifluorometilfenil)bencil)-aminocarbonilmetil)-2-(4-fluorobencil)tio-5,6-trimetilenopirimidin-4-ona se puede encontrar en la solicitud WO 03/016287 (publicación de EE. UU. No 20050014793A1).

Fórmula (II)

- 50 Un grupo adicional de compuestos que pueden ser útiles en la práctica de los métodos descritos se revelan en el documento WO02/30911; Patente de EE. UU. 7,169,924 corresponde a esta solicitud internacional. La fórmula genérica en ese caso, representada en este documento como fórmula (II), es de la siguiente manera:



- 55 en la cual:

- R¹ es un grupo arilo, opcionalmente sustituido con 1, 2, 3 o 4 sustituyentes que pueden ser iguales o diferentes, seleccionados de alquilo C₍₁₋₆₎, alcoxi C₍₁₋₆₎, alquiltio C₍₁₋₆₎, hidroxilo, halógeno, CN, y mono a perfluoro-alquilo C₍₁₋₄₎;
- 5 R² es halógeno, alquilo C₍₁₋₃₎, alcoxi C₍₁₋₃₎, hidroxialquilo C₍₁₋₃₎, alquiltio C₍₁₋₃₎, alquilo C₍₁₋₃₎sulfinilo, aminoalquilo C₍₁₋₃₎, mono- o di-alquilo C₍₁₋₃₎, aminoalquilo C₍₁₋₃₎, alquilo C₍₁₋₃₎ carbonilaminoalquilo C₍₁₋₃₎, alcoxi C₍₁₋₃₎alquilo C₍₁₋₃₎carbonilaminoalquilo C₍₁₋₃₎, alquilo C₍₁₋₃₎sulfonilaminoalquilo C₍₁₋₃₎, alquilo C₍₁₋₃₎carboxi, alquilo C₍₁₋₃₎carboxialquilo C₍₁₋₃₎, y
- 10 R³ es hidrógeno, halógeno, alquilo C₍₁₋₃₎, o hidroxialquilo C₍₁₋₃₎; o
- R² y R³ junto con los átomos de carbono del anillo de pirimidona al cual están unidos forman un anillo carbocíclico fusionado de 5-ó 6 miembros; o
- 15 R² y R³ junto con los átomos de carbono del anillo de pirimidona al cual están unidos forman un anillo benzo o un anillo heteroarilo fusionado, opcionalmente sustituido con 1, 2, 3 o 4 sustituyentes que pueden ser iguales o diferentes seleccionados de halógeno, alquilo C₍₁₋₄₎, ciano, alcoxi C₍₁₋₆₎, alquiltio C₍₁₋₆₎ o mono a perfluoro-alquilo C₍₁₋₄₎;
- 20 R⁴ es hidrógeno, alquilo C₍₁₋₆₎ que puede ser no sustituido o sustituido por 1, 2 o 3 sustituyentes seleccionados de hidroxilo, halógeno, OR⁷, COR⁷, carboxi, COOR⁷, CONR⁹R¹⁰, NR⁹R¹⁰, NR⁷COR⁸, mono- o di-(hidroxialquilo C₍₁₋₆₎)amino y N-hidroxialquilo C₍₁₋₆₎-N-alquilo C₍₁₋₆₎amino; o
- 25 R⁴ es Het-alquilo C₍₀₋₄₎ en donde Het es un N que comprende un anillo heterocíclico de 5 a 7 miembros y opcionalmente O o S, y en donde N puede ser sustituido por COR⁷, COOR⁷, CONR⁹R¹⁰, o alquilo C₍₁₋₆₎ opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 sustituyentes seleccionados entre hidroxilo, halógeno, OR⁷, COR⁷, carboxi, COOR⁷, CONR⁹R¹⁰ o NR⁹R¹⁰, por ejemplo, piperidin-4-ilo, pirrolidin-3-ilo;
- 30 R⁵ es un grupo arilo o un anillo heteroarilo opcionalmente sustituido con 1, 2, 3 o 4 sustituyentes que pueden ser iguales o diferentes, seleccionados de alquilo C₍₁₋₆₎, alcoxi C₍₁₋₆₎, alquiltio C₍₁₋₆₎, arilalcoxi C₍₁₋₆₎, hidroxilo, halógeno, CN, COR⁷, carboxi, COOR⁷, NR⁷COR⁸, CONR⁹R¹⁰, SO₂NR⁹R¹⁰, NR⁷SO₂R⁸, NR⁹R¹⁰, mono a perfluoro-alquilo C₍₁₋₄₎ y mono a perfluoro-alcoxi C₍₁₋₄₎;
- 35 R⁶ es un grupo arilo o un anillo heteroarilo que además es opcionalmente sustituido con 1, 2, 3 o 4 sustituyentes que pueden ser iguales o diferentes, seleccionados de alquilo C₍₁₋₁₈₎, alcoxi C₍₁₋₁₈₎, alquiltio C₍₁₋₆₎, alquilo C₍₁₋₆₎sulfinilo, arilalcoxi C₍₁₋₆₎, hidroxilo, halógeno, CN, COR⁷, carboxi, COOR⁷, CONR⁹R¹⁰, NR⁷COR⁸, SO₂NR⁹R¹⁰, NR⁷SO₂R⁸, NR⁹R¹⁰, mono a perfluoro-alquilo C₍₁₋₄₎ y mono a perfluoro-alcoxi C₍₁₋₄₎, o alquilo C₍₅₋₁₀₎;
- 40 R⁷ es hidrógeno o alquilo C₍₁₋₁₂₎, por ejemplo alquilo C₍₁₋₄₎ (por ejemplo metilo o etilo);
- R⁸ es hidrógeno, o alquilo C₍₁₋₆₎, o alquilo C₍₁₋₁₂₎, por ejemplo alquilo C₍₁₋₄₎ (por ejemplo metilo o etilo);
- 45 R⁹ y R¹⁰, que pueden ser iguales o diferentes se seleccionan cada uno entre hidrógeno, o alquilo C₍₁₋₁₂₎, o R⁹ y R¹⁰ junto con el nitrógeno al cual están unidos forman un anillo de 5 a 7 miembros que contiene opcionalmente uno o más heteroátomos adicionales seleccionados de oxígeno, nitrógeno y azufre, y opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados entre hidroxilo, oxo, alquilo C₍₁₋₄₎, alquilo C₍₁₋₄₎carboxi, arilo, por ejemplo, fenilo, o aralquilo, por ejemplo bencilo, por ejemplo morfolina o piperazina; y
- X es alquileno C₍₂₋₄₎, opcionalmente sustituido con 1,2 ó 3 sustituyentes seleccionados de metilo y etilo, o CH = CH.
- 50 Todas las sales de fórmula (II), también, se pueden utilizar en el método de tratamiento descrito en el presente documento.
- 55 De particular interés son los compuestos de fórmula (II) en este documento, donde, como se señaló en el documento WO 02/30911 para la fórmula (I) ahí, R¹ puede ser un grupo fenilo opcionalmente sustituido con 1, 2, 3 o 4 sustituyentes que puede ser iguales o diferentes, seleccionados entre halo, alquilo C₁-C₆, trifluorometilo o alcoxi C₁-C₆. Más específicamente, el fenilo es no sustituido o sustituido por un 1, 2, 3 o 4 sustituyentes de halógeno, en particular, de 1 a 3 grupos fluoro, y más particularmente, 2,3-difluoro, 2,4-difluoro o 4-fluoro.
- Un ejemplo adicional de la fórmula (II) en este documento, es donde Y es -CH₂CH₂-.
- 60 Además, son de interés los compuestos de fórmula (II), en donde R² es hidrógeno, por defecto, o es halo, alquilo C₁-C₆, mono a perfluoro alquilo C₁-C₄, mono a perfluoro alcoxi C₁-C₄, o alcoxi C₁-C₆; particularmente mono a perfluoro alquilo C₁-C₄, mono a perfluoro alcoxi-C₁-C₄ o alcoxi C₁-C₆. De particular interés son los compuestos de fórmula (II) en donde R² es distinto de hidrógeno, n en (R²)_n es 1, 2, o 3, y el patrón de sustitución es meta y/o para, en particular para, i.e. un sustituyente en la posición 4. Ver también aquellos compuestos en donde R² es 4-trifluorometilo o 4-trifluorometoxi.
- 65

R³ y R⁴ pueden ser iguales o diferentes y son metilo, etilo, *n*-propilo o *n*-butilo. De particular interés son aquellos compuestos de fórmula (II) en el presente documento, donde R³ y R⁴ son iguales y son metilo, o etilo; el de particular interés es el metilo.

5 R⁵ puede ser hidrógeno, alquilo C₍₁₋₆₎ que es una cadena lineal o ramificada. De particular interés son el metilo, etilo, propilo, isopropilo, *n*-butilo, *sec*-butilo, *iso*-butilo, *t*-butilo, *n*-pentilo o *n*-hexilo.

Se apreciará que dentro de los compuestos de fórmula (II), en este documento hay un mayor subgrupo de compuestos en los que:

10

R¹ es fenilo sustituido con 2,3 difluoro;

R² y R³, junto con los átomos de carbono del anillo de pirimidina al cual están unidos, forman un anillo de ciclopentenilo 5 miembros fusionado;

15

R⁴ es 2-(dietilamino)etilo;

R⁵ es fenilo;

20

R⁶ es fenilo sustituido con trifluorometilo en la posición 4, o tien-2-ilo sustituido con trifluorometilo en la posición 5; y

X es (CH₂)₂.

Los compuestos particulares de fórmula (II) de interés, en el presente documento son:

25

N-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4,5,6,7-tetrahidro-ciclopentapirimidin-1-il]-*N*-(4'-trifluorometil-bifenil-4-ilmetil)acetamida;

30

N-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4,5,6,7-tetrahidro-ciclopentapirimidin-1-il]-*N*-(4'-trifluorometil-bifenil-4-ilmetil)acetamida bitartrato;

N-(2-etilamino-2-metil-propil)-2-(2-(2-(2,3-difluorofenil)-etil)-4-oxo-4,5,6,7-tetrahidro-ciclopentapirimidin-1-il)-*N*-(4'-trifluorometil-bifenil-4-ilmetil)-acetamida bitartrato;

35

N-(2-*t*-butilaminoetil)-2-(2-(2-(2,3-difluorofenil)-etil)-4-oxo-4,5,6,7-tetrahidro-ciclopentapirimidin-1-il)-*N*-(4'-trifluorometil-bifenil-4-ilmetil)acetamida bitartrato;

N-(1-etil-piperidin-4-il)-2-(2-(2-(2,3-difluorofenil)-etil)-4-oxo-4,5,6,7-tetrahidro-ciclopentapirimidin-1-il)-*N*-(4'-trifluorometil-bifenil-4-ilmetil)acetamida bitartrato;

40

N-(2-dietilaminoetil)-2-(2-(2-(4-fluoro-2-(trifluorometil)fenil)-etil)-4-oxo-4,5,6,7-tetrahidro-ciclopentapirimidin-1-il)-*N*-(4'-trifluorometil-bifenil-4-ilmetil)-acetamida bitartrato;

N-(2-dietilaminoetil)-2-(2-(2-(4-fluoro-3-(trifluorometil)fenil)-etil)-4-oxo-4,5,6,7-tetrahidro-ciclopentapirimidin-1-il)-*N*-(4'-trifluorometil-bifenil-4-ilmetil)-acetamida bitartrato;

45

N-(2-dietilaminoetil)-2-(2-(2-(3-cloro-4-fluorofenil)-etil)-4-oxo-4,5,6,7-tetrahidro-ciclopentapirimidin-1-il)-*N*-(4'-trifluorometil-bifenil-4-ilmetil)acetamida bitartrato;

50

(+/-)-*N*-(2-dietilaminoetil)-2-(2-fenil-propil)-4-oxo-4,5,6,7-tetrahidro-ciclopentapirimidin-1-il)-*N*-(4'-trifluorometil-bifenil-4-ilmetil) acetamida bitartrato;

N-(2-dietilaminoetil)-2-(2-(2-(2,4-difluorofenil)-etil)-4-oxo-4,5,6,7-tetrahidro-ciclopentapirimidin-1-il)-*N*-(4'-trifluorometil-bifenil-4-ilmetil) acetamida bitartrato;

55

N-(2-dietilaminoetil)-2-(2-(2-(2,5-difluorofenil)-etil)-4-oxo-4,5,6,7-tetrahidro-ciclopentapirimidin-1-il)-*N*-(4'-trifluorometil-bifenil-4-ilmetil)acetamida bitartrato;

N-(2-dietilaminoetil)-2-(2-(2-(3,4-difluorofenil)-etil)-4-oxo-4,5,6,7-tetrahidro-ciclopentapirimidin-1-il)-*N*-(4'-trifluorometil-bifenil-4-ilmetil)acetamida;

60

N-(2-dietilaminoetil)-2-(2-(2-(2-fluorofenil)-etil)-4-oxo-4,5,6,7-tetrahidro-ciclopentapirimidin-1-il)-*N*-(4'-trifluorometil-bifenil-4-ilmetil)acetamida;

N-(2-dietilaminoetil)-2-(2-(2-(3-fluorofenil)-etil)-4-oxo-4,5,6,7-tetrahidro-ciclopentapirimidin-1-il)-*N*-(4'-trifluorometil-bifenil-4-ilmetil)acetamida bitartrato;

5 *N*-(2-dietilaminoetil)-2-(2-(2-(4-clorofenil)-etil)-4-oxo-4,5,6,7-tetrahidro-ciclopentapirimidin-1-il)-*N*-(4'-trifluorometil-bifenil-4-ilmetil) acetamida;

N-(2-dietilaminoetil)-2-(2-(2-(4-clorofenil)-etil)-4-oxo-4,5,6,7-tetrahidro-ciclopentapirimidin-1-il)-*N*-(4'-trifluorometil-bifenil-4-ilmetil) acetamida;

10 *N*-(2-dietilaminoetil)-2-(2-(2-(4-metilfenil)-etil)-4-oxo-4,5,6,7-tetrahidro-ciclopentapirimidin-1-il)-*N*-(4'-trifluorometil-bifenil-4-ilmetil)acetamida;

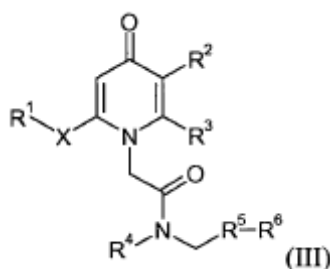
15 *N*-(2-dietilaminoetil)-2-(2-(2-(4-(trifluorometil)fenil)-etil)-4-oxo-4,5,6,7-tetrahidro-ciclopentapirimidin-1-il)-*N*-(4'-trifluorometil-bifenil-4-ilmetil)acetamida;

N-(2-dietilaminoetil)-2-(2-(2-(4-metoxifenil)-etil)-4-oxo-4,5,6,7-tetrahidro-ciclopentapirimidin-1-il)-*N*-(4'-trifluorometil-bifenil-4-ilmetil)acetamida bitartrato;

20 *N*-(2-dietilaminoetil)-2-(2-(2-(4-(trifluorometoxi)fenil)-etil)-4-oxo-4,5,6,7-tetrahidro-ciclopentapirimidin-1-il)-*N*-(4'-trifluorometil-bifenil-4-ilmetil)acetamida bitartrato;

o la base libre de cualquiera de las sales de bitartrato, u otra sal farmacéuticamente aceptable.

25 Además, son de interés los compuestos de fórmula (III), descritos en el documento WO 02/30904:



en la cual:

30 R^1 es un grupo arilo, opcionalmente sustituido con 1, 2, 3 o 4 sustituyentes, que pueden ser iguales o diferentes alquiltio seleccionados de alquilo $C_{(1-6)}$, alcoxi $C_{(1-6)}$, alquiltio $C_{(1-6)}$, hidroxil, halógeno, CN, mono a perfluoro-alquilo $C_{(1-4)}$, mono a perfluoro-alcoxi $C_{(1-4)}$ arilo, y arilalquilo $C_{(1-4)}$;

35 R^2 es halógeno, alquilo $C_{(1-3)}$, alcoxi $C_{(1-3)}$, hidroxialquilo $C_{(1-3)}$, alquiltio $C_{(1-3)}$, alquilo $C_{(1-3)}$ sulfinilo, aminoalquilo $C_{(1-3)}$, mono- o di-alquilo $C_{(1-3)}$ aminoalquilo $C_{(1-3)}$, alquilo $C_{(1-3)}$ carbonilaminoalquilo $C_{(1-3)}$, alcoxi $C_{(1-3)}$ alquilo $C_{(1-3)}$ carbonilaminoalquilo $C_{(1-3)}$, alquilo $C_{(1-3)}$ sulfonilaminoalquilo $C_{(1-3)}$, alquilo $C_{(1-3)}$ carboxi, alquilo $C_{(1-3)}$ carboxialquilo $C_{(1-3)}$, y

R^3 es hidrógeno, halógeno, alquilo $C_{(1-3)}$, o hidroxialquilo $C_{(1-3)}$; o

40 R^2 y R^3 junto con los átomos de carbono del anillo de piridona a los que están unidos forman un anillo carbocíclico fusionado de 5-6 miembros; o

45 R^2 y R^3 junto con los átomos de carbono del anillo de piridona a los que están unidos forman un anillo benzo o heteroarilo fusionado opcionalmente sustituido con 1, 2, 3 o 4 sustituyentes que pueden ser iguales o diferentes, seleccionados de halógeno, alquilo $C_{(1-4)}$, ciano, alcoxi $C_{(1-3)}$ alquilo $C_{(1-3)}$, alcoxi $C_{(1-4)}$ o alquiltio $C_{(1-4)}$, o mono a perfluoro-alquilo $C_{(1-4)}$;

50 R^4 es hidrógeno, alquilo $C_{(1-6)}$ que puede ser no sustituido o sustituido por 1, 2 o 3 sustituyentes seleccionados de hidroxil, halógeno, OR^7 , COR^7 , carboxi, $COOR^7$, $CONR^9R^{10}$, NR^9R^{10} , NR^7COR^8 , mono- o di-(hidroxialquilo $C_{(1-6)}$)amino y N -hidroxialquilo $C_{(1-6)}$ - N -alquilo $C_{(1-6)}$ amino; o

55 R^4 es Het-alquilo $C_{(0-4)}$ en el cual Het es un anillo heterocíclico de 5 a 7 miembros que comprende N y opcionalmente O o S, y en el cual N puede ser sustituido con COR^7 , $COOR^7$, $CONR^9R^{10}$, o alquilo $C_{(1-6)}$ opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 sustituyentes seleccionados de hidroxil, halógeno, OR^7 , COR^7 , carboxi, $COOR^7$, $CONR^9R^{10}$ o NR^9R^{10} , por ejemplo, piperidin-4-il, pirrolidin-3-ilo;

R⁵ es un anillo arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido con 1, 2, 3 o 4 sustituyentes que pueden ser iguales o diferentes, seleccionados de alquilo C₍₁₋₆₎, alcoxi C₍₁₋₆₎, alquiltio C₍₁₋₆₎, arilalcoxi C₍₁₋₆₎, hidroxilo, halógeno, CN, COR⁷, carboxi, COOR⁷, NR⁷COR⁸, CONR⁹R¹⁰, SO₂NR⁹R¹⁰, NR⁷SO₂R⁸, NR⁹R¹⁰, mono a perfluoro-alquilo C₍₁₋₄₎ y mono a perfluoro-alcoxi C₍₁₋₄₎;

R⁶ es un anillo arilo o heteroarilo que además es opcionalmente sustituido con 1, 2, 3 o 4 sustituyentes que pueden ser iguales o diferentes, seleccionados de alquilo C₍₁₋₆₎, alcoxi C₍₁₋₆₎, alquiltio C₍₁₋₆₎, alquilo C₍₁₋₆₎sulfonilo, arilalcoxi C₍₁₋₆₎, hidroxilo, halógeno, CN, COR⁷, carboxi, COOR⁷, CONR⁹R¹⁰, NR⁷COR⁸, SO₂NR⁹R¹⁰, NR⁷SO₂R⁸, NR⁹R¹⁰, mono a perfluoro-alquilo C₍₁₋₄₎ y mono a perfluoro-alcoxi C₍₁₋₄₎, o alquilo C₍₅₋₁₀₎;

R⁷ y R⁸ son independientemente hidrógeno o alquilo C₍₁₋₁₂₎, por ejemplo alquilo C₍₁₋₄₎ (por ejemplo, metilo o etilo);

R⁹ y R¹⁰, que pueden ser iguales o diferentes se seleccionan cada uno entre hidrógeno, o alquilo C₍₁₋₁₂₎, o R⁹ y R¹⁰ junto con el nitrógeno al cual están unidos forman un anillo de 5 a 7 miembros que contiene opcionalmente uno o más heteroátomos adicionales seleccionados de oxígeno, nitrógeno y azufre, y opcionalmente sustituidos por uno o dos sustituyentes seleccionados entre hidroxilo, oxo, alquilo C₍₁₋₄₎, alquilo C₍₁₋₄₎carboxi, arilo, por ejemplo, fenilo, o aralquilo, por ejemplo bencilo, por ejemplo morfolina o piperazina; y

X es un grupo alquileo C₍₂₋₄₎ (opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 sustituyentes seleccionados entre metilo y etilo), CH = CH, (CH₂)_nS o (CH₂)_nO donde n es 1, 2 o 3;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

De particular interés son aquellos compuestos de fórmula (III) en donde R² y R³ junto con los átomos de carbono del anillo de piridona a los que están unidos forman un anillo benzo o heteroarilo fusionado opcionalmente sustituido con 1, 2, 3 o 4 sustituyentes unidos que pueden ser iguales o diferentes, seleccionados de halógeno, alquilo C₍₁₋₄₎, ciano, alcoxi C₍₁₋₄₎ o alquiltio C₍₁₋₄₎, o mono a perfluoro-alquilo C₍₁₋₄₎. Preferiblemente, R¹ es fenilo opcionalmente sustituido con halógeno, alquilo C₍₁₋₆₎, trifluorometilo, alcoxi C₍₁₋₆₎, preferiblemente, de 1 a 3 fluoro, más preferiblemente, 2,3-difluoro. Los ejemplos representativos de R⁴ incluyen piperidin-4-ilo sustituido en la posición 1 con metilo, isopropilo, 1-(2-metoxietil), 1-(2-hidroxietil), t-butoxicarbonilo o etoxicarbonilmetilo; etilo sustituido en la posición 2 por aminoetilo; 1-etilpiperidinilmetilo; piperidin-4-ilo; 3-dietilaminopropilo; 4-pirrolidin-1-ilbutilo y 1-etilpirrolidin-3-ilo. Preferiblemente R⁴ es 1-(2-metoxietil)piperidin-4-ilo, 1-metilpiperidin-4-ilo o 1-etilpirrolidin-3-ilo. Los ejemplos representativos de R⁵ incluyen fenilo y piridilo. Preferiblemente, R⁵ es fenilo. Los ejemplos representativos de R⁶ incluyen fenilo opcionalmente sustituido con halógeno, o trifluorometilo, preferiblemente en la posición 4 y hexilo. Preferiblemente, R⁶ es fenilo sustituido con trifluorometilo en la posición 4. Otros ejemplos representativos de R⁶ incluyen fenilo sustituido por 1 o más alquilo C₍₁₋₃₎. Preferiblemente, R⁶ es fenilo sustituido con etilo en la posición 4. Preferiblemente, R⁵ y R⁶ forman juntos un sustituyente 4-(fenil)fenilo o un 2-(fenil)piridinilo en el cual, el anillo de fenilo alejado, puede estar opcionalmente sustituido con halógeno o trifluorometilo, preferiblemente en la posición 4. Preferiblemente X es alquileo C₍₂₋₄₎, más preferiblemente alquileo C₍₂₋₃₎, más preferiblemente, (CH₂)₂, o CH₂S.

Se apreciará que dentro del grupo de compuestos que comprenden la fórmula (III) hay un sub-grupo de compuestos en los cuales:

R¹ es fenilo sustituido con 2,3-difluoro;

R² y R³, junto con los átomos de carbono del anillo de piridona a los que están unidos, forman un anillo benzo o pirido fusionado;

R⁴ es 1-(2-metoxietil)piperidin-4-ilo;

R⁵ y R⁶ juntos forman un sustituyente 4-(fenil)fenilo, en el cual el anillo de fenilo remoto es sustituido con trifluorometilo, preferiblemente en la posición 4; y

X es CH₂S o (CH₂)₂.

Los siguientes compuestos de fórmula (III) son de interés:

N-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2,3-difluorobenciltio)-4-oxo-4*H*-quinolin-1-il]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil) acetamida bitartrato;

N-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4*H*-quinolin-1-il]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil) acetamida;

N-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4*H*-quinolin-1-il]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida bitartrato;

- N*-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2,3-difluorobenciltio)-4-oxo-5,6-trimetileno-pyridin-1-il]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil) acetamida bitartrato;
- 5 *N*-(1-(2-metoxietil)piperidin-4-il)-2-[2-(2,3-difluorobenciltio)-4-oxo-4*H*-quinolin-1-il]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil) acetamida;
- N*-(1-metilpiperidin-4-il)-2-[2-(2,3-difluorobenciltio)-4-oxo-4*H*-quinolin-1-il]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida bitartrato;
- 10 *N*-(1-metilpiperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4*H*-[1,8]naftiridin-1-il]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil) acetamida bitartrato;
N-(1-(2-metoxietil)piperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4*H*-[1,8]naftiridin-1-il]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;
- 15 *N*-(1-(2-metoxietil)piperidin-4-il)-2-[2-(2,3-difluorobenciltio)-4-oxo-4*H*-[1,8]naftiridin-1-il]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida bitartrato;
- N*-(1-etilpiperidin-4-il)-2-[2-(2,3-difluorobenciltio)-4-oxo-4*H*-quinolin-1-il]-*N*-(4'-etilbifenil-4-ilmetil) acetamida bitartrato;
- 20 *N*-(1-etilpiperidin-4-il)-2-[5-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-2-metil-7-oxo-7*H*-tiazol[4,5-*b*]piridin-4-il]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil) acetamida bitartrato;
- (±)*N*-(1-etilpirrolidin-3-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4*H*-quinolin-1-il]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil) acetamida bitartrato;
- 25 (±)*N*-(1-etilpirrolidin-3-il)-2-[2-(2,3-difluorobenciltio)-4-oxo-4*H*-quinolin-1-il]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida bitartrato;
- N*-(1-(2-metoxietil)piperidin-4-il)-2-[2-(2,3-difluorobenciltio)-4-oxo-4*H*-quinolin-1-il]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil) acetamida bitartrato;
- 30 *N*-(1-(2-metoxietil)piperidin-4-il)-2-[2-(2,3-difluorobenciltio)-4-oxo-4*H*-quinolin-1-il]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil) acetamida diclorhidrato;
- 35 *N*-(1-(2-metoxietil)piperidin-4-il)-2-[2-(2,3-difluorobenciltio)-4-oxo-4*H*-quinolin-1-il]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida mono paratoluenosulfonato;
- N*-(1-(2-metoxietil)piperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4*H*-[1,8]naftiridin-1-il]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida bitartrato;
- 40 *N*-(1-(2-metoxietil)piperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4*H*-[1,8]naftiridin-1-il]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida monoclorhidrato;
- 45 *N*-(1-(2-metoxietil)piperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4*H*-[1,8]naftiridin-1-il]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida diclorhidrato;
- N*-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(4-fluorobenciltio)-4-oxo-4*H*-quinotin-1-il]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida bitartrato;
- 50 *N*-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(4-fluorobenciltio)-4-oxo-5,6-trimetilenopiridin-1-il]-*N*-(4'-trifluorometil-bifenil-4-il metil) acetamida bitartrato;
- N*-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2,3-difluorobenciltio)-4-oxo-5,6-trimetileno-piridin-1-il]-*N*-(4'-trifluorometil-bifenil-4-ilmetil)acetamida bitartrato;
- 55 *N*-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(4-fluorofenil)etil)-4-oxo-4*H*-quinolin-1-il]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;
- N*-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2-(3,4-difluorofenil)etil)-4-oxo-4*H*-quinolin-1-il]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida bitartrato;
- 60 *N*-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2-(2-fluorofenil)etil)-4-oxo-4*H*-quinolin-1-il]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil) acetamida bitartrato;
- N*-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2-(3-clorofenil)etil)-4-oxo-4*H*-quinolin-1-il]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil) acetamida bitartrato;
- 65

- N*-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4*H*-[1,8]naftiridin-1-il)]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida bitartrato;
- 5 *N*-(1-etilpiperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4*H*-[1,8]naftiridin-1-il)]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;
- N*-(1-etilpiperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4*H*-quinolin-1-il)]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida bitartrato;
- 10 *N*-(2-pirrolidin-1-ilettil)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4*H*-quinolin-1-il)]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida bitartrato;
- N*-(1-isopropilpiperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4*H*-quinolin-1-il)]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida bitartrato;
- 15 *N*-(2-piperidin-1-ilettil)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4*H*-quinolin-1-il)]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida bitartrato;
- N*-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2-(2,3-difluorobenciltio)7-fluoro-4-oxo-4*H*-quinolin-1-il)]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida bitartrato; 4-
- 20 *N*-(2-dietilaminoetil)-5-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-2-metil-7-oxo-7*H*-tieno[3,2-*b*]piridin-4-il)]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida bitartrato;
- 25 *N*-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-5,6-dimetil-4-oxo-4*H*-piridin-1-il)]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida bitartrato;
- N*-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-5-etil-4-oxo-4*H*-piridin-1-il)]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida bitartrato;
- 30 *N*-(1-(2-metoxietil)piperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4*H*-quinolin-1-il)]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida bitartrato;
- N*-(1-metilpiperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4*H*-quinolin-1-il)]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida bitartrato;
- 35 *N*-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4*H*-tieno[3,4-*b*]piridin-1-il)]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida bitartrato;
- N*-(1-etilpiperidin-4-il)-2-[2-(2,3-difluorobenciltio)-4-oxo-4*H*-quinolin-1-il)]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida bitartrato;
- 40 *N*-(2-pirrolidin-1-ilettil)-2-[2-(2,3-difluorobenciltio)-4-oxo-4*H*-quinolin-1-il)]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida bitartrato;
- 45 *N*-(1-etilpiperidin-4-il)-2-[6-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-2-metil-4-oxo-4*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-7-il)]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida bitartrato;
- N*-(1-isopropilpiperidin-4-il)-2-[2-(2,3-difluorobenciltio)-4-oxo-4*H*-quinolin-1-il)]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida bitartrato;
- 50 *N*-(1-etilpiperidin-4-ilmetil)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4*H*-quinolin-1-il)]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida bitartrato;
- N*-(3-dietilaminopropil)-2-[2-(2,3-difluorobenciltio)-4-oxo-4*H*-quinolin-1-il)]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida bitartrato;
- 55 *N*-(4-pirrolidin-1-ilbutil)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4*H*-quinolin-1-il)]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida bitartrato;
- 60 *N*-(3-dietilaminopropil)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4*H*-quinolin-1-il)]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida bitartrato;
- N*-(4-pirrolidin-1-ilbutil)-2-[2-(2,3-difluorobenciltio)-4-oxo-4*H*-quinolin-1-il)]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida bitartrato;
- 65

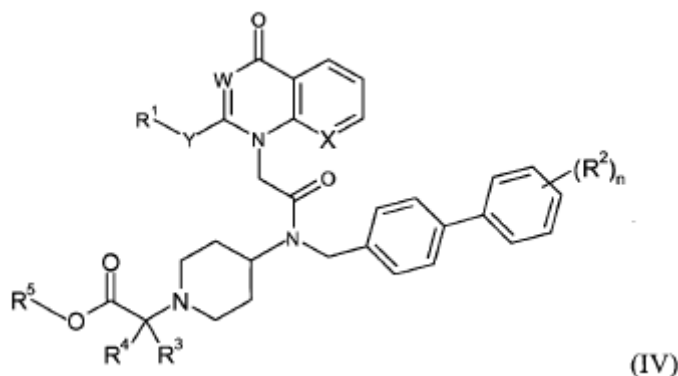
- N*-(1-etilpiperidin-4-il)-2-[5-(2,3-difluorobenciltio)-7-oxo-7*H*-tieno[3,2-*b*]piridin-4-il]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida bitartrato;
- 5 *N*-(2-dietilaminoetil)-2-[5-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-2-metil-7-oxo-7*H*-tiazol[4,5-*b*]piridin-4-il]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil) acetamida bitartrato;
- N*-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2,3-difluorobenciltio)-4-oxo-4*H*-quinolin-1-il]-*N*-(4'-etilbifenil-4-ilmetil) acetamida bitartrato;
- 10 *N*-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4*H*-quinolin-1-il]-*N*-(4'-etilbifenil-4-ilmetil) acetamida bitartrato;
- N*-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2,3-difluorobenciltio)-4-oxo-4*H*-quinolin-1-il]-*N*-(4'-isopropilbifenil-4-ilmetil) acetamida bitartrato;
- 15 *N*-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4*H*-quinolin-1-il]-*N*-(4'-isopropilbifenil-4-ilmetil) acetamida bitartrato;
- N*-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2,3-difluorobenciltio)-4-oxo-4*H*-[1,8]naftiridin-1-il]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida bitartrato;
- 20 *N*-(1-etilpiperidin-4-il)-2-[2-(2,3-difluorobenciltio)-4-oxo-4*H*-[1,8]naftiridin-1-il]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida bitartrato;
- N*-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4*H*-quinolin-1-il]-*N*-(4'-metilbifenil-4-ilmetil)acetamida bitartrato;
- 25 *N*-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2,3-difluorobenciltio)-4-oxo-4*H*-quinolin-1-il]-*N*-(4'-metilbifenil-4-ilmetil)acetamida bitartrato;
- N*-(1-etoxicarbonilmetilpiperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4*H*-quinolin-1-il]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil) acetamida bitartrato;
- 30 *N*-(1-isopropilpiperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4*H*-[1,8]naftiridin-1-il]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil) acetamida bitartrato;
- N*-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2,3-difluorobenciltio)-4-oxo-4*H*-quinolin-1-il]-*N*-(3',4'-dimetilbifenil-4-ilmetil)acetamida bitartrato;
- 35 *N*-(1-(*t*-butoxicarbonilo)piperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4*H*-[1,8]naftiridin-1-il]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil) acetamida bitartrato;
- N*-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2,3-difluorobenciltio)-4-oxo-4*H*-quinolin-1-il]-*N*-(3',4'-difluorobifenil-4-ilmetil) acetamida bitartrato;
- 40 *N*-(2-dietilaminoetil)-2-[6-(2,3-difluorobenciltio)-4-oxo-4*H*-tieno-[2,3-*b*]piridin-7-il]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida bitartrato;
- 45 *N*-(1-metilpiperidin-4-il)-2-[2-(2,3-difluorobenciltio)-4-oxo-4*H*-[1,8]naftiridin-1-il]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida bitartrato;
- N*-(1-etilpiperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3,4-trifluorofeniletil)-4-oxo-4*H*-quinolin-1-il]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida bitartrato;
- 50 *N*-(2-dietilaminoetil)-2-[6-(2,3-difluorobenciltio)-2-metil-4-oxo-2,4-dihidro-pirazolo[3,4-*b*]piridin-7-il]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil) acetamida bitartrato;
- N*-(1-etilpiperidin-4-il)-2-[6-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-2-etil-4-oxo-2,4-dihidropirazolo[3,4-*b*]piridin-7-il]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil) acetamida bitartrato;
- 55 *N*-(1-etilpiperidin-4-il)-2-[6-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-2-isopropil-4-oxo-2,4-dihidropirazolo[3,4-*b*]piridin-7-il]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil) acetamida bitartrato;
- N*-(1-etilpiperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4*H*-quinolin-1-il]-*N*-(4'-etilbifenil-4-ilmetil) acetamida bitartrato;
- 60 *N*-(1-isopropilpiperidin-4-il)-2-[5-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-2-metil-7-oxo-7*H*-tiazol[4,5-*b*]piridin-4-il]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil) acetamida bitartrato;
- 65 *N*-(1-(2-metoxietil)piperidin-4-il)-2-[5-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-2-metil-7-oxo-7*H*-tiazol[4,5-*b*]piridin-4-il]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil) acetamida bitartrato;

- N*-(1-etilpiperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-5,6-trimetileno-piridin-1-il]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil) acetamida bitartrato;
- 5 *N*-(1-metilpiperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-5,6-trimetilenopiridin-1-il]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil) acetamida bitartrato;
- N*-(1-(2-metoxietil)piperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-5,6-trimetilenopiridin-1-il]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil) acetamida bitartrato;
- 10 *N*-(1-isopropilpiperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-5,6-trimetilenopiridin-1-il]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil) acetamida bitartrato;
- N*-(1-etilpiperidin-4-il)-2-[5-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-2-metil-7-oxo-2,7-dihidropirazolo[4,3-b]piridin-4-il]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil) acetamida bitartrato;
- 15 *N*-(1-etilpiperidin-4-il)-2-[5-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-1-metil-7-oxo-1,7-dihidropirazolo[4,3-b]piridin-4-il]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil) acetamida bitartrato;
- N*-(1-etilpiperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-5,6-trimetileno-piridin-1-il]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil) acetamida bitartrato;
- 20 *N*-(1-etilpiperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-7-metil-4-oxo-4*H*-[1,8]naftiridin-1-il]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil) acetamida bitartrato;
- N*-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-7-metil-4-oxo-4*H*-[1,8]naftiridin-1-il]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil) acetamida bitartrato;
- 25 *N*-(1-metilpiperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-7-metil-4-oxo-4*H*-[1,8]naftiridin-1-il]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil) acetamida bitartrato;
- N*-(1-isopropilpiperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-7-metil-4-oxo-4*H*-[1,8]naftiridin-1-il]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil) acetamida bitartrato;
- 30 *N*-(1-(2-metoxietil)piperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-7-metil-4-oxo-4*H*-[1,8]naftiridin-1-il]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil) acetamida bitartrato;
- 35 *N*-(1-metilpiperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorobenciltio)-4-oxo-5,6-trimetileno-piridin-1-il]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil) acetamida bitartrato;
- N*-(1-etilpiperidin-4-il)-2-[2-(2,3-difluorobenciltio)-4-oxo-5,6-trimetileno-piridin-1-il]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil) acetamida bitartrato;
- 40 *N*-(1-isopropilpiperidin-4-il)-2-[2-(2,3-difluorobenciltio)-4-oxo-5,6-trimetileno-piridin-1-il]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil) acetamida bitartrato;
- 45 *N*-(1-(2-metoxietil)piperidin-4-il)-2-[2-(2,3-difluorobenciltio)-4-oxo-5,6-trimetilenopiridin-1-il]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil) acetamida bitartrato;
- N*-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-5,6-tetrametilenopiridin-1-il]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil) acetamida bitartrato;
- 50 *N*-(1-metilpiperidin-4-il)-2-[2-(2,3-difluorobenciltio)-4-oxo-4*H*-quinolin-1-il]-*N*-(4'-clorobifenil-4-ilmetil) acetamida bitartrato;
- N*-(1-metilpiperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4*H*-quinolin-1-il]-*N*-(4'-clorobifenil-4-ilmetil) acetamida bitartrato;
- 55 *N*-(1-etilpiperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4*H*-quinolin-1-il]-*N*-(4'-clorobifenil-4-ilmetil) acetamida bitartrato;
- N*-(1-(2-metoxietil)piperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4*H*-quinolin-1-il]-*N*-(4'-clorobifenil-4-ilmetil) acetamida bitartrato;
- 60 *N*-(1-isopropilpiperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4*H*-quinolin-1-il]-*N*-(4'-clorobifenil-4-ilmetil) acetamida bitartrato;

- N*-(2-dietilaminoetil)-2-[6-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-2-metil-4-oxo-4*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-7-il]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil) acetamida bitartrato;
- 5 *N*-(1-(*t*-butoxicarbonilo)piperidin-4-il)-2-[2-(2,3-difluorobenciltio)-4-oxo-4*H*-[1,8]naftiridin-1-il]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil) acetamida;
- N*-(1-etilpiperidin-4-il)-2-[6-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-2-(2-metoxietil)-4-oxo-4*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-7-il]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida bitartrato;
- 10 *N*-(2-dietilaminoetil)-2-[4-oxo-2-(2-(2,3,4-trifluorofenil)etil)-4*H*-quinolin-1-il]-*N*-(4'-trifluorometil-bifenil-4-ilmetil)acetamida bitartrato;
- N*-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2-(2,4-difluorofenil)etil)-4-oxo-4*H*-quinolin-1-il]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida bitartrato;
- 15 *N*-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2-(3-fluorofenil)etil)-4-oxo-4*H*-quinolin-1-il]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil) acetamida bitartrato;
- N*-(piperidin-4-il)-2-[2-(2,3-difluorobenciltio)-4-oxo-4*H*-quinolin-1-il]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil) acetamida bitartrato;
- 20 *N*-(piperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4*H*-quinolin-1-il]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil) acetamida bitartrato;
- N*-(piperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-5,6-trimetilenopiridin-1-il]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida bitartrato;
- 25 *N*-(piperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4*H*-[1,8]naftiridin-1-il]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida bitartrato;
- N*-(piperidin-4-il)-2-[2-(2,3-difluorobenciltio)-4-oxo-4*H*-[1,8]naftiridin-1-il]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida trifluoroacetato;
- 30 *N*-(2-etilaminoetil)-2-[2-(2,3-difluorobenciltio)-4-oxo-4*H*-quinolin-1-il]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil) acetamida;
- 35 *N*-(2-etilaminoetil)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4*H*-quinolin-1-il]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil) acetamida;
- N*-(1-(2-hidroxietil)piperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4*H*-quinolin-1-il]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida bitartrato; o la base libre de la misma, u otra sal farmacéuticamente aceptable.

40 **Fórmula (IV)**

También son de interés los compuestos de fórmula (IV)



en donde:

- 45 R^1 es un grupo arilo, no sustituido o sustituido por 1, 2, 3 o 4 sustituyentes que pueden ser iguales o diferentes, seleccionados de entre el grupo que consiste en alquilo C_1-C_6 , alcoxi C_1-C_6 , alquiltio C_1-C_6 , aril alcoxi C_1-C_6 , hidroxilo, halo, CN, COR^6 , $COOR^6$, NR^6COR^7 , $CONR^8R^9$, $SO_2NR^8R^9$, $NR^6SO_2R^7$, NR^8R^9 , halo alquilo C_1-C_4 , y halo alcoxi C_1-C_4 ;
- 50 W es CH y X es N, o W es N y X es CH, W y X son ambos CH, o W y X son N;
- Y es alquilo C_2-C_4 ,

R^2 es hidrógeno, , alquilo C_1-C_6 , alcoxi C_1-C_6 , alquiltio C_1-C_6 , aril alcoxi C_1-C_6 , hidroxilo, halo, CN, COR^6 , carboxi, $COOR^6$, NR^6COR^7 , $CONR^8R^9$, $SO_2NR^8R^9$, $NR^6SO_2R^7$, NR^8R^9 , mono a perfluoro- alquilo C_1-C_6 , o mono a perfluoro-alcoxi C_1-C_6 ;

n es 0-5;

5

R^3 es alquilo C_1-C_4 ;

R^4 es alquilo C_1-C_4 ;

10

R^5 es hidrógeno, alquilo C_1-C_{10} , alqueno C_2-C_{10} , alqueno C_2-C_{10} , alqueno C_2-C_{10} , halo alquilo C_1-C_4 , cicloalquilo C_3-C_8 , cicloalquilo C_3-C_8 , cicloalquilo C_3-C_8 alquilo C_1-C_4 , cicloalqueno C_5-C_5 , cicloalqueno C_5-C_8 alquilo C_1-C_4 , heterocicloalquilo de 3 a 8 miembros, heterocicloalquilo alquilo C_1-C_4 de 3 a 8 miembros, arilo C_6-C_{14} , arilo C_6-C_{14} alquilo C_1-C_{10} , heteroarilo, o heteroarilo alquilo C_1-C_{10} ; en donde cada grupo es opcionalmente una o más veces por el mismo y/o un grupo diferente que es alcoxi C_1-C_6 , alquiltio C_1-C_6 , aril alcoxi C_1-C_6 , hidroxilo, halo, CN, NR^8R^9 , o halo alcoxi C_1-C_4

15

R^6 y R^7 son independientemente hidrógeno o alquilo C_1-C_{10} ;

R^8 y R^9 son iguales o diferentes y son hidrógeno o alquilo C_1-C_{10} , o R^9 y R^{10} junto con el nitrógeno al cual están unidos forman un anillo de 5 a 7 miembros que contiene opcionalmente uno o más heteroátomos adicionales seleccionados de oxígeno, nitrógeno y azufre, y opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados del grupo que consiste de hidroxilo, oxo, alquilo C_1-C_4 , alquilcarboxi C_1-C_4 , arilo, y aril alquilo C_1-C_4 ;

20

o una sal de este farmacéuticamente aceptable.

25

Sin pretender excluir ninguno de los sustituyentes definidos y/o sus radicales citados del alcance de la fórmula (IV), los siguientes grupos R y los radicales asociados son de particular interés:

En cuanto a R^1 , puede ser un grupo fenilo opcionalmente sustituido con 1, 2, 3 o 4 sustituyentes que pueden ser iguales o diferentes, seleccionados entre halo, alquilo C_1-C_6 , trifluorometilo o alcoxi C_1-C_6 . Más específicamente, el fenilo no es sustituido o es sustituido con 1, 2, 3 o 4 sustituyentes de halógeno, en particular, de 1 a 3 grupos fluoro, y más particularmente, 2,3-difluoro, 2,4-difluoro o 4-fluoro.

30

Un ejemplo adicional de fórmula (I) es donde Y es $-CH_2CH_2-$.

35

También se describe un compuesto de fórmula (I) en la cual R^2 es hidrógeno, por defecto, o es halo, alquilo C_1-C_6 , mono a perfluoro alquilo C_1-C_4 , mono a perfluoro alcoxi C_1-C_6 , o alcoxi C_1-C_6 ; particularmente mono a perfluoro alquilo C_1-C_4 , mono a perfluoro alcoxi C_1-C_4 o alcoxi C_1-C_6 . De particular interés son los compuestos en los que R^2 es distinto de hidrógeno, n en $(R^2)_n$ es 1, 2, o 3, y el patrón de sustitución es meta y/o para, en particular para, i.e. un sustituyente en la posición 4. Los compuestos ilustrados incluyen aquellos en los que R^2 es 4-trifluorometilo o 4-trifluorometoxi.

40

R^3 y R^4 pueden ser iguales o diferentes y son metilo, etilo, *n*-propilo o *n*-butilo. De particular interés son los compuestos de fórmula (I) donde R^3 y R^4 son iguales y son metilo, o etilo; de particular interés es el metilo.

45

R^5 puede ser hidrógeno, alquilo $C_{(1-6)}$ que es una cadena lineal o ramificada. De particular interés son el metilo, etilo, propilo, isopropilo, *n*-butilo, *sec*-butilo, *iso*-butilo, *t*-butilo, *n*-pentilo o *n*-hexilo.

Cualquiera de los compuestos descritos anteriormente en este documento se puede preparar en forma cristalina o no cristalina, y, si es cristalina, pueden ser solvatados, por ejemplo, como el hidrato. Se incluyen los solvatos estequiométricos (por ejemplo hidratos).

50

Algunos de los compuestos descritos en este documento pueden contener uno o más átomos quirales, o de otra manera pueden ser capaces de existir como dos enantiómeros. Los compuestos útiles en los métodos según se describe en el presente documento incluyen mezclas de enantiómeros así como enantiómeros purificados o mezclas enriquecidas enantioméricamente. También se incluyen los isómeros individuales de los compuestos representados por las fórmulas (I) - (IV), así como cualquier mezcla total o parcialmente equilibrada de los mismos. También se incluyen los isómeros individuales de los compuestos como mezclas con isómeros de los mismos en los que están invertidos uno o más centros quirales. Además, se entiende que cualquiera de los tautómeros y mezclas de tautómeros de los compuestos se incluyen dentro del alcance de los compuestos de fórmulas (I) - (IV). Las diferentes formas isómeras se pueden separar o resolver una de la otra por métodos convencionales, o cualquier isómero dado puede obtenerse por métodos sintéticos convencionales o por síntesis estereoespecífica o asimétrica.

60

Síntesis de los compuestos de fórmula (I), (II), (III) y (IV)

65

Los métodos para preparar los compuestos de fórmula (I), (II) y (III) han sido publicados en la literatura de patentes. Por ejemplo, los métodos para preparar la fórmula (I) se pueden encontrar en el documento WO 01/60805 y WO03/016287.

Los métodos para preparar los compuestos de fórmula (II) se han establecido en el documento WO 02/30911. Y los métodos para preparar los compuestos de fórmula (III) se pueden encontrar en el documento WO 02/30904. Este documento provee los métodos para preparar compuestos de fórmula (IV), los métodos copiados de las solicitudes provisionales de Estados Unidos 60/829,328 y 60/829,327.

5

Algunos ejemplos de síntesis se proveen a continuación. Para diferenciar entre los varios grupos genéricos de compuestos en los ejemplos de este documento, los materiales relacionados con la fórmula (I) serán etiquetados como "Ejemplo de Metodología de Síntesis (I) -1" et seq., para la fórmula (II) "Ejemplo de Metodología de Síntesis (II) -1" et seq., para la fórmula (III), "Ejemplo de Metodología de Síntesis (III) -1 et seq., y para la fórmula (I), "Ejemplo de Metodología de Síntesis (IV) -1, et seq.

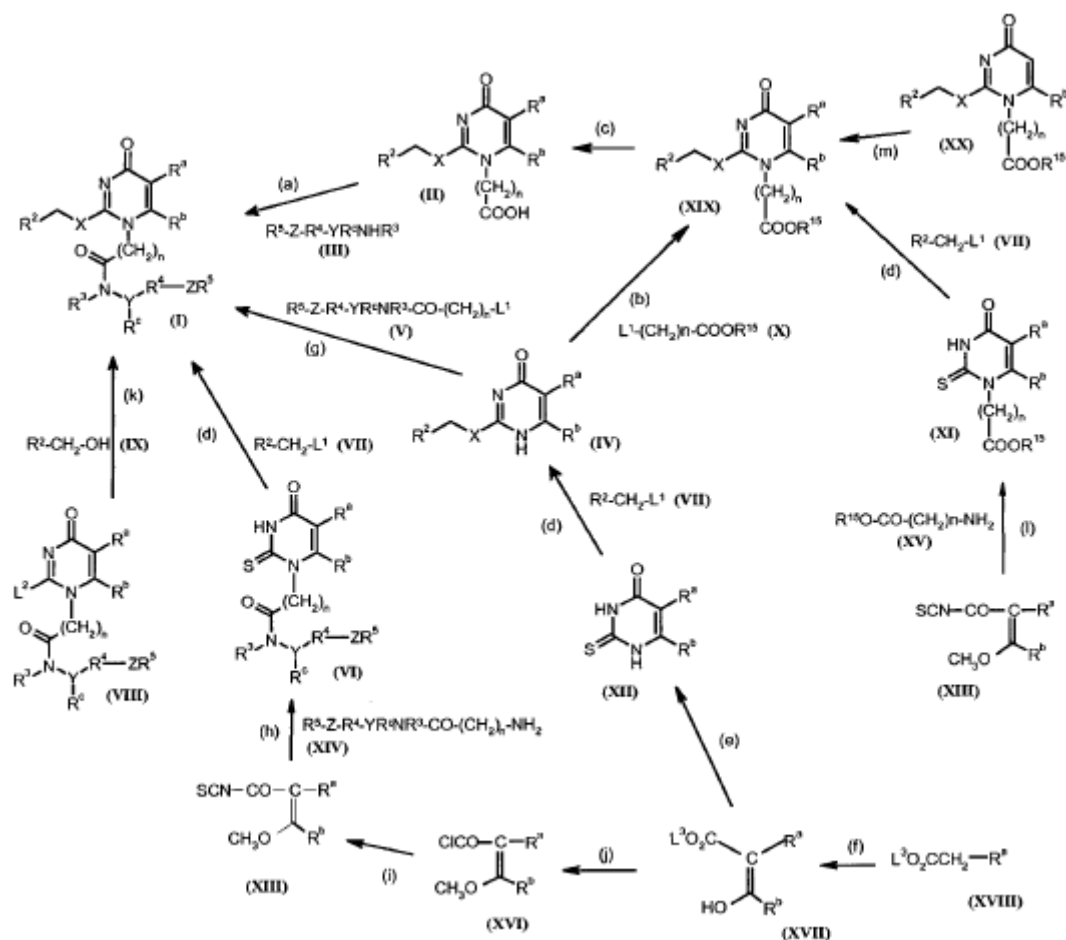
10

Síntesis de Fórmula (I)

Los compuestos de fórmula (I) se pueden preparar mediante el esquema del proceso I, como se revela en el documento WO 01/60805:

15

Esquema 1



20

en el cual:

L³ es un grupo alquilo C₍₁₋₆₎, por ejemplo metilo;

R¹⁵ es un grupo alquilo C₍₁₋₆₎, por ejemplo etilo o *t*-butilo y

25

L¹, L², R^a, R^b, R^c, R², R³, R⁴, R⁵, n, X, Y y Z son como se definen en WO 01/60805.

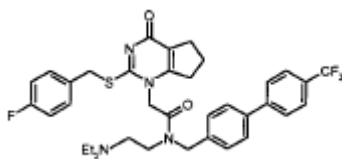
Un ejemplo de reacción para preparar un compuesto de fórmula (I) de interés es el siguiente:

30

Ejemplo de Metodología de Síntesis (I)-1(a)

1-(N-(2-(Dietilamino)etil)-N-(4-(4-trifluorometilfenil)encil)aminocarbonilmetil)-2-(4-fluorobencil) trimetilenopirimidin-4-ona

tio-5,6-



5 El intermedio B69 del documento WO 01/60805 (87.1g, 0.26 mol.) se suspendió en diclorometano (2.9 litros), se
 10 adicionaron 1-hidroxi benzotriazol hidrato (35.2 g, 0.26 mol.) y 1-(3-dimetilaminopropil) -3-etilcarbodiimida clorhidrato
 (99.7g, 0.52 mol.) y la suspensión se agitó durante 45 minutos, momento en el cual se había obtenido la solución
 completa. El intermedio A30 de WO 01/60805 (91.2g, 0.26 mol.), se adicionó como una solución en diclorometano (100
 ml), durante 5 minutos y la solución se agitó durante 4 horas. Se adicionó la mezcla de una solución saturada de cloruro
 15 de amonio:agua (1:1, 1 litro) y la solución se agitó durante 10 minutos. La fase orgánica se separó y se extrajo con
 mezcla cloruro de amonio saturado:agua (1:1, 1 litro), el pH de los extractos fue 6. La fase orgánica se separó y se
 extrajo con agua (1 litro) que contenía ácido acético (10 ml), el pH del extracto fue 5. La capa de diclorometano se
 separó y se extrajo con una mezcla de solución saturada de carbonato de sodio: agua: salmuera saturada (1:3:0.2, 1
 litro), pH 10.5, a continuación, con mezcla de salmuera saturada:agua (1:1, 1 litro). La solución de color marrón se secó
 20 sobre sulfato de sodio anhidro en presencia de carbón decolorante (35 g), se filtró y el solvente se eliminó *in vacuo* para
 dar una espuma de color marrón oscuro. La espuma se disolvió en acetato de *iso*-propilo (100 ml) y el solvente se
 eliminó *in vacuo*. El residuo gomoso de color marrón oscuro se disolvió en acetato de isopropilo en ebullición (500 ml),
 se enfrió a temperatura ambiente, se sembró y se agitó durante la noche. El sólido de color amarillento producido se
 separó por filtración y se lavó con acetato de *iso*-propilo (100 ml). El sólido se secó por succión en el sinterizador,
 durante 1 hora después se recristalizó a partir de acetato de isopropilo (400 ml). Después de agitar durante la noche el
 sólido formado se separó por filtración, se lavó con acetato de *iso*-propilo (80 ml) y se secó *in vacuo* para dar el
 compuesto base, 110 g, rendimiento 63.5%. RMN ¹H (CDCl₃, ca 1:9: 1 mezcla de rotámeros) δ 0.99 (6H, t), 2,10 (2H,
 m), 2,50 (4H, q), 2,58 / 2,62 (2H, 2 xt), 2,70 / 2,82 (2H, 2 xt), 2,86 (2H, t), 3,28 / 3,58 (2H, 2 xt), 4,45 / 4,52 (2H, 2 xs),
 4,68 / 4,70 (2H, 2 xs), 4,93 (2H, s), 6,95 (2H, m), 7,31 (2H, d), 7,31 / 7,37 (2H, 2 xm), 7,48 / 7,52 (2H, d), 7,65 (2H, m),
 7,72 (2H, m); MS (APCI) (M + H)⁺ 667; pf 125 ° C (por DSC - endotermo asimétrica).

25 *Ejemplo de Metodología de Síntesis (I)-1(b)*

1-(N-(2-(Dietilamino)etil)-N-(4-(4-trifluorometilfenil)bencil)aminocarbonilmetil)-2-(4-fluorobencil)tio-5,6-
 trimetilenopirimidin-4-ona bitartrato

30 Preparado a partir de los intermedios A30 y B69 en el documento WO 01/60805 por el método del Ejemplo 1 en el
 documento WO 01/60805 RMN ¹H (d₆-DMSO, ca 1:1 mezcla de rotámeros) δ 0.92/0.99 (6H,2x t), 1.99 (2H,m), 2.54
 (6H,m), 2.68/2.74 (4H,m), 3.36 (2H,m), 4.21 (2H,s), 4.37/4.44 (2H,2x s), 4.63/4.74 (2H,2x s), 4.89/5.13 (2H,2x s),
 7.08/7.14 (2H,2x m), 7.36-7.50 (4H, m), 7.64/7.70 (2H,2x d), 7.83 (4H,m); MS (APCI+) encontrado (M+1) = 667;
 C₃₆H₃₈F₄N₄O₂S requiere 666.

35 *Ejemplo de Metodología de Síntesis (I)-1(c)*

1-(N-(2-(Dietilamino)etil)-N-(4-(4-trifluorometilfenil)bencil)aminocarbonilmetil)-2-(4-fluorobencil)tio-5,6-trimetilenopirimidin-
 4-ona clorhidrato.

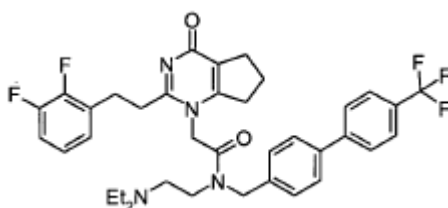
40 La base libre del Ejemplo (I) -1 (a) (3.00 g, 0.0045 mol) se suspendió con agitación en isopropanol (30 ml) y se calentó a
 45 °C, para dar una solución clara. Después, la solución se enfrió a temperatura ambiente y se adicionó ácido
 clorhídrico concentrado (0.40 ml, 0.045 mol). A continuación, la suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente
 durante 35 minutos, antes de enfriarse a 0 °C, durante 35 minutos. A continuación, la suspensión se filtró y se lavó con
 45 isopropanol (10 ml), seguido por heptano (30 ml), antes de ser secado *in vacuo* para dar el compuesto base como un
 sólido de color blanco (3.00 g, 95%). RMN ¹H (CDCl₃) δ 1.38 (6H, t), 2.08 (2H, m), 2.82 (2H, t), 2.99 (2H, t), 3.19 (4H, m),
 3.35 (2H, m), 3.97 (2H, s), 4.42 (2H, s), 4.81 (2H, s), 4.99 (2H, s), 6.87 (2H, t), 7.26 (2H, t), 7.33 (2H, d), 7.41 (2H, d),
 7.53 (2H, d), 7.71 (2H, d), 11.91 (1H, s).

50 Síntesis de Fórmula (II)

Una descripción de cómo hacer los compuestos de fórmula (II) y los ejemplos de productos intermedios y finales para
 los compuestos mencionados anteriormente se pueden encontrar en la solicitud internacional publicada WO 02/30911.
 Un método de etapa final para la fabricación de un compuesto útil en los métodos descritos es el Ejemplo (II) -1.

55 *Ejemplo de Metodología de Síntesis (II)-1*

N-(2-Dietilaminoetil)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4,5,6,7-tetrahidrociclopentapirimidin-1-il]-N-(4'- trifluorometil -
 bifenil-4-ilmetil)acetamida bitartrato



5 Una solución de *N,N*-dietil-*N*-(4'-trifluorometil-bifenil-4-ilmetil)-etano-1,2-diamina (Int D4 en el documento WO 02/30911) (0.50 g, 1.44 mmol) , 1- (3-dimetilaminopropil) -3-etilcarbodiimida (0.56 g, 1.45 mmol), hidrato de 1-hidroxibenzotriazol (0.12 g) y ácido 2-(2-[2-(2,3-difluorofenil)-etil]-4-oxo-4,5,6,7-tetrahidro-ciclopentapirimidin-1-il)-acético (Int C1 en el documento WO 02/30911) (0.48 g, 1.44 mmol) en diclorometano (10 ml) se agitó a temperatura ambiente durante la noche, luego se diluyó con diclorometano (30 ml), se lavó con bicarbonato de sodio acuoso y se evaporó. El residuo se purificó por cromatografía (cartucho de sílica de 10 g, acetato de etilo-acetona) para dar el compuesto base como una espuma de color amarillo (base libre) (0.50 g, 52%). RMN-¹H (DMSO, mezcla de rotámeros) δ 0.83-0.89 (6H, m), 1.98 (2H, m), 2.40 (4H, m), 2.45-2.82 (10H, m), 3.02 (2H, m), 4.64/4.75 (2H,2x s), 4.96/5.19 (2H,2x s), 7.11-7.40 (5H, m), 7.65 (2H, m), 7.84 (4H, m); MS (APCI+) encontrado (M+1) = 667;

10 $C_{37}H_{39}F_5N_4O_2$ requiere 666.

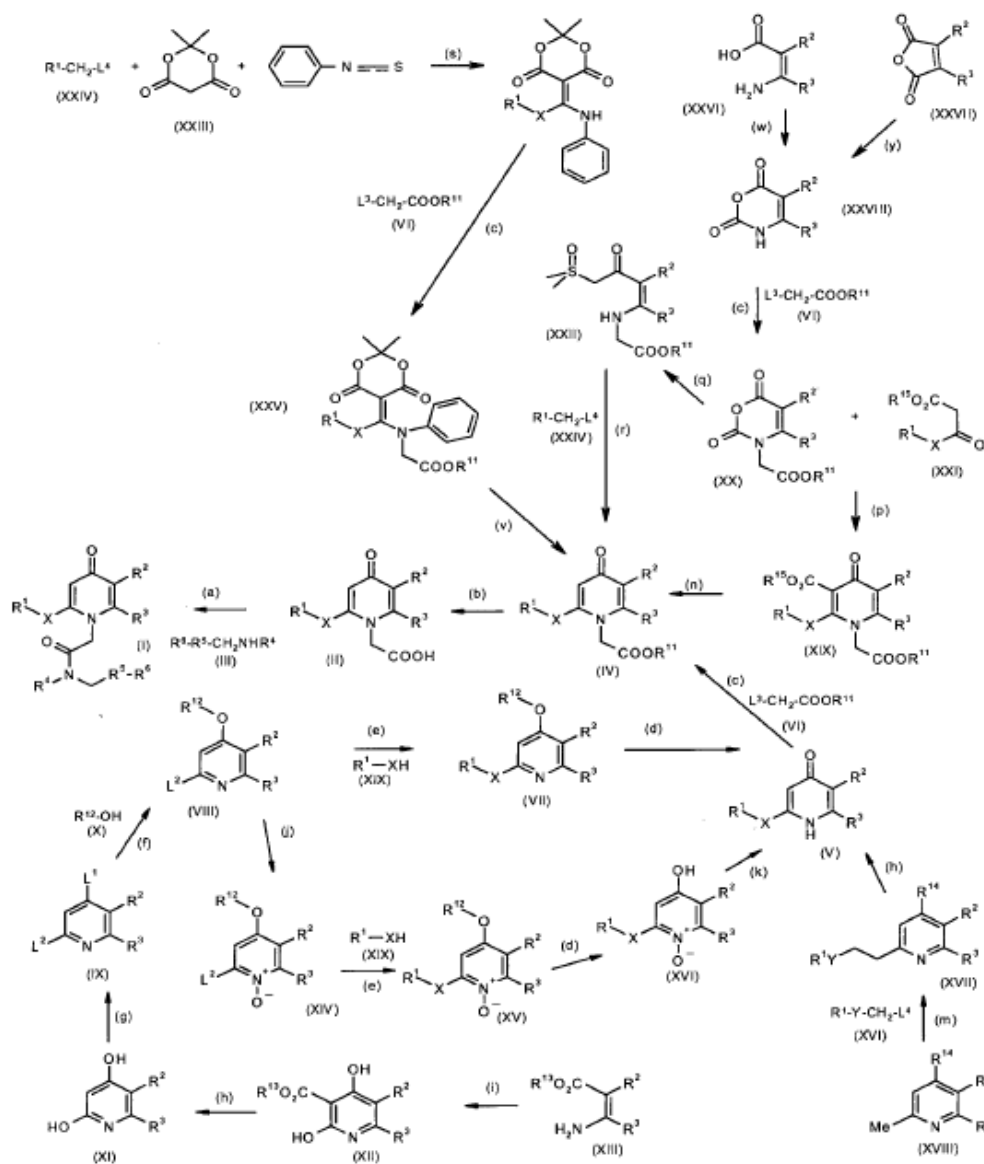
15 Se adicionó ácido *d*-tartárico (0.09 g, 0.60 mmol) a una solución de la base libre (0.40 g, 0.60 mmol) en metanol (10 ml) con agitación. La solución resultante se evaporó para producir la sal (0.49 g). RMN-¹H (DMSO, mezcla de rotámeros) δ 0.85-0.97 (6H, m), 1.91-2.00 (2H, m), 2.40-2.49 (4H, m), 2.54-2.82 (10H, m), 3.02-3.46 (2H, m), 4.20 (2H, s), 4.64/4.75 (2H, 2x s), 4.97/5.18 (2H, 2x s), 7.11-7.40 (5H, m), 7.65 (2H, m), 7.84 (4H, m); MS (APCI+) encontrado (M+1) = 667; $C_{37}H_{39}F_5N_4O_2$ requiere 666.

20 A continuación este proceso, o como alternativa otros procesos descritos en el documento WO 02/30911, se pueden preparar los otros compuestos mencionados anteriormente que tienen la estructura de fórmula (II).

Síntesis de Fórmula (III)

25 La síntesis general de compuestos de fórmula (III) se ilustra en el siguiente esquema III, como se presenta en WO02/30904:

Esquema III



5 En referencia a este esquema, el éster (IV) se prepara habitualmente por alquilación N-1 de (V) usando (VI), en el cual R^{11} como se define anteriormente por ejemplo, (VI) es bromoacetato de t-butilo o bromoacetato de etilo, en presencia de una base, por ejemplo BuLi en THF o hidruro de sodio en N-metilpirrolidina (NMP) (etapa c).

10 Cuando X es CH_2S , el intermedio clave (IV) se puede sintetizar mediante la reacción de (XX) con metiluro de dimetiloxosulfonio, generado a través del tratamiento de yoduro de trimetilsulfoxonio con hidruro de sodio a baja temperatura, para producir un iluro de azufre (XXII) (etapa q). El tratamiento posterior de (XXII) con disulfuro de carbono en la presencia de diisopropilamina, seguido por $R^1CH_2-L^4$, donde L^4 es un grupo saliente, produce el intermedio (IV) (etapa r).

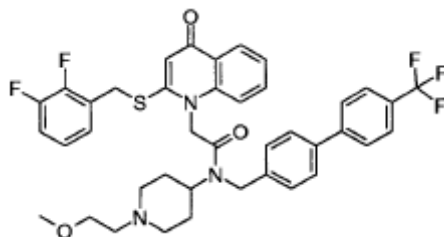
15 Alternativamente, cuando X es CH_2S , el sustituyente R^1X se puede introducir por el desplazamiento de un grupo saliente L^2 (por ejemplo, Cl) (etapa e), ya sea en una piridina (VIII) o piridina N-óxido (XIV), para producir las piridinas 2 sustituidas (VII) y (XV). La transformación de (VII) o (XV) a la 4-piridona (V) se lleva a cabo, mediante la desprotección del 4-oxígeno (por ejemplo, utilizando $(Ph_3P)_3RhCl$ cuando en etanol acuoso, cuando $R^{12} =$ alilo) (etapa d), seguido, por (XVI), mediante la eliminación del sustituyente N-óxido, utilizando hidrógeno en presencia de Pd/C en ácido acético (etapa k). La piridina (VIII) o piridina N-óxido (XIV) se puede preparar mediante las etapas (i), (h), (g), (f), y (j), en las cuales:

(j) tratamiento de (VIII) con ácido m-cloroperbenzoico en diclorometano;

- (f) tratamiento de (IX) con $R^{12}OH$ (X), en el cual R^{12} es alilo, e hidruro de sodio en DMF;
- (g) tratamiento de (XI) con oxiclورو de fósforo;
- 5 (h) tratamiento de (XII) con HCl acuoso con calentamiento;
- (i) tratamiento de (XIII) con malonato de di-alquilo inferior y un alcóxido de sodio en alcohol (en el cual R^{13} es alquilo $C_{(1-6)}$, por lo general $R^{13} = Et$); y
- 10 R^1-CH_2SH (XIX) por lo general se prepara a partir del tioacetato, que se forma a partir del correspondiente bromuro de alquilo R^1-CH_2Br .
- Alternativamente, cuando X es CH_2S y R^2 y R^3 , junto con los átomos de carbono del anillo de piridona a los que están unidos, forman un anillo benzo fusionado, intermedio (IV) se puede sintetizar a partir de materiales iniciales conocidos por las etapas (s), (c) y (v) en las que:
- 15 (s) tratamiento de ácido de Meldrum (XXIII) con hidruro de sodio a baja temperatura, seguido de la reacción con isotiocianato de fenilo y el tratamiento posterior con $R^1CH_2-L^4$;
- 20 (c) como se ha discutido anteriormente;
- (v) tratamiento de (XXV) con ácido trifluoroacético.
- Cuando X es alquileo, se prefiere utilizar las etapas (m) y (h) (intermedios (XVII), (XVIII)) o las etapas (n) y (p) (intermedios (XIX), (XX), (XXI)) en las que:
- 25 (h) transformación de una piridina 4-sustituída en una 4-piridona por ejemplo, mediante el tratamiento de (XVII) $R^{14} = Cl$ con HCl acuoso y dioxano, o la desprotección de $R^{14} = OR^{12}$, por ejemplo, usando las condiciones de la etapa (d).
- 30 (m) extensión de la cadena de una 2-alquilo piridina, por ejemplo, donde $X = YCH_2CH_2$ mediante el tratamiento de una 2-metilpiridina (XVIII) con $R^1-Y-CH_2-L^4$ (XVI) en la que L^4 es un grupo saliente y una base fuerte, tal como BuLi, en THF.
- En la ruta alternativa, el grupo 3-éster se retira a partir del intermedio (XIX) R^{15} -alquilo $C_{(1-6)}$, por calentamiento en éter de difenilo donde $R^{15} = tBu$ (etapa n); El intermedio (XIX) se forma a partir de la 2,6-dioxo-1,3-oxazina (XX) y el éster (XXI) por el tratamiento con una base tal como NaH en DMF o 1,8-diazabicyclo [5.4.0] undec-7-eno en diclorometano.
- 35 Síntesis de (XX) a partir de materiales iniciales conocidos se puede lograr a través de las etapas (w) y (c) o las etapas (y) y (c) en las que:
- 40 (w) tratamiento de (XXVII) con azidotrimetilsilano en THF;
- (y) tratamiento de (XXVI) con fosgeno;
- 45 (c) como se ha descrito anteriormente.
- Véase el documento WO02/30904 para obtener más información y explicaciones de cómo hacer los compuestos de fórmula (III).

50 *Ejemplo de Metodología de Síntesis (III) -1*

N-(1-(2-Metoxietil)piperidin-4-il)-2-[2-(2,3-difluorobencilio)-4-oxo-4*H*-quinolin-1-il]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida



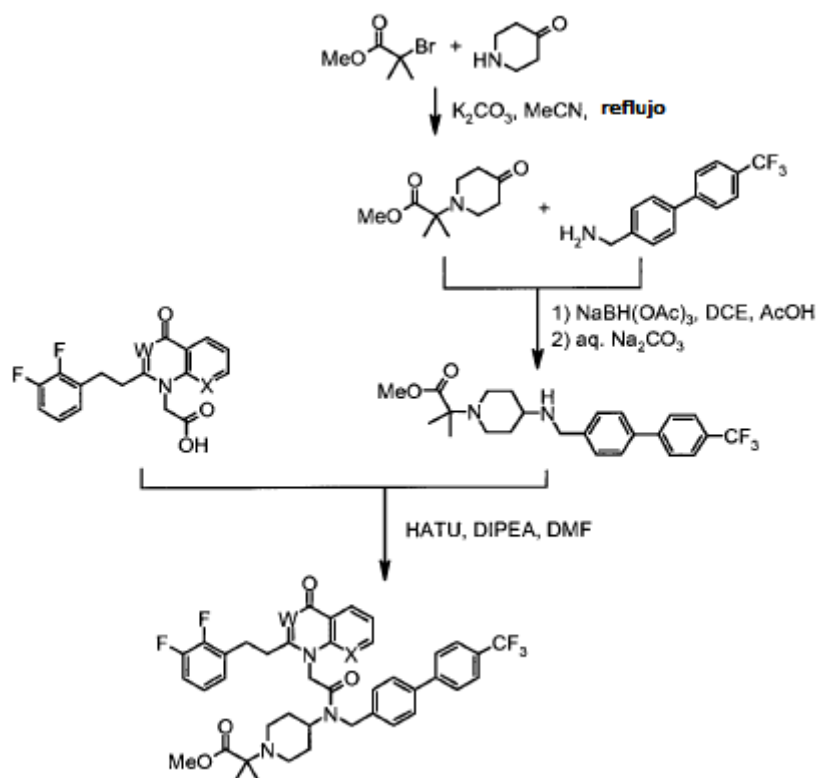
- 55 La base libre se preparó a partir del Int. E1 y el Int. A42 por el método del Ejemplo 1, en el documento WO 02/30904, excepto que se utilizó DMF como solvente en lugar de diclorometano. 1.97 g de este material se cristalizó a partir de

acetato de *n*-butilo (10 ml) para dar el compuesto base (1.35 g). RMN-¹H (CD₃OD) δ 1.7-2.05 (4H, m), 2.05-2.3 (2H, 2xt), 2.5-2.65 (2H, m), 2.95-3.1 (2H, m), 3.3 (3H, s), 3.45-3.55 (2H, m), 3.9-4.05 + 4.4-4.5 (1H, 2xm), 4.37 + 4.48 (2H, 2xs), 4.71 + 4.87 (2H, 2xbr s), 5.31 + 5.68 (2H, 2xs), 6.44 + 6.52 (1H, 2xs), 6.95-7.3 (3H, m), 7.35-7.85 (11H, m), 8.2-8.35 (1H, m); MS (APCI+) encontrado (M+1) 736; C₄₀H₃₈F₅N₃O₃S requiere 735.

5

Síntesis de Fórmula (IV)

El siguiente diagrama de flujo ilustra un proceso para hacer los compuestos ilustrados.

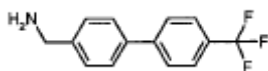


10

Además, se remite al lector a la solicitud PCT publicada WO 03/016287 de productos químicos que pueden ser útiles en la preparación de algunos de los intermedios establecidos en este diagrama de flujo. Además, se hace referencia a las síntesis establecidas en las solicitudes PCT publicadas WO 01/60805, WO 02/30911, WO 02/30904, WO 03/042218, WO 03/042206, WO 03/041712, WO 03/086400, y WO 03/87088, y las solicitudes provisionales en tramitación de Estados Unidos 60/829,328 y 60/829,327 ambas presentadas el 13 de octubre 2006, mencionadas anteriormente. En la medida en que el lector desee preparar los compuestos de fórmula (IV) mediante el uso de intermedios, reactivos, solventes, temperaturas, tiempos, etc., distintos de los de la ruta en la página anterior, estas solicitudes PCT publicadas y las solicitudes co-pendientes de EE.UU., pueden proporcionar una orientación útil.

20

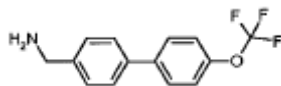
Intermedio (IV) -A1 {[4'-(trifluorometil)-4-bifenil-il] metil} amina



25

La preparación de este compuesto se describe en el documento WO 02/30911 como intermedio D7.

Intermedio (IV) -A2 ([4'-(trifluorometil)oxi]-4-bifenil-il) metil) amina clorhidrato



30

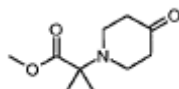
Una solución de 4'-[(trifluorometil)oxi]-4-bifenilcarbonitrilo (preparada a partir del ácido {4-[(trifluorometil)oxi]fenil} bórico por un método análogo al descrito para el análogo de 4'-trifluorometilo, Intermedio D6 de WO 02/30911) (66.6 g) en etanol (2000 ml) y ácido clorhídrico concentrado (100 ml) se hidrogenó sobre el catalizador de Pearlman (10 g) en 25 psi hasta que la reducción se completó. El catalizador se eliminó por filtración a través de celite, después el solvente se eliminó *in vacuo* para obtener el producto deseado.

LCMS Rt = 2.212 minutos; m/z [M + H]⁺ = 251.0

Intermedios para la preparación de fórmula (IV)

Intermedio (IV) -A3

Metil 2-metil-2-(4-oxo-1-piperidinil)propanoato

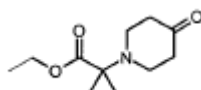


Una mezcla de metil 2-bromo-2-metilpropanoato (80.87ml, 5 equiv), 4-piperidona clorhidrato monohidrato (19.6 g, 1 equiv), acetonitrilo (200 ml) y carbonato de potasio (69.1g, 4 equiv) se calentó a reflujo en atmósfera de nitrógeno con agitación mecánica durante 17.5 h, después se enfrió en un baño de hielo antes de adicionar éter dietílico (100 ml). La filtración a través de celite seguido de cromatografía instantánea (sílica, 10-50% de acetato de etilo en hexano) y la evaporación de las fracciones del producto provee el producto deseado como un aceite de color amarillo (14.28g).

RMN ¹H (CDCl₃) δ 1.41 (6H,s), 2.47 (4H,m), 2.88 (4H,m), 3.73 (3H,s).

Intermedio (IV) -A4

Etil 2-metil-2-(4-oxo-1-piperidinil)propanoato

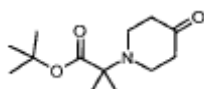


Una mezcla de etil 2-bromo-2-metilpropanoato (48.3ml, 5 equiv), 4-piperidona clorhidrato monohidrato (100 g, 1 equiv), acetonitrilo (1216 ml) y carbonato de potasio (353g, 4 equiv) se calentó a reflujo en atmósfera de nitrógeno con agitación mecánica durante 20 h después se enfrió en un baño de hielo antes de adicionar éter dietílico (aprox. 1400ml). La mezcla se filtró a través de celite, se evaporó *in vacuo*, a continuación, el exceso de bromoéster se separó por destilación (50 °C siendo la temperatura del cabezal/10 Torr). La cromatografía instantánea (sílica, 5-30% de acetato de etilo en hexano) y la evaporación de las fracciones de producto proporcionó el producto crudo como un aceite de color amarillo. Para eliminar algunos contaminantes bromoéster restantes, este se sometió a partición entre acetato de etilo y ácido clorhídrico acuoso 2M. La capa orgánica se descartó y la capa acuosa se basificó con carbonato de sodio, se saturó con cloruro de sodio y se extrajo con acetato de etilo. El secado y la evaporación de los extractos orgánicos proporcionaron el producto deseado como un aceite de color amarillo (54.7g).

RMN ¹H (CDCl₃) δ 1.27 (3H,t), 1.40 (6H,s), 2.47 (4H,m), 2.90 (4H,m), 4.20 (2H,q).

Intermedio (IV) -A5

1,1-Dimetiletil 2-metil-2-(4-oxo-1-piperidinil)propanoato

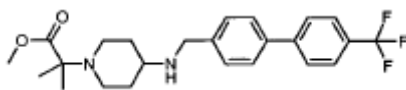


Una mezcla de 1,1-dimetiletil 2-bromo-2-metilpropanoato (8.0 g, 1.1 equiv), clorhidrato de 4-piperidona (5.0 g, 1 equiv), acetona (50 ml) y carbonato de potasio (13.0 g, 3 equiv) se calentó a reflujo con agitación durante 24 h, después se filtró y el filtrado se evaporó. El residuo en bruto se usó en la siguiente etapa sin purificación.

4] ES + MS m/z [M + H-tBu]⁺ = 186.1

Intermedio (IV) -B1

Metil 2-metil-2-[4-({4'-(trifluorometil)-4-bifenil-il}metil)amino]-1-piperidinil]propanoato



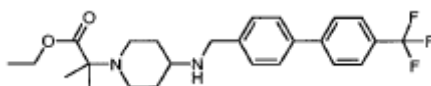
5 Una mezcla de metil 2-metil-2-(4-oxo-1-piperidinil)propanoato (Int. A3) (14.28g, 1 equiv), {[4'-(trifluorometil)-4-bifenil-il]metil}amina (Int. A1) (19.6g, 0.85 equiv), DCE (300ml), ácido acético (3.8 ml, 0.90 equiv) y triacetoxiborohidruro de sodio (20.7 g, 1.25 equiv) se agitó a temperatura ambiente bajo nitrógeno durante 17.5h. Se adicionó carbonato de sodio acuoso (solución 2 M, exceso) y se agitó durante 4 h, a continuación la mezcla se extrajo con una mezcla de éter dietílico y THF. Los extractos orgánicos se retrolavaron con agua y salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio y se filtraron través de una almohadilla de sílica gel que se aclaró con 2.5% de metanol en DCM. Después de la evaporación *in vacuo*, el producto en bruto se cristalizó a partir de éter/hexano, finalmente a temperatura de baño de hielo, el cual después del secado produjo un sólido de color blanco (20,9 g).

15 LCMS Rt = 2.070 minutos; m/z [M + H]⁺ = 435.2

RMN ¹H (d₆-DMSO) δ 1.15-1.32 (8H, m), 1.75-1.87(2H,m), 1.97-2.12 (2H,m), 2.27-2.40 (1H, m), 2.77-2.90(2H,m), 3.60 (3H,s), 3.76 (2H,s), 7.46 (2H, d, J=8.03Hz), 7.67 (2H, d, J=8.28Hz), 7.80 (2H, d, J=8.53Hz), 7.88 (2H, d, 8.03Hz)

20 *Intermedio (IV) -B2*

Etil 2-metil-2-[4-([4'-(trifluorometil)-4-bifenil-il]metil)amino]-1-piperidinil]propanoato



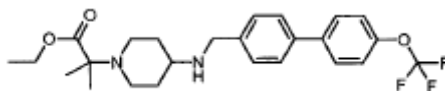
25 Una mezcla de etil 2-metil-2-(4-oxo-1-piperidinil)propanoato (Int. A4.) (25.6 g, 1.2 equiv), {[4'-(trifluorometil)-4-bifenil-il]metil}amina (Int. A1) (31.1g, 1.0 equiv), DCE (400ml) y ácido acético (6.3 ml, 1.1 equiv) se agitó a temperatura ambiente bajo nitrógeno. Se adicionó triacetoxiborohidruro sódico (33.5 g, 1.5 equiv) y la agitación continuó durante 19 horas. Se adicionó carbonato de sodio acuoso (solución 2 M, exceso) y se agitó durante 1.5 h, a continuación la mezcla se extrajo con una mezcla de éter dietílico y THF. Los extractos orgánicos se retrolavaron con agua y salmuera, se filtraron a través de una almohadilla de sílica gel, se secaron sobre sulfato de sodio y se evaporaron *in vacuo*. El producto deseado se obtuvo como un sólido de color blanco (44.2 g) que se usó sin purificación adicional.

35 LCMS Rt = 2.194 minutos; m/z [M + H]⁺ = 449.3

RMN ¹H (d₆-DMSO) δ 1.06-1.32 (11H,m), 1.74-1.89 (2H,m), 1.99-2.14 (2H, m), 2.25-2.39 (1H. m), 2.69-2.89 (2H, m), 3.75 (2H, s), 4.01-4.12 (2H, m), 7.45 (2H, d, J=7.55 Hz), 7.67 (2H, d, J=7.81 Hz), 7.79 (2H, d, J=8.06 Hz), 7.88 (2H. d, J=8.06Hz)

40 *Intermedio (IV) -B3*

Etil 2-metil-2-[4-([4'-(trifluorometil)oxi]-4-bifenil-il)metil]amino]-1-piperidinil] propanoato

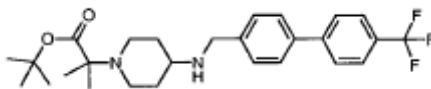


45 Una mezcla de etil 2-metil-2-(4-oxo-1-piperidinil)propanoato (Int. A4) (1.09g, 1.2 equiv), ([4'-(trifluorometil) oxi]-4-bifenil-il)metil}amina clorhidrato (Int. A2) (1.28g, 1.0 equiv), DCE (21ml) y ácido acético (0.27 ml, 1,1 equiv) se agitó a temperatura ambiente bajo nitrógeno. Se adicionó triacetoxiborohidruro de sodio (1.42 g, 1.5 equiv) y se continuó la agitación durante 3 horas. Se adicionó carbonato de sodio acuoso (solución 2 M, exceso) y se agitó durante 45 min, a continuación, la mezcla se sometió a partición con una mezcla de éter dietílico/THF y agua. Los extractos orgánicos se retrolavaron con agua y salmuera, y se secaron sobre sulfato de sodio y se evaporaron *in vacuo*. El producto deseado se obtuvo como un sólido de color amarillo claro (2.14 g), que se usó sin purificación adicional.

55 LCMS Rt = 2.244 minutos; m/z [M + H]⁺ = 465.3

Intermedio (IV) -B4

1,1-Dimetiletil 2-metil-2-[4-({[4'-(trifluorometil)-4-bifenil-il]metil}amino)-1-piperidinil]propanoato



5

Una mezcla de 1,1-dimetiletil 2-metil-2-(4-oxo-1-piperidinil)propanoato (Int. A6) (370mg, 1.2 equiv), {[4'-(trifluorometil)-4-bifenil-il]metil}amina (Int. A1) (397mg, 1 equiv), triacetoxiborohidruro de sodio (400 mg, 1.5 equiv), DCM (10 ml) y ácido acético (0.076ml, 1 equiv) se combinó y se agitó a temperatura ambiente hasta que la LCMS confirmó la desaparición del material inicial de amina (aprox. 18 horas). Se adicionó carbonato de sodio acuoso y a continuación se extrajo con DCM. Los orgánicos se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron para dar un sólido (420 mg) que se usó sin purificación adicional.

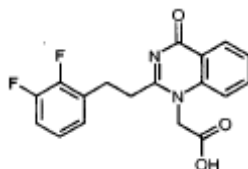
10

LCMS Rt = 2.24 minutos; m/z [M + H]⁺ = 477.3

15

Intermedio (IV)-C1

Ácido [2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxo-1(4H)-quinazolinil]acético



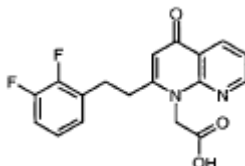
20

La preparación de este compuesto se describió en el documento WO 02/30911 como el intermedio C43.

Intermedio (IV)-C2

25

Ácido [2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxo-1,8-naftiridin-1(4H)-il]acético

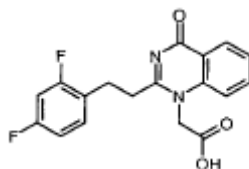


30

La preparación de este compuesto se describió en WO 02/30904 como intermedio E21.

Intermedio (IV)-C3

Ácido [2-[2-(2,4-difluorofenil)etil]-4-oxo-1(4H)-quinazolinil]acético



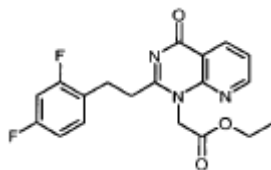
35

La preparación de este compuesto se describió en WO 02/30911 como intermedio C45.

Intermedio (IV)-C4

40

Etil [2-[2-(2,4-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-(4H)-il]acetato



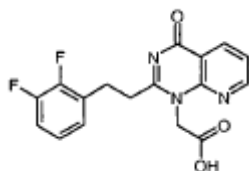
5 Una mezcla de etil (2,4-dioxo-3,4-dihidropirido[2,3-*d*]pirimidin-1(2*H*)-il)acetato (WO 02/30911, Intermedio B52) (40.8g, 1.2 equiv) y 3-(2,4-difluorofenil)-propanimidamida (preparada por métodos análogos a los descritos para el isómero 2,3-difluoro, Los intermedios A1 a A3 de WO 02/30911) (30.0 g, 1 equiv) se fusionaron en un baño de aceite de 150 °C, durante 25 min, a continuación se enfrió rápidamente a temperatura ambiente en un baño de agua. La cromatografía (sílica, producto en bruto cargado en DCM y eluido con 50-100% de acetato de etilo en hexano) proporcionó el producto deseado (43.56g).

10 LCMS Rt = 2.521 minutos; m/z [M+H]⁺ = 374.1

RMN ¹H (CDCl₃) δ 1.31 (3H, t), 3.13 (2H, m), 3.26 (2H, m), 4.28 (2H, q), 5.27 (2H, s), 6.82 (2H, m), 7.34 (1H, m), 7.50 (1H, m), 8.65 (1H, m), 8.74 (1H, m).

15 *Intermedio (IV)-C5*

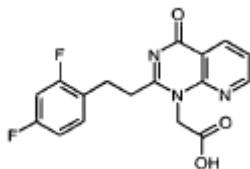
Ácido [2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-*d*]pirimidin-1(4*H*)-il] acético



20 La preparación de este compuesto se describió en WO 02/30911, como intermedio C35.

Intermedio (IV) -C5

25 Ácido [2-[2-(2,4-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-*d*]pirimidin-1(4*H*)-il]acético

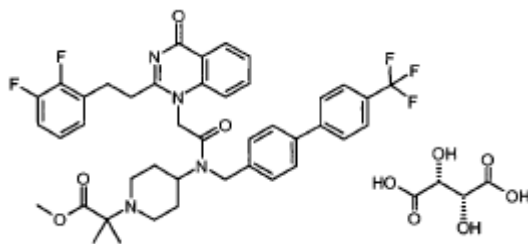


30 Etil [2-[2-(2,4-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-*d*]pirimidin-1(4*H*)-il]acetato (Int. C1) (32.76g, 1 equiv) se disolvió en etanol (350 ml) y agua (70 ml), se enfrió en hielo, a continuación se adicionó hidróxido de litio acuoso (solución 2 M, 43.42ml, 0.99 equiv). Se continuó la agitación durante 2 h a temperatura ambiente. La solución se concentró *in vacuo* y el residuo se volvió a disolver en agua (700 ml) y bicarbonato de sodio acuoso saturado (50 ml), a continuación se lavó con acetato de etilo (200 ml). La capa acuosa se acidificó a pH 2 con ácido clorhídrico 2 M, y el precipitado se separó por filtración, se lavó con agua con hielo (50 ml) y se secó *in vacuo* (50 °C, 16 h) para obtener el producto deseado (23,2 g).

35 RMN ¹H (d₆-DMSO) δ 2.4-2.6 (4H, m), 5.24 (2H, s), 7.04 (1H, m), 7.22 (1H, m), 7.48 (1H, m), 7.60 (1H, m), 8.47 (1H, m), 8.84 (1H, m).

Ejemplo (IV) -1

40 Metil 2-[4-({[2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxo-1(4*H*)-quinazolinil]acetil} {[4'-(trifluorometil)-4-bifenil-il] metil}amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato 2,3-dihidroxitbutanoato (sal)



5 Una mezcla del ácido [2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxo-1(4H)-quinazolinil]acético (Int. C1) (100 mg, 1 equiv), metil 2-metil-2-[4-({[4'-(trifluorometil)-4-bifenil-il]metil}amino)-1-piperidinil]propanoato (Int. B1) (130mg, 1.03 equiv), DIPEA (0.1ml, 3.6 equiv), acetonitrilo (2 ml) y HATU (130 mg, 1.4 equiv) se agitó a temperatura ambiente durante 1 h, a continuación se evaporó y se redisolvió en acetonitrilo. La purificación por HPLC de fase reversa (Método Preparativo A) produjo el metil 2-[4-({[2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxo-1(4H)-quinazolinil]acetil} {[4'-(trifluorometil)-4-bifenil-il]metil}amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato (128 mg).

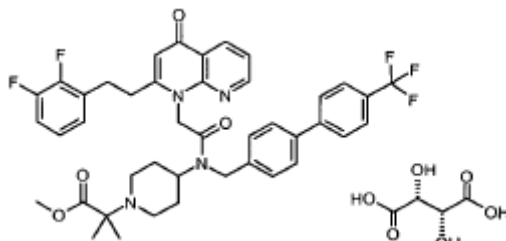
10 LCMS Rt = 2.686 minutos; m/z [M+H]⁺ = 761.3

15 RMN ¹H (CDCl₃) δ 1.33 (3H, s), 1.36 (3H, s), 1.83-2.02 (4H, m), 2.36-2.48 (2H, m), 2.87-2.91 (1H, m), 3.06-3.09 (2H, m), 3.16-3.20 (2H, m), 3.26-3.29 (1H, m), 3.71-3.73 (3H, m), 4.02/4.51 (1H, 2x br m), 4.74 (1H, s), 4.92 (1H, s), 5.12 (1H, s), 5.56 (1H, s), 7.00-7.19 (3H, m), 7.32-7.37 (1H, m), 7.48-7.62 (5H, m), 7.72-7.81 (5H, m), 8.22-8.28 (1H, m).

La base libre se convirtió en la sal de bitartrato mediante la adición de ácido L-tartárico (1.675g, 1.0 equiv) en una porción y se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente. La solución se concentró *in vacuo* hasta que un polvo de color blanco crema que se secó en un horno de vacío a temperatura ambiente.

20 Ejemplo de Metodología de Síntesis (IV) -2

Metil 2-[4-({[2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxo-1,8-naftiridin-1(4H)-il]acetil} {[4'-(trifluorometil)-4-bifenil-il] metil}amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato 2,3-dihidroxitbutanodioato (sal)



25 Una mezcla del ácido [2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxo-1,8-naftiridin-1(4H)-il]acético (Int. C2) (100mg, 1 equiv), carbonildiimidazol (50 mg, 1.05 equiv) y dimetilacetamida (4 ml) se agitó a 60 °C durante 30 min, luego se adicionó metil 2-metil-2-[4-({[4'-(trifluorometil)-4-bifenil-il]metil}amino)-1-piperidinil]propanoato (Int. B1) (132mg, 1.05 equiv) y la temperatura se elevó a 80 °C durante 2 h. Se adicionó una porción adicional de carbonildiimidazol (0.5 equiv) y se continuó la agitación a 80 °C, durante 15 h. Después del enfriamiento, la mezcla en bruto se aplicó a HPLC de fase reversa (Método Preparativo A) para obtener metil 2-[4-({[2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxo-1,8-naftiridin-1(4H)-il]acetil} {[4'-(trifluorometil)-4-bifenil-il]metil}amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato (99mg).

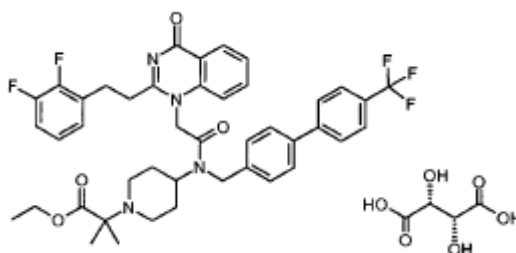
35 LCMS Rt = 2.845 minutos; m/z [M+H]⁺ = 761.3

40 RMN ¹H (CDCl₃) δ 1.28 (3H, s), 1.31 (3H, s), 1.73-2.05 (4H, m), 2.25 (1H, t), 2.39-2.46 (1H, m), 2.96-2.99 (1H, m), 3.00-3.12 (4H, m), 3.19 (1H, s), 3.68-3.73 (3H, m), 4.11/4.41 (1H, 2x br m), 4.73 (1H, s), 4.97 (1H, s), 5.51 (1H, s), 6.29-6.34 (1H, m), 7.06-7.20 (2H, m), 7.35-7.41 (1H, m), 7.48-7.58 (2H, m), 7.68-7.84 (6H, m), 8.60-8.68 (1H, m), 8.87-8.91 (1H, m).

Este se convirtió en la sal de bitartrato por un método análogo al descrito para el Ejemplo de Metodología de Síntesis (I).

45 Ejemplo de Metodología de Síntesis (IV) -3

Etil 2-[4-({[2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxo-1(4H)-quinazolinil]acetil} {[4'-(trifluorometil)-4-bifenil-il] metil}amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato 2,3-dihidroxitbutanodioato (sal)



5 Una mezcla ácido [2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxo-1(4H)-quinazolinil]acético (Int. C1) (115mg, 1 equiv), etil 2-metil-2-[4-
 6 ({{4'-(trifluorometil)-4-bifenil-il}metil}amino)-1-piperidinil]propanoato (Int. B2) (150mg, 1 equiv), HATU (151mg, 1.2 equiv),
 7 DMF (2.7ml) y DIPEA (0.17ml, 3 equiv) se agitó a temperatura ambiente, durante 5 h. La mezcla de reacción se sometió
 8 a partición entre acetato de etilo/metanol y bicarbonato de sodio acuoso, a continuación, la capa orgánica se lavó con
 9 salmuera y se secó. La cromatografía instantánea (sílica, 3-4% de metanol en DCM) produjo etil 2-[4-{{2-[2-(2,3-
 10 difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d] pirimidin-1(4H)-il]acetil} {{4'-(trifluorometil)-4-bifenil-il}metil}amino)-1-piperidinil]-2-
 11 metilpropanoato como un sólido de color blanco (190 mg).

10

LCMS Rt = 2.55 minutos; m/z [M+H]⁺ = 775.3

15 RMN ¹H (CDCl₃) δ 1.18-1.40 (9H, m), 1.61-2.09 (4H, m), 2.22-2.45 (2H, m), 2.75-2.85 (1H, m), 2.90-3.34 (5H, m),
 3.71/4.66 (1H, 2x m), 4.12-4.26 (2H, m), 4.70-4.85 (3H, m), 5.08 (1H, s), 6.80-6.88 (1H, m), 6.95-7.13 (3H, m), 7.27-7.33
 16 (1H, m), 7.34-7.52 (3H, m), 7.56-7.62 (1H, m), 7.63-7.77 (4H, m), 8.29-8.44 (2H, m).

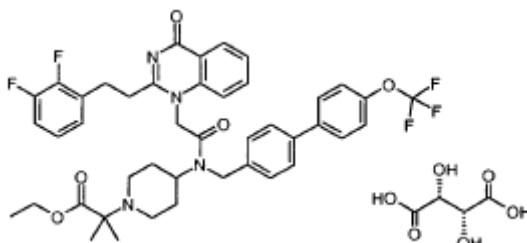
15

Este se convirtió en la sal de bitartrato por un método análogo al descrito en el Ejemplo de Metodología de Síntesis (I).

20

Ejemplo de Metodología de Síntesis (IV) -4

20 Etil 2-[4-{{2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxo-1(4H)-quinazolinil]acetil}{{4'-[(trifluorometil)oxi]-4-bifenil-il} metil}amino)-1-
 21 piperidinil]-2-metilpropanoato 2,3-dihidroxitbutanodioato (sal)



25

25 Una mezcla del ácido [2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxo-1(4H)-quinazolinil]acético (Int. C1) (124mg, 1.2 equiv), etil 2-metil-
 26 2-[4-{{4'-[(trifluorometil)oxi]-4-bifenil-il}metil}amino]-1-piperidinil]propanoato (Int. B3) (139mg, 1 equiv), DMF (1.2ml) y
 27 DIPEA (0.16ml, 3 equiv) se agitó a temperatura ambiente durante 30 min, a continuación se adicionó HATU (176 mg,
 28 1.5 equiv) y la agitación continuó, durante 4 h. HPLC de fase reversa (Método Preparativo B) produjo el etil 2-[4-{{2-[2-
 29 (2,3-difluorofenil)etil]-4-oxo-1(4H)-quinazolinil]acetil} {{4'-[(trifluorometil)oxi]-4-bifenil-il} metil}amino)-1-piperidinil]-2-
 30 metilpropanoato como un sólido de color blanco (174 mg).

30

LCMS Rt = 2.77 minutos; m/z [M+H]⁺ = 791.3

35

35 RMN ¹H (CDCl₃) picos característicos: δ 1.21-1.42 (9H, m), 1.58-2.08 (4H, m), 2.20-2.48 (2H, m), 2.71-5.1 (13H, br m),
 36 6.79-6.87 (1H, d), 6.92-7.11 (3H, m), 7.30-7.46 (5H, m), 7.48-7.63 (5H, m), 8.26-8.40 (1H, m)

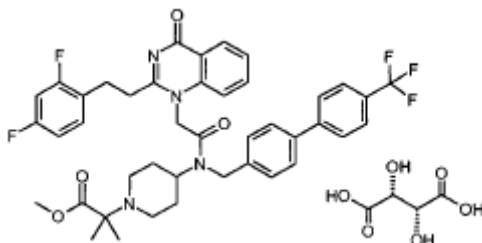
Este se convirtió en la sal de bitartrato por un método análogo al descrito en el Ejemplo de Metodología de Síntesis (I).

40

Ejemplo de Metodología de Síntesis (IV) -5

45 Metil 2-[4-{{2-[2-(2,4-difluorofenil)etil]-4-oxo-1(4H)-quinazolinil]acetil} {{4'-[(trifluorometil)-4-bifenil-il]metil} amino)-1-
 46 piperidinil]-2-metilpropanoato 2,3-dihidroxitbutanodioato (sal)

45



5 La mezcla del ácido [2-[2-(2,4-difluorofenil)etil]-4-oxo-1(4H)-quinazolinil]acético (Int. C3) (100 mg, 1 equiv), metil 2-metil 2-[4-({[4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil}amino)-1-piperidinil]propanoato (Int. B1) (130mg, 1.03 equiv), DIPEA (0.1ml, 2 equiv), acetonitrilo (2 ml) y HATU (130 mg, 1,4 equiv) se agitó a temperatura ambiente durante 1 h, a continuación se evaporó y se redisolvió en acetonitrilo. La purificación por HPLC de fase reversa (Método Preparativo B) proporcionó el metil 2-[4-({[2-[2-(2,4-difluorofenil)etil]-4-oxo-1(4H)-quinazolinil]acetil] [4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil}amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato (126 mg).

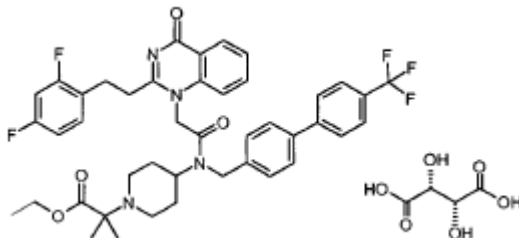
10 LCMS Rt = 2.698 minutos; m/z [M + H]⁺ = 761.3

15 RMN ¹H (CDCl₃) δ 1.30 (3H, s), 1,34 (3H, s), 1,81-2,03 (4H, m), 2,29-2,35 (1H, m), 2,39-2,45 (1H, m), 2,82-2,87 (1H, m), 3,00-3,14 (4H, m), 3,19 a 3,24 (1H, m), 3,70-3,73 (3H, m), 4,00 / 4,51 (1H, 2x br m), 4,74 (1H, s), 4,91 (1H, s), 5,10 (1H, s), 5,54 (1H, s), 6,77-6,84 (1H, m), 6,87-6,98 (1H, m), 7,28-7,43 (2H, m), 7,48-7,61 (5H, m), 7,73-7,81 (5H, m), 8.23 a 8.29 (1H, m).

Este se convirtió en la sal de bitartrato por un método análogo al descrito en el Ejemplo de Metodología de Síntesis (I).

20 *Ejemplo de Metodología de Síntesis (IV)-6*

Etil 2-[4-({[2-[2-(2,4-difluorofenil)etil]-4-oxo-1(4H)-quinazolinil]acetil] [4'-(trifluorometil)-4-bifenil-il]metil}amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato 2,3-dihidroxitbutanoato (sal)



25

30 Una mezcla del ácido [2-[2-(2,4-difluorofenil)etil]-4-oxo-1(4H)-quinazolinil]acético (Int. C3) (120mg, 1 equiv), etil 2-metil-2-[4-({[4'-(trifluorometil)-4-bifenil-il]metil}amino)-1-piperidinil]propanoato (Int. B2) (204mg, 1.3 equiv), DMF (1.4ml) y DIPEA (0.183ml, 3 equiv) se agitó a la temperatura ambiente, a continuación se adicionó HATU (206 mg, 1,5 equiv) con agitación vigorosa y la agitación continuó durante 1.5 h. Una porción adicional del Intermedio D5 (12 mg, 0.1 equiv) se adicionó a continuación, se continuó la agitación durante 2 días. HPLC de fase reversa (Método Preparativo B) dio etil 2-[4-({[2-[2-(2,4-difluorofenil)etil]-4-oxo-1(4H)-quinazolinil]acetil] [4'-(trifluorometil)-4-bifenil-il]-metil}amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato como un sólido de color blanco (173 mg).

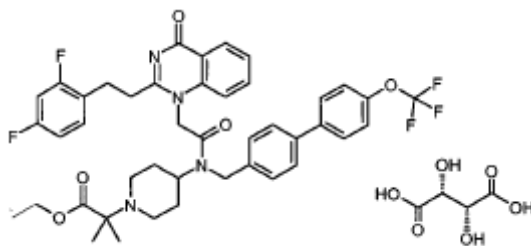
35 LCMS Rt = 2.751 minutos; m/z [M+H]⁺ = 775.3

RMN ¹H (CDCl₃) δ (mezcla de rotámeros) picos característicos: 1.22-1.47 (9H, m), 1.63-2.10 (4H, m), 2.16-5.11 (15H, br m), 6.75-6.88 (2H, m), 7.14-7.80 (12H, m), 8.26-8.40 (1H, m).

40 Este se convirtió en la sal de bitartrato por un método análogo al descrito en el Ejemplo de Metodología de Síntesis (I).

45 *Ejemplo de Metodología de síntesis (IV) -7*

Etil 2-[4-({[2-[2-(2,4-difluorofenil)etil]-4-oxo-1(4H)-quinazolinil]acetil]({[4'-(trifluorometil)oxi]-4-bifenil-il]metil}amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato 2,3-dihidroxitbutanoato (sal)



5 Una mezcla del ácido [2-[2-(2,4-difluorofenil)etil]-4-oxo-1(4H)-quinazolinil]acético (Int. C3) (114mg, 1.1 equiv), etil 2-
 10 metil-2-[4-[[4'-(trifluorometil)oxi]-4-bifenil-il]metil]amino]-1-piperidinil]propanoato (Int. B3) (139mg, 1 equiv), DMF (1.2ml)
 y DIPEA (0.16ml, 3 equiv) se agitó a la temperatura ambiente, a continuación se adicionó HATU (176 mg, 1.5 equiv) con
 agitación vigorosa y la agitación continuó durante 30 min. Se adicionó una porción adicional del Intermedio D5 (21 mg,
 0.2 equiv), seguido más tarde por 1hr adicional de HATU (23 mg, 0.2 equiv), a continuación se continuó la agitación
 durante 18 h. HPLC de fase reversa (Método Preparativo B) produjo el etil 2-[4-[[[2-[2-(2,4-difluorofenil)etil]-4-oxo-1(4H)-
 quinazolinil]-acetil]({4'-(trifluorometil) oxi]-4-bifenil-il]metil]amino]-1-piperidinil]-2-metilpropanoato como un sólido de
 color blanco (149mg).

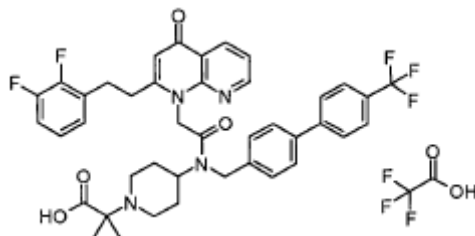
LCMS Rt = 2.793 minutos; m/z [M+H]⁺ = 791.3

15 RMN ¹H (CDCl₃) picos característicos: δ 1.20-1.45 (9H, m), 1.58-2.12 (4H, m), 2.14-2.48 (2H,m), 2.620-5.11 (11H, m),
 6.59-6.72 (1H, m), 6.73-6.90 (2H, m), 7.16-7.64 (11H. m), 8.25-8.40 (1H, m).

Este se convirtió en la sal de bitartrato por un método análogo al descrito en el Ejemplo de Metodología de Síntesis (II).

20 Ejemplo de Metodología de síntesis (IV) -8

Trifluoroacetato del ácido 2-[4-[[[2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxo-1,8-naftiridin-1(4H)-il]acetil] {[4'-(trifluorometil)-4-bifenil-
 il]metil] amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoico



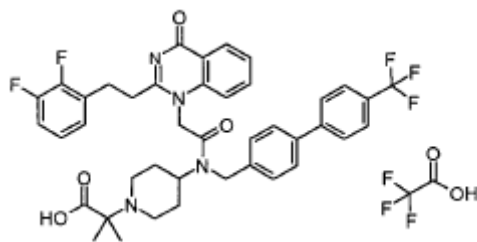
25 Una mezcla de 1,1-dimetiletil 2-metil-2-[4-[[[4'-(trifluorometil)-4-bifenil-il]metil]amino)-1-piperidinil] propanoato (Int. B4) (1
 equiv), ácido [2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxo-1,8-naftiridin-1(4H)-il]acético (Int. C2) (1.2 equiv), DIPEA (3 equiv) y DMF
 (1.0ml) se agita a temperatura ambiente durante 5 min. Se adicionó HATU (1.5 equiv) en 1 porción y se agitó un
 30 adicional de 5 min. La mezcla de reacción en bruto se concentró, se filtró a través de un tapón de sílica eluido con
 acetona y se evaporó para obtener 1,1-dimetiletil 2-[4-[[[2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxo-1,8-naftiridin-1(4H)-il]acetil] {[4'-
 (trifluorometil)-4-bifenil-il]metil]amino)-1-piperidinil]-2-metil propanoato.

35 El propanoato, sin aislamiento, se disuelve en una mezcla 1:1 de TFA y DCM y se agitó a RT durante 4 h. La
 evaporación y HPLC preparativa (método A) da el compuesto base.

Otras sales se pueden preparar por medios convencionales. La base libre se puede preparar también por medios
 convencionales.

40 *Ejemplo Metodología de Síntesis (IV)-9*

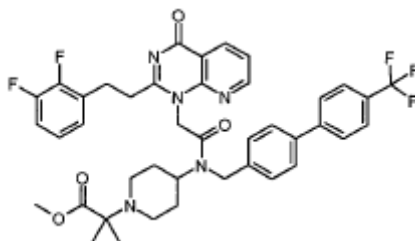
Trifluoroacetato del ácido 2-[4-[[[2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxo-1(4H)-quinazolinil]acetil] {[4'-(trifluorometil)-4-bifenil-
 il]metil]amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoico



- 5 Una mezcla de 1,1-dimetiletil 2-metil-2-[4-({[4'-(trifluorometil)-4-bifenil-il]metil}amino)-1-piperidinil] propanoato (Int. B4) (1 equiv), ácido [2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxo-1(4H)-quinazolinil] acético (Int. C1) (1.2 equiv), DIPEA (3 equiv) y DMF (1.0ml) se agitó a temperatura ambiente durante 5 min. HATU (1,5 equiv) se adicionó en 1 porción y se agitó un adicional de 5 min. La mezcla de reacción en bruto se concentró, se filtró a través de un tapón de sílica eluido con acetona y se evaporó para obtener en bruto 1,1-dimetiletil 2- [4 - ({[2- [2- (2,3-difluorofenil) etil] -4 oxo-1 (4H) - quinazolinil] acetil} {[4'-(trifluorometil)-4-bifenilil] metil} amino) -1-piperidinil] -2-metilpropanoato.
- 10 El propanoato, sin aislamiento, se disuelve en una mezcla 1:1 de TFA y DCM y se agitó a RT durante 4 h. La evaporación y HPLC preparativa (Método A) provee el compuesto mencionado.

Ejemplo de Metodología de Síntesis (IV) -10

- 15 Metil 2-[4-({[2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il]acetil} {[4'-(trifluorometil)-4-bifenil-il] metil}amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato



- 20 Una mezcla del ácido [2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il]acético (Int. D1) (20.7g, 1.3 equiv), metil 2-metil-2-[4-({[4'-(trifluorometil)-4-bifenil-il]metil}amino)-1-piperidinil]propanoato (Int. B1) (20.0g, 1.3 equiv), DIPEA (24.0ml, 3 equiv) y DMF (184ml) se agitó mecánicamente, a continuación se adicionó HATU (27.1g, 1.5 equiv) en una porción y se continuó la agitación durante 2 h. La mezcla de reacción se sometió a partición entre éter dietílico/THF (1:1) y carbonato de sodio (1 M, exceso). La capa orgánica se lavó con agua y salmuera, se secó y se evaporó. La cromatografía se realizó secuencialmente en tres columnas de sílica (en primer lugar 3: 1 EtOAc/hexanos; en segundo lugar 2% de MeOH en DCM, en tercer lugar 1: 1 de EtOAc/hexanos a 100% EtOAc). Las fracciones del producto se evaporaron para obtener el producto deseado como un sólido amorfo de color rosa (27.5 g).
- 25

LCMS Rt = 2.702 minutos; m/z [M + H]⁺ = 762,3

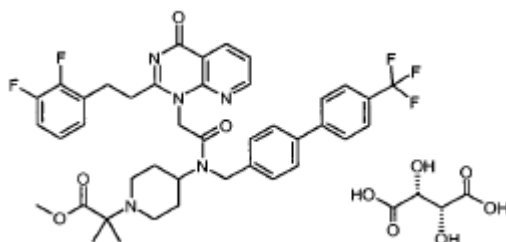
- 30 Cristalización: Una mezcla de metil 2-[4-({[2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il]acetil} {[4'-(trifluorometil)-4-bifenil-il]metil}-amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato (8.0g) y etanol (200ml) se calentó hasta que se disolvió completamente. La solución se agitó magnéticamente durante 24 horas a temperatura ambiente, a continuación se filtró y se recolectaron 7.5 g de sólido. Estos cristales solvatados se colocaron en un horno de vacío a 60 °C, con una purga de nitrógeno para mantener el vacío a aproximadamente 630 Torr, durante 24 horas para proveer el compuesto base cristalino no solvatado (7.15 g), p.f. 150 °C.
- 35

RMN ¹H (CD₃OD) δ 1.25 (3H, s), 1.30 (3H, s), 1.63-1.99 (4H, m), 2.16-2.28 (1H, m), 2.3-2.43 (1H, m), 2.89-2.98 (1H, m), 2.98-3.08 (2H, m), 3.16-3.30 (3H, m), 3.66-3.69 (3H, m), 4.02/4.38 (1H, 2x br m), 4.69 (1H, s), 4.87 (1H, s), 5.4/5.73 (2H, 2x s), 6.99-7.19 (3H, m), 7.29-7.35 (1H, m), 7.50-7.61 (3H, m), 7.64-7.82 (5H, m), 8.48-8.57 (1H, m), 8.80-8.89 (1H, m)

40 Véase la Figura 1, a continuación.

Ejemplo de Metodología de síntesis (IV) -11

- 45 Metil 2-[4-({[2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il]acetil} {[4'-(trifluorometil)-4-bifenil-il] metil}amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato 2,3-dihidroxiutanodioato (sal)



5 Metil 2-[4-({[2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-*d*]pirimidin-1(4*H*)-il]acetil} {[4'-(trifluorometil)-4-bifenil-il]metil} amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato (8.5g, 1 equiv) se suspendió en metanol (100 ml) y se calentó a 50 °C hasta que el sólido se disolvió. Se adicionó ácido L-tartárico (1.675g, 1.0 equiv) en una porción y se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente. La solución se concentró *in vacuo* hasta un polvo de color blanco crema, el cual se secó en un horno de vacío a temperatura ambiente.

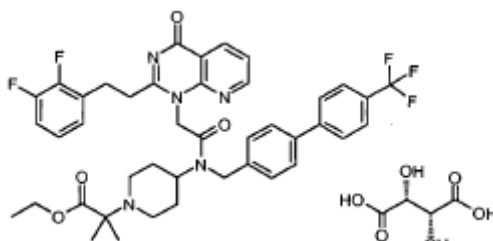
LCMS Rt = 2.697 minutos; m/z [M+H]⁺ = 762.3

10 RMN ¹H (d₆-DMSO) δ 1.17 (3H, s), 1.23 (3H, s), 1.47-1.91 (4H, m), 1.98-2.41 (1H, m), 2.16-2.33 (1H, m), 2.80-3.26 (6H, m), 3.50-3.67 (3H, m), 3.95/4.17 (1H, 2x br m), 4.61 (1H, s), 4.85 (1H, s), 5.39/5.69 (2H, 2x s), 7.08-7.39 (4H, m), 7.53-7.70 (3H, m), 7.72-7.97 (5H, m), 8.42-8.54 (1H, m), 8.85-8.95 (1H, m)

Ejemplo de Metodología de síntesis (IV) -12

15

Etil 2-[4-({[2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-*d*]pirimidin-1(4*H*)-il]acetil} {[4'-(trifluorometil)-4-bifenil-il]metil} amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato 2,3-dihidroxiбутандиоат (sal)



20 Una mezcla del ácido [2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-*d*]pirimidin-1(4*H*)-il]acético (Int. D1) (116mg, 1 equiv), etil 2-metil-2-[4-({[4'-(trifluorometil)-4-bifenil-il]metil} amino)-1-piperidinil]propanoato (Int. B2) (150mg, 1 equiv), HATU (151mg, 1.2 equiv), DMF (2.72ml) y DIPEA (0.17ml, 3 equiv) se agitó a temperatura ambiente durante 3.25h. La mezcla de reacción se sometió a partición entre acetato de etilo/metanol y bicarbonato de sodio acuoso, la capa orgánica se lavó con salmuera, se secó y se trató con carbón activado (250 mg). La cromatografía instantánea (sílica, 3-4% de metanol en DCM) dio etil 2-[4-({[2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-*d*]pirimidin-1(4*H*)-il]acetil} {[4'-(trifluorometil)-4-bifenil-il]metil} amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato como un sólido de color blanco (178 mg).

25

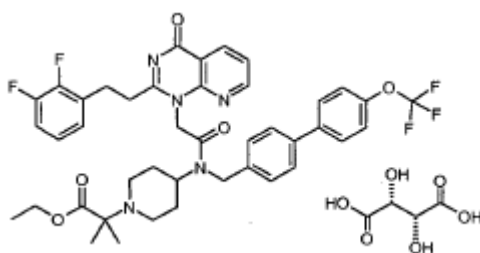
LCMS Rt = 2.58 minutos; m/z [M + H]⁺ = 776,3

30 RMN ¹H (CDCl₃) δ 1.20-1.40 (9H, m), 1.56-2.02 (4H, m), 2.19-2.44 (2H, m), 2.88-3.20, (4H, m), 3.22-3.40 (2H, m), 3.81/4.58 (1H, 2x m), 4.11-4.27 (2H, m), 4.69/4.84 (2H, 2x s), 5.17/5.49 (2H, 2x s), 6.95-7.14 (3H, m), 7.25-7.31 (1H, m), 7.38-7.54 (3H, m), 7.54, 7.61 (1H, m), 7.62-7.79 (4H, m), 8.57-8.75 (2H, m)

35 Este se convirtió en la sal de bitartrato por un método análogo al descrito para el Ejemplo de Metodología de Síntesis (II).

Ejemplos de Metodología de Síntesis (IV) -13

40 Etil 2-[4-({[2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-*d*]pirimidin-1(4*H*)-il]acetil} {[4'-(trifluorometil)oxi]-4-bifenil-il]metil} amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato 2,3-dihidroxiбутандиоат (sal)



5 Una mezcla del ácido [2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il]acético (Int. D1) (114mg, 1.1 equiv), etil 2-metil-2-{4-[[4'-(trifluorometil)oxi]-4-bifenil-il]metil}amino-1-piperidinil}propanoato (Int. B4) (139mg, 1 equiv), DMF (1.2ml) y DIPEA (0.16ml, 3 equiv) se agitó a temperatura ambiente durante 30 min, a continuación se adicionó HATU (176 mg, 1,5 equiv) y la agitación continuó durante 3 h. HPLC de fase reversa (Método Preparativo B) proporcionó el etil 2-{4-[[2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxo-1(4H)-quinazolinil] acetil]}{4'-(trifluorometil)oxi}-4-bifenil-il}metil amino-1-piperidinil}-2-metilpropanoato como un sólido de color blanco (166 mg).

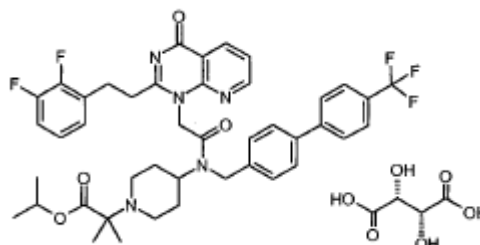
10 LCMS Rt = 2.87 minutos; m/z [M+H]⁺ = 792.3

15 RMN ¹H (CDCl₃) δ 1.18-1.42 (9H, m), 1.54-2.04 (4H, m), 2.12-2.46 (2H, m), 2.86-3.21 (4H, m), 3.21-3.41 (2H, m), 3.79/4.57 (1H, 2x m), 4.10-4.27 (2H, m), 4.68 (1H, s), 4.82 (1H, s), 5.17 (1H, s), 5.47 (1H, s), 6.94-7.16 (3H, m), 7.20-7.36 (3H, m), 7.37-7.48 (3H, m), 7.48-7.61 (3H, m), 8.56-8.76 (2H, m).

Este se convirtió en la sal de bitartrato por un método análogo al descrito para el Ejemplo de Metodología de Síntesis (II).

20 *Ejemplo de Metodología de síntesis (IV) -14*

1-Metiletil 2-[4-[[2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il]acetil]}{4'-(trifluorometil)-4-bifenil-il]metil}amino-1-piperidinil]-2-metilpropanoato 2,3-dihidroxiбутаноидоато (sal)



25 Una mezcla de 1-metiletil 2-metil-2-[4-[[4'-(trifluorometil)-4-bifenil-il]-metil]amino-1-piperidinil]propanoato (Int. B3) (420 mg, 1 equiv), ácido [2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il]acético (Int. D1) (300mg, 1 equiv), HATU (396mg, 1.2 equiv), DIPEA (0.22ml, 1.5 equiv) y DMF (3.0ml) se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. La mezcla de reacción en bruto se aplicó directamente a HPLC de fase reversa (Método Preparativo A) para obtener el 1-metiletil 2-[4-[[2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il]acetil]}{4'-(trifluorometil)-4-bifenil-il]metil}amino-1-piperidinil]-2-metilpropanoato (171 mg).

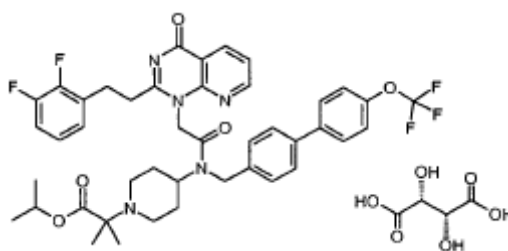
30 LCMS Rt = 2.837 minutos; m/z [M+H]⁺ = 790.3

35 RMN ¹H (CD₃OD) δ 1.16-1.37 (12H, m), 1.62-2.01 (4H, m), 2.27-2.55 (2H, m), 2.95-3.12 (3H, m), 3.12-3.29 (3H, m), 4.06/4.40 (1H, 2x br m), 4.71 (1H, s), 4.89 (1H, s), 4.92-5.07 (1H, m), 5.43/5.76 (2H, 2x s), 7.00-7.21 (3H, m), 7.29-7.38 (1H, m), 7.49-7.65 (3H, m), 7.65-7.87 (5H, m), 8.48-8.58 (1H, m), 8.81-8.90 (1H, m).

40 Este se convirtió en la sal de bitartrato por un método análogo al descrito para el Ejemplo de Metodología de Síntesis (II).

45 *Ejemplo de Metodología de síntesis (IV) -15*

1-Metiletil 2-[4-[[2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il]acetil]}{4'-(trifluorometil) oxil}-4-bifenil-il]metil}amino-1-piperidinil]-2-metilpropanoato 2,3-dihidroxiбутаноидоато (sal)



5 Una mezcla de 1-metiletil 2-metil-2-{4-[[{4'-(trifluorometil)oxi}-4-bifenil-il]metil]amino}-1-piperidinil] propanoato (Int. B5) (80 mg, 1 equiv), ácido [2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il]acético (Int. D1) (67mg, 1 equiv), HATU (400mg, 5 equiv), DIPEA (0.22ml, 1.5 equiv) y DMF (2.0ml) se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. La mezcla de reacción en bruto se aplicó directamente a HPLC de fase reversa (Método Preparativo A) para obtener 1-metiletil 2-{4-[[{2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il]acetil}]{4'-(trifluorometil) oxi}-4-bifenil-il]metil]amino}-1-piperidinil}-2-metilpropanoato (25mg).

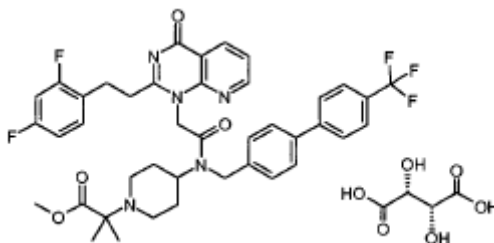
10 LCMS Rt = 2.952 minutos; m/z [M+H]⁺ = 806.4

15 RMN ¹H (DMSO-d₆) δ1.09-1.25 (12H, m), 1.47-1.91 (4H, m), 2.05-2.20 (1H, m), 2.21-2.38 (1H, m), 2.87-3.07 (3H, m), 3.08-3.22 (3H, m), 3.95/4.17 (1H, 2x br m), 4.59 (1H, s), 4.75-4.97 (2H, m), 5.38/5.68 (2H, 2x s), 7.90-7.21 (1H, m), 7.21-7.36 (3H, m), 7.42-7.55 (3H, m), 7.55-7.64 (2H, m), 7.66-7.77 (2H, m), 7.77-7.85 (1H, m), 8.43-8.52 (1H, m), 8.86-8.95 (1H, m)

Este se convirtió en la sal de bitartrato por un método análogo al descrito para el Ejemplo de Metodología de Síntesis (II).

20 *Ejemplo de Metodología de síntesis (IV) -16*

Metil 2-[4-([2-[2-(2,4-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il]acetil){[4'-(trifluorometil)-4-bifenil-il]metil]amino}-1-piperidinil]-2-metilpropanoato 2,3-dihidroxiбутanodioato (sal)



25

30 Una mezcla del ácido [2-[2-(2,4-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,4-d]pirimidin-1(4H)-il]acético (Int. D2) (100mg, 1 equiv), metil 2-metil-2-[4-([4'-(trifluorometil)-4-bifenil-il]metil]amino)-1-piperidinil]propanoato (Int. B1) (130mg, 1.03 equiv), DIPEA (0.16ml, 3 equiv), acetonitrilo (2ml) y HATU (130mg, 1.2 equiv) se agitó a temperatura ambiente durante 1 h, a continuación se evaporó y se redisolvió en acetonitrilo. La purificación por HPLC de fase reversa (Método Preparativo B) produjo el metil 2-[4-([2-[2-(2,4-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il]acetil){[4'-(trifluorometil)-4-bifenil-il]metil]amino}-1-piperidinil]-2-metilpropanoato (145mg).

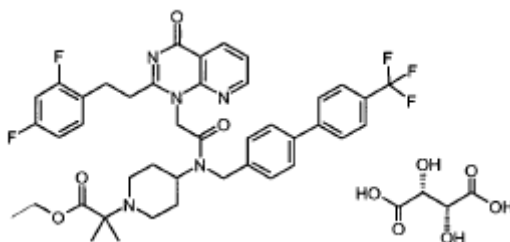
35 LCMS Rt = 2.716 minutos; m/z [M+H]⁺ = 762.3

RMN ¹H (CDCl₃) δ1.27 (3H, s), 1.33 (3H, s), 1.69-1.98 (4H, m), 2.22-2.29 (1H, m), 2.36-2.43 (1H, m), 2.96-3.08 (3H, m), 3.13-3.24 (3H, m), 3.69-3.72 (3H, m), 4.04/4.41 (1H, 2x br m), 4.72 (1H, s), 4.91 (1H, s), 5.41/5.73 (2H, 2x s), 6.84-6.97 (2H, m), 7.34-7.44 (2H, m), 7.54-7.63 (3H, m), 7.69-7.83 (5H, m), 8.55-8.60 (1H, m), 8.86-8.91 (1H, m).

40 Este se convirtió en la sal de bitartrato por un método análogo al descrito para el Ejemplo de Metodología de Síntesis (II).

Ejemplo Metodología de Síntesis (IV)-17

45 Etil 2-[4-([2-[2-(2,4-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il]acetil) {4'-(trifluorometil)-4-bifenil-il] metil]amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato 2,3-dihidroxiбутanodioato (sal)



5 Una mezcla del ácido [2-[2-(2,4-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,4-d]pirimidin-1(4H)-il]acético (Int. D2) (120mg, 1 equiv), etil 2-metil-2-[4-((4'-(trifluorometil)-4-bifenil-il)metil)amino]-1-piperidinil]propanoato (Int. B2) (198mg, 1.3 equiv), DMF (1.4ml) y DIPEA (0.178ml, 3 equiv) se agitó a temperatura ambiente durante 1.5 h, a continuación se adicionó con agitación vigorosa HATU (200 mg, 1.5 equiv) y la agitación continuó durante 1.5 h. A continuación, se adicionó una porción adicional del Intermedio D2 (12 mg, 0.1 equiv), se continuó la agitación durante 2 días. HPLC de fase reversa (Método Preparativo B) produjo el etil 2-[4-((2-[2-(2,4-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il]acetil) {4'-(trifluorometil)-4-bifenil-il]metil) amino]-1-piperidinil]-2-metilpropanoato como un sólido de color blanco (170mg).

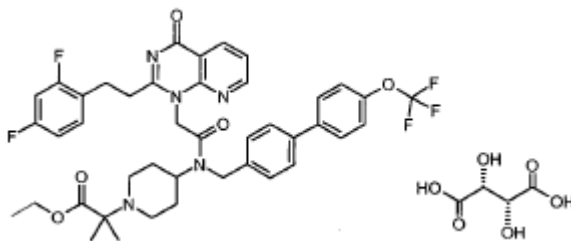
10 LCMS Rt = 2.827 minutos; m/z [M+H]⁺ = 776.3

RMN ¹H (CDCl₃) picos característicos: δ 1.14-1.43 (9H, m), 1.57-2.05 (4H, m), 2.10-2.46 (2H, m), 2.84-3.11 (3H, m), 3.12-3.34 (3H, m), 3.65/3.85 (1H, m), 4.06-4.27 (2H, m), 4.65/4.85 (2H, s), 5.15/5.45 (2H, s), 6.62-6.89 (2H, m), 7.18-7.34 (1H, m), 7.37-7.82 (9H, m), 8.59-8.77 (2H, m).

15 Este se convirtió en la sal de bitartrato por un método análogo al descrito para el Ejemplo de Metodología de Síntesis (II).

Ejemplo Metodología de Síntesis (IV)-18

20 Etil 2-[4-((2-[2-(2,4-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il]acetil){4'-[(trifluorometil)oxi]-4-bifenil-il]metil)amino]-1-piperidinil]-2-metilpropanoato 2,3-dihidroxiutanodioato (sal)



25 Una mezcla del ácido [2-[2-(2,4-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,4-d]pirimidin-1(4H)-il]acético (Int. D2) (114mg, 1.1 equiv), etil 2-metil-2-[4-((4'-[(trifluorometil)oxi]-4-bifenil-il)metil)amino]-1-piperidinil]propanoato (Int. B4) (139mg, 1 equiv), DMF (1.2ml) y DIPEA (0.16ml, 3 equiv) se agitó a la temperatura ambiente, a continuación se adicionó con agitación vigorosa HATU (176 mg, 1.5 equiv) y la agitación continuó durante 2 h. HPLC de fase reversa (Método preparativo B) produjo el etil 2-[4-((2-[2-(2,4-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il]acetil){4'-[(trifluorometil)oxi]-4-bifenil-il]metil) amino]-1-piperidinil]-2-metilpropanoato como un sólido de color blanco (149mg).

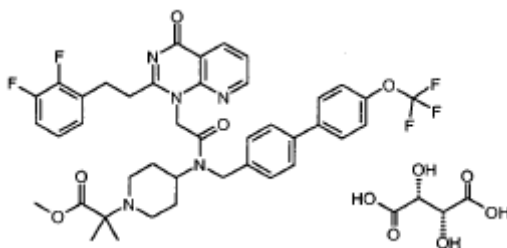
30 LCMS Rt = 2.801 minutos; m/z [M+H]⁺ = 792.3

35 RMN ¹H (CDCl₃) δ 1.18-1.40 (9H, m), 1.61-2.02 (4H, m), 2.20-2.44 (2H, m), 2.83-3.35 (6H, br m), 3.79/4.57 (1H, 2x br m), 4.07-4.27 (2H, m), 4.68/4.81 (2H, 2x s), 5.14/5.46 (2H, 2x br m), 6.62-6.90 (2H, 2x m), 7.18-7.63 (10H, m), 8.59-8.75 (2H, m).

40 Este se convirtió en la sal de bitartrato por un método análogo al descrito para el Ejemplo de Metodología de Síntesis (II).

Ejemplo Metodología de Síntesis (IV)-19

45 1-Metiletil 2-[4-((2-[2-(2,4-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il]acetil) {4'-[(trifluorometil)-4-bifenil-il]metil)amino]-1-piperidinil]-2-metilpropanoato 2,3-dihidroxiutanodioato (sal)



Una mezcla de metil 2-metil-2-{4-[[{4'-(trifluorometil)oxi}-4-bifenil-il]metil]amino]-1 piperidinil}propanoato (Int. B6) (145 mg, 1 equiv), ácido [2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il]acético (Int. D1) (122 mg, 1 equiv), DIPEA (0.084ml, 1.5 equiv) y DMF (2.0ml) se agitó a temperatura ambiente, durante 5min. El HATU (160 mg, 1.3 equiv) se adicionó en 1 porción y se agitó un 1 hora adicional, en atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción en bruto se aplicó directamente a HPLC de fase reversa (Método Preparativo A), para obtener el metil 2-{4-[[{2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il]acetil}]{4'-(trifluorometil)oxi}-4-bifenil-il]metil]amino]-1-piperidinil}-2-metilpropanoato (116 mg).

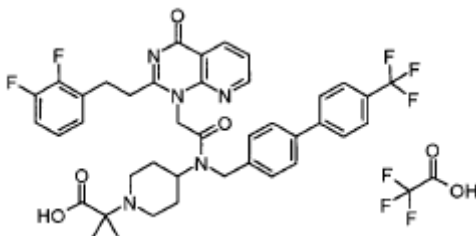
LCMS Rt = 2.721 minutos; m/z [M+H]⁺ = 778.3

RMN ¹H (CDCl₃) picos característicos: δ 1.53-1.62 (6H, m), 3.46-5.99 (22H, m), 7.01-7.21 (3H, m), 7.30-7.43 (3H, m), 7.50-7.78 (6H, m), 8.54-8.60 (1H, m), 8.86-8.94 (1H, m).

Este se convirtió en la sal de bitartrato por un método análogo al descrito para el Ejemplo de Metodología de Síntesis (II).

Ejemplos de Metodología de Síntesis (IV)-22

2-[4-[[{2-[2-(2,3-Difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il]acetil}]{4'-(trifluorometil)-4-bifenil-il] metil} amino]-1-piperidinil]-2-metilpropanoic ácido trifluoroacetato



Una mezcla de 1,1-dimetiletil 2-metil-2-[4-[[{4'-(trifluorometil)-4-bifenil-il]metil]amino]-1-piperidinil] propanoato (Int. B7) (150 mg, 1 equiv), ácido [2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il]acético (Int. D1) (130 mg, 1.2 equiv), DIPEA (0.164 ml, 3 equiv) y DMF (1.0 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 5 min. Se adicionó en 1 porción HATU (180 mg, 1,5 equiv) y se agitó otros 5 min. La mezcla de reacción en bruto se concentró, se filtró a través de un tapón de sílica eluido con acetona y se evaporó para obtener el 1,1-dimetiletil 2-[4-[[{2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il]acetil}]{4'-(trifluorometil)-4-bifenil-il] metil} amino]-1-piperidinil]-2-metilpropanoato en bruto.

LCMS Rt = 2.823 minutos; m/z [M+H]⁺ = 804.4

Este intermedio, sin aislamiento, se disolvió en una mezcla 1:1 de TFA y DCM y se agitó a RT durante 4 h. La evaporación y la HPLC preparativa (Método A) dieron el deseado trifluoroacetato del ácido 2-[4-[[{2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il]acetil}]{4'-(trifluorometil)-4-bifenil-il]metil]amino]-1-piperidinil]-2-metilpropanoico (70mg).

LCMS Rt = 2.554 minutos; m/z [M+H]⁺ = 748.2

RMN ¹H (d₆-DMSO) δ 1.44 (3H, s), 1.51 (3H, s), 1.70-2.30 (4H, m), 2.41-2.56 (2H, m), 2.94-3.54 (6H, m), 4.44-4.95 (3H, m), 5.42/5.76 (2H, 2x br s), 7.07-7.38 (4H, m), 7.54-7.75 (3H, m), 7.76-7.99 (5H, m), 8.42-8.54 (1H, m), 8.85-8.98 (1H, m).

Otras sales se pueden preparar por medios convencionales. La base libre se puede preparar también por medios convencionales.

En algunas realizaciones, los compuestos útiles como inhibidores de Lp-PLA₂ útiles en los métodos que se describen en el presente documento son:

5 1-(N-(2-(dietilamino)etil)-N-(4-(4-trifluorometilfenil)encil)-aminocarbonilmetil)-2-(4-fluorobencil)tio-5,6-trimetilenopirimidin-4-ona, también conocida como "SB480848" o el nombre USAN "darapladib", que es un compuesto basado en pirimidinona y un inhibidor reversible de la Lp-PLA₂ y se utiliza en los ejemplos en el presente documento,

10 N-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4,5,6,7-tetrahidrociclopentapirimidin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

15 N-(1-(2-Metoxietil)piperidin-4-il)-2-[2-(2,3-difluorobenciltio)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida; y

20 metil 2-[4-({[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il]acetil} {[4'-(trifluorometil)-4-bifenil-il]metil} amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato.

25 Las sales farmacéuticamente aceptables de 1-(N-(2-(dietilamino)etil)-N-(4-(4-trifluorometilfenil)encil)-aminocarbonilmetil)-2-(4-fluorobencil)tio-5,6-trimetilenopirimidin-4-ona, AKA SB480848, y usado en los Ejemplos en este documento; N-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4,5,6,7-tetrahidrociclopentapirimidin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida; N-(1-(2-Metoxietil)piperidin-4-il)-2-[2-(2,3-difluorobenciltio)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida; y metil 2-[4-({[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)acetil} {[4'-(trifluorometil)-4-bifenil-il]metil}amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato, también son útiles como inhibidores de Lp-PLA₂ para uso en los métodos, según se describe en este documento.

30 *Inhibidores del ácido nucleico de Lp-PLA₂*

35 Los agentes que inhiben la Lp-PLA₂ pueden ser ácidos nucleicos. Los inhibidores de ácido nucleico de Lp-PLA₂ pueden ser, por ejemplo, moléculas que inducen la interferencia de ARN, por ejemplo, pero no se limitan a ARNip, ARNds, ARNst, ARNsh y versiones modificadas de los mismos, donde la molécula de interferencia de ARN silencia la expresión génica de Lp-PLA₂. El inhibidor del ácido nucleico de Lp-PLA₂ puede ser un ácido oligonucleico anti-sentido, o un análogo de ácido nucleico, por ejemplo, pero no se limitan a ADN, ARN, ácido peptidonucleico (PNA), pseudo-PNA complementario (pcPNA), o ácido nucleico bloqueado (LNA) y similares. El ácido nucleico puede ser ADN o ARN, y análogos de ácidos nucleicos, por ejemplo PNA, pcPNA y LNA. Un ácido nucleico puede ser monocatenario o bicatenario, y se puede seleccionar de un grupo que comprende ácido nucleico que codifica una proteína de interés, oligonucleótidos, PNA, etc. Tales secuencias de ácidos nucleicos incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a, secuencia de ácido nucleico que codifica proteínas que actúan como represores de la transcripción, moléculas antisentido, ribozimas, secuencias de ácido nucleico inhibidoras pequeñas, por ejemplo, pero no se limitan a ARNi, ARNish, ARNip, ARNi micro (mARNi), oligonucleótidos antisentido etc.

40 ARN monocatenario (ARNss), una forma de ARN encontrada endógenamente en las células eucarióticas, se puede utilizar para formar una molécula de ARNi. Moléculas de ARNss celular incluyen ARN mensajeros (y los ARN progenitor pre-mensajeros), ARN nucleares pequeños, ARNs nucleolares pequeños, ARN de transferencia y ARN ribosomal. ARN de doble cadena (ARNds) induce una respuesta inmune dependiente del tamaño tal que el ARNds más grande de 30 pb activa la respuesta del interferón, mientras que ARNds más cortos contribuyen a la maquinaria de interferencia de ARN endógena de la célula en dirección 3' de la enzima Dicer.

45 La Lp-PLA₂ se puede reducir mediante la inhibición de la expresión de polipéptido de Lp-PLA₂ o por métodos de "silenciamiento génico" comúnmente conocidos por personas de experiencia normal en la técnica.

50 La interferencia por ARN (ARNi) provee un enfoque poderoso para la inhibición de la expresión de polipéptidos diana seleccionados. ARNi utiliza ARN interferente pequeño (ARNip) dúplex que se dirige al ARN mensajero que codifica el polipéptido diana para la degradación selectiva. El silenciamiento post-transcripcional dependiente de ARNip de la expresión génica implica el corte de la molécula de ARN mensajero diana en un sitio guiado por el ARNip.

55 La interferencia por ARN (ARNi) es un proceso conservado evolutivamente mediante el cual la expresión o la introducción de ARN de una secuencia que es idéntica o muy similar a un gen diana resulta en la degradación específica de secuencia o silenciamiento génico post-transcripcional específico (PTGS) de ARN mensajero (ARNm) transcrito a partir de ese gen dirigido (véase Coburn, G. and Cullen, B. (2002) *J. of Virology* 76(18):9225), inhibiendo de este modo la expresión del gen diana. El ARN puede ser ARN de doble cadena (ARNds). Este proceso ha sido descrito en las células vegetales, invertebrados, y de mamíferos. En la naturaleza, ARNi se inicia por la endonucleasa Dicer específica del ARNds, que promueve la escisión progresiva de ARNds largos en fragmentos de doble cadena denominados ARNip. Los ARNip se incorporan en un complejo de la proteína (denominado "complejo de silenciamiento inducido por ARN," o "RISC") que reconoce y escinde los ARNm diana. ARNi también se puede iniciar mediante la introducción de moléculas de ácido nucleico, por ejemplo, ARNip sintéticos o agentes de interferencia de ARN, para inhibir o silenciar la expresión de genes diana. Como se usa en este documento, la "inhibición de la expresión del gen

5 diana" incluye cualquier disminución en la expresión o actividad de la proteína o el nivel del gen diana o la proteína codificada por el gen diana en comparación con una situación en la que no se ha inducido interferencia de ARN. La disminución puede ser de al menos 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 99% o más en comparación con la expresión de un gen diana o la actividad o nivel de la proteína codificada por un gen diana que no ha sido dirigido por un agente de interferencia de ARN.

10 El "ARN interferente corto" (ARNip), también en este documento hace referencia a "ARN interferente pequeño" se define como un agente que funciona para inhibir la expresión de un gen diana, *por ejemplo*, por ARNi. Un ARNip se puede sintetizar químicamente, se puede producir mediante la transcripción *in vitro*, o se puede producir dentro de una célula huésped. El ARNip puede ser una molécula de ARN de doble cadena (ARNds) de aproximadamente 15 a aproximadamente 40 nucleótidos de longitud, preferiblemente de aproximadamente 15 a aproximadamente 28 nucleótidos, más preferiblemente de aproximadamente 19 a aproximadamente 25 nucleótidos de longitud, y más preferiblemente aproximadamente 19, 20, 21, 22, o 23 nucleótidos de longitud, y puede contener una proyección 3' y/o 5' en cada cadena que tiene una longitud de aproximadamente 0, 1, 2, 3, 4, o 5 nucleótidos. La longitud de la proyección es independiente entre las dos cadenas, i.e. la longitud de la proyección en una cadena no es dependiente de la longitud de la proyección de la segunda cadena. Preferiblemente, el ARNip es capaz de promover la interferencia de ARN a través de la degradación o el silenciamiento génico post-transcripcional específico (PTGS) del ARN mensajero (ARNm) diana.

20 El ARNip también incluye ARN de pequeña horquilla (también llamado tallo bucle) (ARNsh). Estos ARNsh pueden estar compuestos de una cadena antisentido corta (*por ejemplo*, aproximadamente 19 a aproximadamente 25 nucleótidos), seguido por un bucle de nucleótidos de aproximadamente 5 a aproximadamente 9 nucleótidos, y la cadena sentido análoga. Alternativamente, la cadena sentido puede preceder a la estructura de bucle de nucleótidos y la cadena antisentido puede seguir. Estos ARNsh pueden estar contenidos en plásmidos, retrovirus, y lentivirus y expresan a partir de, por ejemplo, el promotor pol III U6, u otro promotor (véase, *por ejemplo*, Stewart, et al (2003) ARN Apr; 9 (4):. 493 - 501).

30 El gen diana o la secuencia del agente de interferencia de ARN puede ser un gen celular o secuencia genómica, por ejemplo, la secuencia de Lp-PLA₂. Un ARNip puede ser sustancialmente homólogo al gen diana o la secuencia genómica, o un fragmento del mismo. Como se usa en este contexto, el término "homólogo" se define como sustancialmente idéntico, suficientemente complementario, o similar al ARNm diana, o un fragmento del mismo, para efectuar la interferencia del ARN de la diana. Además para las moléculas de ARN nativas, el ARN apropiado para inhibir o interferir con la expresión de una secuencia diana incluyen derivados y análogos de ARN. Preferiblemente, el ARNip es idéntico a su objetivo.

35 El ARNip preferiblemente dirige solo una secuencia. Cada uno de los agentes de interferencia por ARN, tales como ARNip, puede ser seleccionado por los posibles efectos inespecíficos, por ejemplo, de perfiles de expresión. Tales métodos son conocidos por un experto en la técnica y se describen, por ejemplo, en Jackson et al, *Nature Biotechnology* 6: 635-637, 2003. Además de perfiles de expresión, también se puede seleccionar a los potenciales secuencias diana para las secuencias similares en las bases de datos de secuencias para identificar posibles secuencias que pueden tener efectos inespecíficos. Por ejemplo, de acuerdo con Jackson et al. (Id.) 15, o quizás tan sólo 11 nucleótidos contiguos de identidad de secuencia son suficientes para el silenciamiento directo de las transcripciones no dirigidas. Por lo tanto, se pueden seleccionar inicialmente los ARNip propuestos para evitar el silenciamiento potencial inespecífico, mediante el análisis de identidad de secuencia por cualquiera de los métodos de comparación conocidos de secuencias, tales como BLAST.

40 Las moléculas de ARNip no necesitan limitarse a aquellas moléculas que contienen sólo ARN, sino, por ejemplo, abarcar además nucleótidos modificados químicamente y no nucleótidos, y también incluyen moléculas en donde una molécula de azúcar ribosa es sustituida por otra molécula de azúcar o una molécula que realiza una función similar. Por otra parte, se puede utilizar un enlace no natural entre los residuos de nucleótidos, tal como un enlace fosforotioato. Por ejemplo, un ARNip que contiene estructuras D-arabinofuranosil en lugar de los D-ribonucleósidos de origen natural que se encuentran en el ARN, pueden ser utilizados en moléculas de ARNi (US Pat. No. 5,177,196). Otros ejemplos incluyen las moléculas de ARN que contienen el o-enlace entre el azúcar y la base heterocíclica del nucleósido, que confiere resistencia a las nucleasas y ajusta el enlace de la cadena complementaria con las moléculas de oligonucleótidos similares a los oligonucleótidos que contienen 2'-O-metil ribosa, arabinosa y en particular D-arabinosa (US Pat. No. 5,177,196).

50 La cadena de ARN puede ser derivatizada con un grupo funcional reactivo de un grupo indicador, tal como un fluoróforo. Los derivados útiles particularmente se modifican en un extremo o extremos de una cadena de ARN, por lo general el terminal 3' de la cadena sentido. Por ejemplo, el de 2'-hidroxilo en el extremo 3' se puede derivatizar fácil y selectivamente con una variedad de grupos.

60 Otros derivados de ARN útiles incorporan nucleótidos que tienen fracciones de hidratos de carbono modificados, tales como residuos 2'-O-alquilados o derivados 2'-O-metil ribosilo y derivados 2'-O-fluoro ribosilo. Las bases de ARN también se pueden modificar. Se puede utilizar cualquier base modificada útil para inhibir o interferir con la expresión de una

secuencia diana. Por ejemplo, bases halogenadas, tales como 5-bromouracilo y 5-yodouracilo se pueden incorporar. Las bases también pueden ser alquiladas, por ejemplo, 7-metilguanosina puede ser incorporado en lugar de un residuo de guanosina. También se pueden incorporar, bases no naturales que producen la inhibición exitosa.

5 Las modificaciones de ARNip más preferidas incluyen a 2'-desoxi-2'-fluorouridina o nucleótidos del ácido nucleico bloqueado (LNA) y dúplex de ARN que contienen ya sea fosfodiéster o un número variable de enlaces fosforotioato. Tales modificaciones son conocidas por un experto en la técnica y se describen, por ejemplo, en Braasch et al., Biochemistry, 42: 7967-7975, 2003. La mayoría de las modificaciones útiles a las moléculas de ARNip se puede introducir usando químicas establecidas para la tecnología de oligonucleótidos antisentido. Preferiblemente, las modificaciones implican una modificación mínima de 2'-O-metilo, excluyendo preferiblemente tal modificación. Las modificaciones también excluyen preferentemente las modificaciones de los grupos 5'-hidroxilo libres del ARNip.

15 Las moléculas de ARNip y ARNmi que tienen diversas "colas" unidas covalentemente a cualquiera de sus extremos 3' o 5', o a ambos, también son conocidas en la técnica y se pueden utilizar para estabilizar las moléculas de ARNip y ARNmi entregadas utilizando los métodos descritos en el presente documento. En términos generales, grupos intercalantes, varios tipos de grupos indicadores y grupos lipófilos unidos a los extremos 3' o 5' de las moléculas de ARN son bien conocidos por un experto en la técnica y son útiles de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento. Descripciones de síntesis de oligonucleótidos modificados 3'-colesterol o 3'-acridina aplicables a la preparación de moléculas de ARN modificadas útiles de acuerdo con los métodos descritos se pueden encontrar, por ejemplo, en los artículos: Gamper, H. B., Reed, M. W., Cox, T., Viroscio, J. S., Adams, A. D., Gall, A., Scholler, J. K., and Meyer, R. B. (1993) Facile Preparation and Exonuclease Stability of 3'-Modified Oligodeoxynucleotides. Nucleic Acids Res. 21 145-150; and Reed, M. W., Adams, A. D., Nelson, J. S., and Meyer, R. B., Jr. (1991) Acridine and Cholesterol-Derivatized Solid Supports for Improved Synthesis of 3'-Modified Oligonucleotides. Bioconjugate Chem. 2 217-225 (1993).

25 Otros ARNip útiles para dirigir la expresión de Lp-PLA₂ se pueden diseñar y probar fácilmente. En consecuencia, el ARNip útil para los métodos descritos en este documento incluye moléculas de ARNip de aproximadamente 15 a aproximadamente 40 o aproximadamente 15 a aproximadamente 28 nucleótidos de longitud, que son homólogos a un gen de Lp-PLA₂. Preferiblemente, las moléculas de ARNip dirigido de Lp-PLA₂ tienen una longitud de aproximadamente 19 a aproximadamente 25 nucleótidos. Más preferiblemente, las moléculas de ARNip dirigido de Lp-PLA₂ tienen una longitud de aproximadamente 19, 20, 21, o 22 nucleótidos. Las moléculas de ARNip dirigido de Lp-PLA₂ también pueden comprender un grupo 3' hidroxilo. Las moléculas de ARNip dirigido de Lp-PLA₂ pueden ser monocatenarias o bicatenarias; tales moléculas pueden ser romos o comprender extremos sobresalientes (*por ejemplo*, 5', 3'). La molécula de ARN puede ser de doble cadena y ya sea de extremos romos o comprender extremos sobresalientes.

35 Al menos una cadena de la molécula de ARN dirigida a Lp-PLA₂ puede tener una proyección 3' de aproximadamente 0 a aproximadamente 6 nucleótidos (por ejemplo, los nucleótidos de pirimidina, nucleótidos de purina) de longitud. La proyección 3' puede ser de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 nucleótidos, de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 nucleótidos y de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 nucleótidos de longitud. La molécula de ARN dirigida a Lp-PLA₂ puede ser de doble cadena - una cadena que tiene una proyección 3' y la otra cadena puede ser roma o tener una proyección. Cuando la molécula de ARN dirigida a Lp-PLA₂ es bicatenaria y ambas cadenas comprenden una proyección, la longitud de las proyecciones puede ser igual o diferente para cada cadena. El ARN puede comprender aproximadamente 19, 20, 21, o 22 nucleótidos que están emparejados y que tienen proyecciones de aproximadamente 1 a aproximadamente 3, particularmente de aproximadamente 2, nucleótidos en ambos extremos 3' del ARN. Las proyecciones 3' pueden ser estabilizadas contra la degradación. El ARN se puede estabilizar mediante la inclusión de nucleótidos de purina, tales como nucleótidos de adenosina o guanosina. Alternativamente, la sustitución de los nucleótidos de pirimidina por análogos modificados, *por ejemplo*, la sustitución de proyecciones en 3' del nucleótido uridina 2 por 2'-desoxitimidina es tolerada y no afecta a la eficiencia de ARNi. La ausencia de un 2' hidroxilo, mejora significativamente la resistencia a las nucleasas de la proyección en medio de cultivo tisular.

50 El ARNm de Lp-PLA₂ se ha dirigido con éxito utilizando ARNip y tal ARNip o vectores para la preparación de ellos están disponibles comercialmente, por ejemplo de Invitrogen. La evaluación de la expresión y/o modificación genética de proteína Lp-PLA₂ usando tal ARNip de Lp-PLA₂ se puede determinar usando kits disponibles comercialmente, por ejemplo, pero no se limitan al ensayo PLAC de diaDexus. Otros se pueden preparar fácilmente por los expertos en la técnica basándose en la secuencia conocida del ARNm diana. Para evitar dudas, se provee la secuencia de un ADNc de Lp-PLA₂ humano en, por ejemplo, Nos. de Acceso GenBank: U20157 (SEQ ID NO:1) o NM_005084 (SEQ ID NO:2). La secuencia en U20157 es la siguiente (SEQ ID NO: 1):

```

1 gctggtcggg ggctcgcagt gctgctggcg agaagcagtc gggtttgag cgcttgggtc
61 gcgttggtgc gcggtggaac ggcgccaggg accccagttc ccgcgagcag ctccgcgcog
121 cgctgagag actaagctga aactgctgct cagctcccaa gatggtgcca cccaaattgc
181 atgtgctttt ctgcctctgc ggctgcctgg ctgtgggtta tccttttgac tggcaataca
241 taaatcctgt tgcccatatg aaatcatcag catgggtcaa caaaatacaa gtactgatgg
301 ctgctgcaag ctttggccaa actaaaatcc cccggggaaa tgggccttat tccgttggtt
361 gtacagactt aatgtttgat cacactaata agggcacctt cttgcgttta tattatccat
421 cccaagataa tgatgcctt gacaccctt ggatcccaa taagaatat tttggggtc
481 ttagcaaat tttggaaca cactggctta tgggcaacat tttgaggtta ctctttggtt
541 caatgacaac tcctgcaaac tggattccc ctctgaggcc tggtgaaaa tatccacttg
601 ttgttttttc tcatggtctt ggggcattca ggacactta ttctgtatt gccattgacc
661 tggcatctca tgggtttata gttgctgctg tagaacacag agatagatct gcactctgca
721 cttactattt caaggaccaa tctgctgcag aaatagggga caagtcttg gatcacctta
781 gaaccctgaa acaagaggag gagacacata tacgaaatga gcaggtacgg caaagagcaa
841 aagaatgttc ccaagctctc agtctgattc ttgacattga tcatggaaag ccagtgaaga
901 atgcattaga tttaaagttt gatatggaac aactgaagga ctctattgat agggaaaaaa
961 tagcagtaat tggacattct tttggtggag caacggttat tcagactctt agtgaagatc
1021 agagattcag atgtggtatt gccctggatg catggatgtt tccactgggt gatgaagtat
1081 attcagaagt tcctcagccc ctctttttta tcaactctga atatttccaa tatcctgcta
1141 atatcataaa aatgaaaaaa tgctactcac ctgataaaga aagaaagatg attacaatca
1201 ggggttcagt ccaccagaat tttgctgact tcacttttgc aactggcaaa ataattggac
1261 acatgctcaa attaaagga gacatagatt caaatgtagc tattgatctt agcaacaaag
1321 cttcattagc attcttaca aagcatttag gacttcataa agattttgat cagtgggact
1381 gcttgattga aggagatgat gagaatctta ttccaggac caacattaac acaaccaatc
1441 aacacatcat gttacagaac tcttcaggaa tagagaaata caattaggat taaaatagtt
1501 ttttt

```

- 5 Las secuencias de ARNip se eligen para maximizar la absorción de la cadena antisentido (guía) del ARNip en RISC y con ello maximizar la capacidad de RISC para dirigir el ARNm de Lp-PLA₂ humano para su degradación. Esto se puede lograr por la exploración de secuencias que tienen la menor energía libre de enlace en el extremo 5' de la cadena antisentido. La menor energía libre conduce a una mejora para desenrollar el extremo 5' de la cadena antisentido del ARNip dúplex, asegurando así que la cadena antisentido será absorbida por RISC y dirigirá la escisión específica de la secuencia del ARNm de Lp-PLA₂ humana.
- 10 El ARNip o ARNip modificado puede ser entregado en un portador farmacéuticamente aceptable. Los agentes portadores adicionales, tales como liposomas, se pueden adicionar al portador farmacéuticamente aceptable.
- 15 El ARNip se puede entregar mediante la entrega de un vector que codifica el ARN de horquilla pequeña (ARNsh) en un portador farmacéuticamente aceptable para las células en un órgano de un individuo. El ARNsh se convierte por las células después de la transcripción en ARNip capaz de dirigir, por ejemplo, Lp-PLA₂. El vector puede ser un vector regulable, tal como vector inducible de la tetraciclina.
- 20 Los agentes de interferencia por ARN utilizados en los métodos descritos en el presente documento se toman activamente por células *in vivo* después de la inyección intravenosa, por ejemplo, inyección hidrodinámica, sin el uso de un vector, que ilustra la entrega *in vivo* eficiente de los agentes de interferencia por ARN.
- 25 También se pueden emplear, otras estrategias para la entrega de los agentes de interferencia por ARN, por ejemplo, los ARNip o ARNsh, tales como, por ejemplo, la entrega por un vector, por ejemplo, un vector plásmido o viral, *por ejemplo*, un vector lentiviral. Tales vectores pueden ser utilizados según se describe, por ejemplo, en Xiao-Feng Qin et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100: 183-188. Otros métodos de entrega incluyen la entrega de los agentes de interferencia por ARN, *por ejemplo*, los ARNip o ARNsh, utilizando un péptido básico mediante la conjugación o mezclando el agente de interferencia por ARN con un péptido básico, *por ejemplo*, un fragmento de un péptido TAT, la mezcla con lípidos catiónicos o la formulación en partículas.
- 30 Como se ha señalado, el ARNs, tales como ARNip o ARNsh se puede entregar utilizando un vector inducible, tal como un vector inducible de tetraciclina. Se puede utilizar, los métodos descritos, por ejemplo, en Wang et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100: 5.103 a 5.106, usando vectores pTet-On (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA). Un vector puede ser un vector plásmido, un vector viral, o cualquier otro vehículo apropiado adaptado para la inserción y la secuencia foránea y para la introducción en las células eucariotas. El vector puede ser un vector de expresión capaz de dirigir la
- 35 transcripción de la secuencia de ADN de moléculas de ácido nucleico agonista o antagonista en el ARN. Los vectores de expresión virales se pueden seleccionar de un grupo que comprende, por ejemplo, retrovirus, lentivirus, vectores del virus de Epstein Barr, virus del papiloma bovino, vectores basados en adenovirus y adeno-asociados o virus híbridos o cualquiera de los anteriores. El vector puede ser episomal. El uso de un vector episomal apropiado provee un medio de mantener la molécula de ácido nucleico antagonista en el sujeto en alto número de copias de ADN extracromosómico,
- 40 eliminando así los efectos potenciales de la integración cromosómica.

Las moléculas de interferencia de ARN y los inhibidores de ácidos nucleicos útiles en los métodos según se describe en el presente documento se pueden producir usando cualquiera de las técnicas conocidas tales como la síntesis química directa, a través del procesamiento de ARN de doble cadena más larga, mediante la exposición a la proteína Dicer recombinante o lisados de embriones de *Drosophila*, a través de una sistema *in vitro* derivado de células S2, utilizando la polimerasa fago de ARN, la polimerasa de ARN dependiente de ARN, y vectores basados en ADN. El uso de lisados de células o el procesamiento *in vitro* puede implicar aún más el posterior aislamiento de la corta, por ejemplo, aproximadamente 21-23 nucleótidos, ARNip a partir del lisado, etc. La síntesis química generalmente procede haciendo dos oligómeros de ARN de cadena sencilla, seguido por la hibridación de los dos oligómeros monocatenarios en un ARN de doble cadena. Otros ejemplos incluyen los métodos revelados en el documento WO 99/32619 y WO 01/68836 que enseñan la síntesis química y enzimática de ARNip. Por otra parte, numerosos servicios comerciales están disponibles para el diseño y la fabricación de ARNip específicos (véase, por ejemplo, QIAGEN Inc., Valencia, CA y AMBION Inc., Austin, TX).

El agente puede ser proteína o polipéptido o agente de ARNi que inhibe la expresión de Lp-PLA₂ y/o actividad de la proteína Lp-PLA₂. En este caso las células se pueden modificar (por ejemplo, por recombinación homóloga) para proveer una mayor expresión de dicho agente, por ejemplo mediante la sustitución, en su totalidad o en parte, el promotor de origen natural con todo o parte de un promotor heterólogo de manera que las células expresen el agente inhibidor natural de la Lp-PLA₂, por ejemplo proteína o inhibidor de ARNmi de Lp-PLA₂ en los niveles superiores. El promotor heterólogo se inserta de tal manera que está unido operativamente al ácido nucleico deseado que codifica el agente. Véase, por ejemplo, la Publicación Internacional PCT No. WO 94/12650 por Transkaryotic Therapies, Inc., Publicación Internacional PCT No. WO 92/20808 por Cell Genesys, Inc., y Publicación Internacional PCT No. WO 91/09955 por Applied Research Systems. Las células también se pueden modificar por ingeniería genética para expresar un gen endógeno que comprende el agente bajo el control de elementos reguladores inducibles, en cuyo caso las secuencias reguladoras del gen endógeno se pueden reemplazar por recombinación homóloga. Las técnicas de activación de genes se describen en la Patente de EE.UU. No. 5,272,071 para Chappel; La patente de EE.UU. No. 5,578,461 para Sherwin et al.; PCT/US92/09627 (WO93/09222) por Selden et al.; y PCT/US90/06436 (WO91/06667) por Skoultchi et al. El agente se puede preparar mediante el cultivo de células huésped transformadas bajo condiciones de cultivo apropiadas para expresar los genes ARNmi. A continuación, el agente expresado resultante se puede purificar a partir de tal cultivo (i.e. de medio de cultivo o extractos celulares) usando procesos de purificación conocidos, tales como filtración en gel y cromatografía de intercambio iónico. La purificación del péptido o agente de ácido nucleico inhibidor de Lp-PLA₂ también puede incluir una columna de afinidad que contiene agentes que se unirán a la proteína; una o más etapas de columna sobre tales resinas de afinidad como concanavalina A-agarosa, heparina-Toyopearl™ o Cibacrom azul 3GA Sepharose; una o más las etapas que implican la cromatografía de interacción hidrofóbica utilizando tales resinas como fenil éter, butil éter, o propil éter; cromatografía de inmunoafinidad, o cromatografía de afinidad ADNc complementaria.

Los inhibidores de ácido nucleico de Lp-PLA₂ se pueden obtener sintéticamente, por ejemplo, sintetizando químicamente un ácido nucleico por cualquier método de síntesis conocido por el experto en la materia. A continuación, los inhibidores de ácido nucleico sintetizado de Lp-PLA₂ entonces se pueden purificar por cualquier método conocido en la técnica. Los métodos para la síntesis química de los ácidos nucleicos incluyen, pero no se limitan a la síntesis química, *in vitro* usando química de fosfotriéster, fosfato o fosforamida y técnicas en fase sólida, o a través de intermedios de desoxinucleósido H-fosfonato (véase la Patente de EE.UU. No. 5,705,629 para Bhongle).

En algunas circunstancias, por ejemplo, cuando se desea una mayor estabilidad de la nucleasa, se puede preferir ácidos nucleicos que tienen análogos de ácidos nucleicos y/o enlaces internucleosídicos modificados. Los ácidos nucleicos que contienen enlaces internucleosídicos modificados también pueden ser sintetizados utilizando reactivos y métodos que son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, los métodos de síntesis de ácidos nucleicos que contienen enlaces internucleosídicos fosfonato fosforotioato, fosforoditioato, fosforamidato metoxietilo fosforamidato, formacetal, tioformacetal, diisopropilsilil, acetamidato, carbamato, dimetileno-sulfuro (-CH₂-S-CH₂), dimetileno-sulfóxido (-CH₂-SO-CH₂), dimetileno-sulfona (-CH₂-SO₂-CH₂), 2'-O-alkilo, y 2'-desoxi-2'-fluoro' fosforotioato son bien conocidos en la técnica (véase Uhlmann et al., 1990, Chem. Rev. 90:543-584; Schneider et al., 1990, Tetrahedron Lett. 31:335 y las referencias citadas en el mismo). Las Patentes de Estados Unidos Nos. 5,614,617 y 5,223,618 para Cook, et al., 5,714,606 para Acevedo, et al., 5,378,825 para Cook, et al., 5,672,697 y 5,466,786 para Buhr, et al., 5,777,092 to Cook, et al., 5,602,240 to De Mesmacker, et al., 5,610,289 to Cook, et al. y 5,858,988 to Wang, también describen análogos de ácidos nucleicos para una mayor estabilidad de la nucleasa y la absorción celular.

Las moléculas de ARNip sintético, incluyendo moléculas de ARNhc, se pueden obtener usando un número de técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la molécula de ARNip se puede sintetizar químicamente o producir de forma recombinante utilizando métodos conocidos en la técnica, tales como el uso de fosforamiditas de ribonucleósido apropiadamente protegidas y un sintetizador de ADN / ARN convencional (véase, por ejemplo, Elbashir, S.M. et al. (2001) *Nature* 411:494-498; Elbashir, S.M., W. Lendeckel and T. Tuschl (2001) *Genes & Development* 15:188-200; Harborth, J. et al. (2001) *J. Cell Science* 114:4557-4565; Masters, J.R. et al. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 98:8012-8017; y Tuschl, T. et al. (1999) *Genes & Development* 13:3191-3197). Alternativamente, varios proveedores de síntesis de ARN comerciales están disponibles, incluyendo, pero no limitando a, Proligo (Hamburg, Germany), Dharmacon Research (Lafayette, CO, USA), Pierce Chemical (parte de Perbio Science, Rockford, IL, USA),

Glen Research (Sterling, VA, USA), ChemGenes (Ashland, MA, USA), y Cruachem (Glasgow, UK). Tales como, las moléculas de ARNip no son demasiado difíciles de sintetizar y se proveen fácilmente en una calidad apropiada para ARNi. Además, los ARNs se puede expresar como estructuras de tallo bucle codificados por vectores plásmidos, retrovirus y lentivirus (Paddison, P.J. et al. (2002) *Genes Dev.* 16:948-958; McManus, M.T. et al. (2002) *ARN* 8:842-850; Paul, C.P. et al. (2002) *Nat. Biotechnol.* 20:505-508; Miyagishi, M. et al. (2002) *Nat. Biotechnol.* 20:497-500; Sui, G. et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 99:5515-5520; Brummelkamp, T. et al. (2002) *Cancer Cell* 2:243; Lee, N.S., et al. (2002) *Nat. Biotechnol.* 20:500-505; Yu, J.Y., et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 99:6047-6052; Zeng, Y., et al. (2002) *Mol. Cell* 9:1327-1333; Rubinson, D.A., et al. (2003) *Nat. Genet.* 33:401-406; Stewart, S.A., et al. (2003) *ARN* 9:493-501).. Estos vectores tienen generalmente un promotor *polIII* en dirección 5' del ARNs y pueden expresar las cadenas de ARN de sentido y antisentido por separado y/o como estructuras de horquilla. Dentro de las células, Dicer procesa el ARN de horquilla corta (ARNsh) en ARNip eficaz.

La región específica de la molécula de ARNip se puede seleccionar a partir de una secuencia de gen diana dada, por ejemplo, una secuencia de codificación de Lp-PLA₂, comenzando desde aproximadamente 25 a 50 nucleótidos, de aproximadamente 50 a 75 nucleótidos, o de aproximadamente 75 a 100 nucleótidos en dirección 3' del codón de inicio. Las secuencias de nucleótidos pueden contener 5' o 3' UTRs y regiones cerca del codón de inicio. Un método para diseñar una molécula de ARNip implica la identificación del motivo AA (N19) TT de la secuencia de 23 nucleótidos (donde N puede ser cualquier nucleótido), y que seleccionan los aciertos con al menos 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50 %, 55%, 60%, 65%, 70% o 75% de contenido G/C. La porción "TT" de la secuencia es opcional. Alternativamente, si no se encuentra tal secuencia, la búsqueda se puede ampliar usando el motivo NA (N21), donde N puede ser cualquier nucleótido. En esta situación, el extremo 3' del ARNip sentido se puede convertir a TT para permitir la generación de un dúplex simétrico con respecto a la composición de la secuencia de las proyecciones sentido y antisentido 3'. A continuación, la molécula de ARNip se puede sintetizar como el complemento a las posiciones de nucleótidos 1 a 21 del motivo de la secuencia de 23 nucleótidos. El uso de proyecciones 3' TT simétricos puede ser ventajoso asegurar que las partículas de ribonucleoproteínas de interferencia pequeñas (siRNPs) se forman con proporciones aproximadamente iguales de siRNPs de escisión de ARN diana sentido y antisentido (Elbashir *et al.* (2001) *supra* and Elbashir *et al.* 2001 *supra*). Análisis de bases de datos de secuencias, incluyendo, pero no limitando a la NCBI, BLAST, Derwent y GenSeq así como el software de oligosíntesis comercialmente disponible tal como Oligoengine®, también se puede utilizar para seleccionar secuencias de ARNip contra las bibliotecas de EST para asegurar que sólo un gen se dirige.

Entrega de Agentes de Interferencia por ARN: Los métodos de entrega de los agentes de interferencia por ARN, *por ejemplo*, un ARNip, o vectores que contienen un agente de interferencia de ARN, a las células diana (*por ejemplo*, las células del cerebro u otras células diana deseadas, para las células en los sistemas nervioso central y periférico), pueden incluir, *por ejemplo* (i) la inyección de una composición que contiene el agente de interferencia por ARN, *por ejemplo*, un ARNip, o (ii) poner en contacto directamente la célula, *por ejemplo*, una célula del cerebro, con una composición que comprende un agente de interferencia por ARN, *por ejemplo*, un ARNip. Los agentes de interferencia por ARN, *por ejemplo*, un ARNip, pueden ser inyectados directamente en cualquier vaso sanguíneo, tal como vena, arteria, vénula o arteriola, a través de, *por ejemplo*, inyección hidrodinámica o cateterización. Agentes de Lp-PLA₂ como ARNip de Lp-PLA₂ se pueden entregar a órganos específicos, *por ejemplo*, el hígado, la médula ósea o la administración sistémica.

La administración puede ser mediante una sola inyección o mediante dos o más inyecciones. El agente de interferencia por ARN se entrega en un portador farmacéuticamente aceptable. Uno o más agentes de interferencia por ARN se pueden utilizar simultáneamente. Los agentes de interferencia por ARN, *por ejemplo*, los ARNip dirigidos al ARN de Lp-PLA₂m, se puede enviar por separado, o en combinación con otros agentes de interferencia por ARN, *por ejemplo*, ARNip, tal como, *por ejemplo* ARNip dirigido a otros genes celulares. El ARNip de Lp-PLA₂ también se puede administrar en combinación con otros agentes farmacéuticos que se utilizan para tratar o prevenir enfermedades o trastornos neurodegenerativos.

Las células específicas se pueden dirigir con la interferencia de ARN, lo que limita los efectos secundarios potenciales de interferencia de ARN causada por la dirección no específica de la interferencia de ARN. El método puede utilizar, *por ejemplo*, un complejo o una molécula de fusión que comprende una fracción diana celular y una fracción de interferencia de ARN que se utiliza para entregar de manera efectiva la interferencia de ARN en células de unión. *Por ejemplo*, una proteína de fusión de anticuerpo-protamina cuando se mezcla con un ARNip, se une ARNip y selectivamente se entrega el ARNip en células que expresan un antígeno reconocido por el anticuerpo, lo que resulta en el silenciamiento de la expresión génica sólo en aquellas células que expresan el antígeno. La fracción de enlace de la molécula inductora de interferencia de ARN o ARNip es una proteína o un dominio o fragmento de enlace de un ácido nucleico de una proteína, y la fracción de enlace se fusiona a una porción de la fracción diana. La ubicación de la fracción diana puede ser tanto en el extremo carboxilo-terminal o amino-terminal de la construcción como en el medio de la proteína de fusión.

Un mecanismo de entrega mediada por virus se puede emplear también para entregar el ARNip a las células *in vitro* e *in vivo* según se describe en Xia, H. et al. (2002) *Nat Biotechnol* 20(10):1006). Los mecanismos de entrega de plásmidos o mediada por virus de ARNsh se pueden emplear también para entregar ARNsh a las células *in vitro* e *in vivo* según se describe en Rubinson, D.A., et al. ((2003) *Nat. Genet.* 33:401-406) and Stewart, S.A., et al. ((2003) *RNA* 9:493-501).

Los agentes de interferencia por ARN, *por ejemplo*, un ARNip, también se pueden introducir en las células a través de la circulación vascular o extravascular, la sangre o el sistema linfático, y el líquido cefalorraquídeo.

5 La dosis del agente de interferencia por ARN particular será en una cantidad necesaria para efectuar la interferencia de ARN, *por ejemplo*, silenciamiento de genes postraduccional (PTGS), del gen diana particular, lo que conduce a la inhibición de la expresión del gen diana o la inhibición de la actividad o el nivel de la proteína codificada por el gen diana.

10 También se sabe que las moléculas de ARNi no tienen que coincidir perfectamente a su secuencia diana. Preferiblemente, sin embargo, la parte media y 5' de la cadena antisentido (guía) del ARNip es perfectamente complementaria a la secuencia del ácido nucleico diana.

15 Por consiguiente, las moléculas de ARNi que funcionan como inhibidores de ácido nucleico de Lp-PLA₂ son, por ejemplo, pero no se limitan a, moléculas de ARN bicatenaria (ds) sin modificar y modificadas, incluyendo ARN cortotemporal (ARNst), ARN interferente pequeño (ARNip), ARN de horquilla corta (ARNsh), microARN (ARNmi), ARN de doble cadena (ARNds), (véase, por ejemplo Baulcombe, Science 297:2002-2003, 2002). Las moléculas de ARNds, por ejemplo, ARNip, también puede contener proyecciones 3', preferiblemente proyecciones 3'UU o 3'TT. Las moléculas de ARNip no pueden incluir moléculas de ARN que comprenden ARNs mayor que aproximadamente 30-40 bases, aproximadamente 40-50 bases, aproximadamente 50 bases o más. Las moléculas de ARNip pueden ser bicatenarios para más de aproximadamente 25%, más de aproximadamente 50%, más de aproximadamente 60%, más de aproximadamente 70%, más de aproximadamente 80%, más de aproximadamente el 90% de su longitud. Un inhibidor de ácido nucleico de Lp-PLA₂ puede ser cualquier agente que se une a e inhibe la expresión del ARNm de Lp-PLA₂, donde la expresión del ARNm de Lp-PLA₂ o un producto de la transcripción del ácido nucleico codificado por SEQ ID NO: 1 o 2 es inhibida.

25 Los agentes inhibidores de Lp-PLA₂ pueden ser construcciones de ácidos nucleicos catalíticos, tales como, por ejemplo ribozimas, que son capaces de escindir los transcritos de ARN y evitando de ese modo la producción de proteína de tipo salvaje. Las ribozimas están dirigidos e hibridan con una secuencia particular en virtud de dos regiones de secuencia complementaria a la diana que flanquea el sitio catalítico de la ribozima. Después del enlace, la ribozima escinde la diana de una manera específica del sitio. El diseño y ensayo de ribozimas que reconocen específicamente y escinden las secuencias de los productos de los genes descritos en este documento, por ejemplo para la escisión de Lp-PLA₂ u homólogos o variantes del mismo se pueden lograr por técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica (por ejemplo Lleber and Strauss, (1995) Mol Cell Biol 15: 540.551).

35 *Inhibidores de proteínas y péptidos de Lp-PLA₂*

Los agentes que inhiben la Lp-PLA₂ pueden ser inhibidores de proteínas y/o de péptidos o fragmentos de los inhibidores de Lp-PLA₂, por ejemplo, pero no se limitan a las proteínas mutadas; proteínas terapéuticas y proteínas recombinantes. Los inhibidores de proteínas y/o de péptidos también pueden incluir, por ejemplo proteínas mutadas, proteínas modificadas genéticamente, péptidos, péptidos sintéticos, proteínas recombinantes, proteínas quiméricas, anticuerpos, proteínas humanizadas, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, proteínas modificadas y fragmentos de los mismos.

45 Los agentes que inhiben la Lp-PLA₂ pueden ser variantes negativas dominantes de Lp-PLA₂, por ejemplo, una variante no funcional de la Lp-PLA₂.

Anticuerpos

50 Los inhibidores de genes y/o productos génicos útiles en los métodos descritos en este documento incluyen, por ejemplo, anticuerpos, incluyendo anticuerpos monoclonal, quimérico humanizado, y recombinante y fragmentos de enlace de antígeno de los mismos. Los anticuerpos neutralizantes se pueden utilizar como inhibidores de la enzima Lp-PLA₂. Los anticuerpos se levantan fácilmente en animales tales como conejos o ratones mediante la inmunización con el antígeno. Los ratones inmunizados son particularmente útiles para proveer fuentes de células B para la fabricación de hibridomas, que a su vez se cultivan para producir grandes cantidades de anticuerpos monoclonales.

55 El inhibidor para los productos de los genes identificados en este documento puede ser una molécula de anticuerpo o la fracción de enlace epítipo de una molécula de anticuerpo y similares. Los anticuerpos proporcionan una alta avidez de enlace y especificidad única para un amplio rango de antígenos diana y haptenos. Los anticuerpos monoclonales útiles en los métodos descritos en este documento incluyen el anticuerpo completo y fragmentos del mismo y se generan de acuerdo con técnicas convencionales, tales como la síntesis de hibridoma, técnicas de ADN recombinante y síntesis de proteínas.

60 Los anticuerpos monoclonales y fragmentos útiles se pueden derivar de cualquier especie (incluyendo humanos) o se pueden formar como proteínas quiméricas que emplean secuencias de más de una especie. Los anticuerpos monoclonales humanos o anticuerpo murino "humanizado" también se utilizan de acuerdo con los métodos descritos. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal murino puede ser "humanizado" recombinando genéticamente la secuencia de

nucleótidos que codifica la región Fv de murino (i.e. que contiene los sitios de enlace de antígeno) o las regiones determinantes complementarias de la misma con la secuencia de nucleótidos que codifica una región dominio constante humana y una región Fc. Las fracciones dirigidas humanizadas son reconocidas para disminuir la inmunorreactividad del anticuerpo o polipéptido en el receptor hospedador, lo que permite un aumento en la vida media y una reducción de tal vez las reacciones inmunes adversas de una manera similar a la revelada en la Solicitud de Patente Europea No. 0.411,893 A2. Los anticuerpos monoclonales murinos deben emplearse preferiblemente en forma humanizada. La actividad de enlace de antígeno se determina por las secuencias y conformación de los aminoácidos de las seis regiones determinantes de complementariedad (CDR) que se encuentran (tres cada uno) en las cadenas ligeras y pesadas de la parte variable (Fv) del anticuerpo. La molécula Fv de cadena sencilla (scFv) de 25-kDa, compuesta de una región variable (VL) de la cadena ligera y una región variable (VH) de la cadena pesada unida a través de una secuencia espaciadora del péptido corto, es el fragmento de anticuerpo más pequeño desarrollado hasta la fecha. Se han desarrollado técnicas para visualizar moléculas scFv en la superficie del fago filamentososo que contiene el gen para el scFv. Las moléculas scFv con un amplio rango de especificidades antigénicas pueden estar presentes en una mezcla grande única de biblioteca de scFv-fago. Algunos ejemplos de anticuerpos monoclonales de alta afinidad y derivados quiméricos de los mismos están descritos en la Solicitud de Patente Europea EP 186,833; Solicitud de Patente PCT WO 92/16553; y la Patente de EE.UU. No. 6,090.923.

Los anticuerpos quiméricos son moléculas de inmunoglobulina caracterizados por dos o más segmentos o porciones derivadas de diferentes especies animales. Generalmente, la región variable del anticuerpo quimérico se deriva de un anticuerpo de mamífero no humano, tal como un anticuerpo monoclonal murino, y la región constante de inmunoglobulina se deriva de una molécula de inmunoglobulina humana. Preferiblemente, ambas regiones y la combinación tienen baja inmunogenicidad como se determina de forma rutinaria.

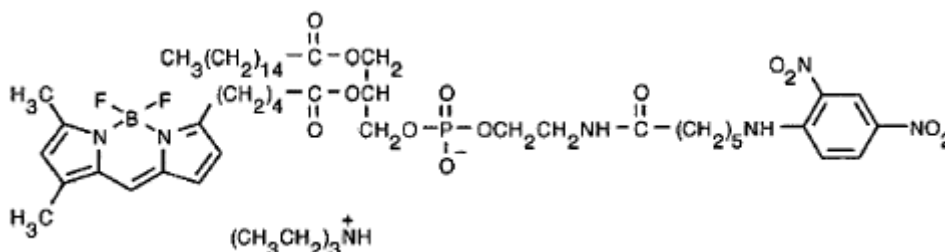
Una limitación de las moléculas scFv es su interacción monovalente con antígeno diana. Uno de los métodos más fáciles de mejorar el enlace de una scFv con su antígeno diana es aumentar su afinidad funcional a través de la creación de un multímero. La asociación de moléculas scFv idénticas para formar diabodies, triabodies y tetrabodies puede comprender un número de módulos Fv idénticos. Estos reactivos son por lo tanto multivalentes, pero mono-específicos. La asociación de dos moléculas scFv diferentes, cada una que comprende un dominio VH y VL derivado de diferente padre Ig formará un diacuerpo biespecífico completamente funcional. Una aplicación única de scFv biespecíficas es unir dos sitios simultáneamente en la misma molécula diana a través de dos epítopos de superficie (adyacentes). Estos reactivos ganan una ventaja de avidéz significativa sobre una scFv solo o fragmentos Fab. Se han diseñado un número de estructuras basadas en scFv multivalentes, incluyendo, por ejemplo, minianticuerpos, minianticuerpos dimericos, minibodies, (scFv)₂, diabodies y triabodies. Estas moléculas abarcan una gama de valencia (dos a cuatro sitios de enlace), tamaño (50 a 120 kDa), flexibilidad y facilidad de producción. Los fragmentos de anticuerpos Fv de cadena sencilla (scFv) son predominantemente monoméricos cuando los dominios VH y VL están unidos por, enlazadores de polipéptido de al menos 12 residuos. La scFv monómero es termodinámicamente estable con enlazadores de 12 y 25 aminoácidos de longitud en todas las condiciones. Las moléculas de diacuerpo y triacuerpo no covalentes son fáciles de diseñar y se producen acortando el enlazador peptídico que conecta las cadenas pesadas variables y ligeras variables de una sola molécula scFv. Los dímeros de scFv están unidos por hélices anfipáticas que ofrecen un alto grado de flexibilidad y la estructura minianticuerpo se puede modificar para crear un minianticuerpo biespecífico dimerico (DiBi) que contiene dos minianticuerpos (cuatro moléculas scFv) conectados a través de una doble hélice. Los dímeros de scFv gen-fusionado o enlaces de disulfuro, proporcionan un grado intermedio de flexibilidad y son generados por técnicas de clonación sencillos adicionando una secuencia Gly4Cys C-terminal. Los minibodies scFv-CH3 se componen de dos moléculas scFv unidas a un dominio CH₃ de IgG, ya sea directamente (minicuerpo LD) o a través de una región bisagra muy flexible (Flex minicuerpo). Con un peso molecular de aproximadamente 80 kDa, estas construcciones divalentes son capaces de enlace significativo con los antígenos. El minicuerpo Flex muestra la localización impresionante del tumor en ratones. Los multímeros bi y tri específicos se pueden formar por asociación de diferentes moléculas scFv. El aumento de la afinidad funcional se puede alcanzar cuando los fragmentos Fab o fragmentos de anticuerpo de Fv de cadena sencilla (scFv) se complejan en dímeros, trímeros o agregados más grandes. La ventaja más importante de los scFv multivalentes más de scFv monovalentes y fragmentos Fab es la ganancia en afinidad de enlace funcional (avidéz) para dirigir antígenos. Alta avidéz requiere que los multímeros de scFv sean capaces de unirse simultáneamente a antígenos diana separados. La ganancia en la afinidad funcional para diabodies de scFv en comparación con los monómeros de scFv es significativa y se observa principalmente en la reducción de las tasas, que resultan del enlace múltiple con dos o más antígenos diana y para volver a unir cuando una Fv se disocia. Cuando tales moléculas scFv se asocian en multímeros, pueden ser diseñados, ya sea con alta avidéz a un solo antígeno diana o con múltiples especificidades para diferentes antígenos diana. El enlace múltiple con antígenos depende de la alineación y orientación correctas en los módulos Fv. Para la avidéz completa en scFv multivalentes diana, los sitios de enlace de antígeno deben apuntar hacia la misma dirección. Si el enlace múltiple no es estéricamente posible, entonces las ganancias aparentes en la afinidad funcional es probable que sean debido al efecto del aumento de reconsolidación, que es dependiente de las velocidades de difusión y concentración de antígeno. También se contemplan los anticuerpos conjugados con fracciones que mejoran sus propiedades. Por ejemplo, se pueden utilizar los conjugados de anticuerpos con PEG que aumenta su vida media *in vivo*. Las bibliotecas inmunes se preparan sometiendo los genes que codifican fragmentos de anticuerpos variables, a partir de los linfocitos B de animales inmunizados o ingenuos o pacientes para amplificación por PCR. Se usan combinaciones de oligonucleótidos que son específicos para genes de inmunoglobulina o para las familias de genes de

- inmunoglobulina. Genes de inmunoglobulina de la línea germinal se pueden utilizar para preparar repertorios de anticuerpos semisintéticos, con la región determinante de la complementariedad de los fragmentos variables siendo amplificados por PCR usando cebadores degenerados. Estas bibliotecas de recipiente único tienen la ventaja de que los fragmentos de anticuerpos contra un gran número de antígenos pueden ser aislados a partir de una sola biblioteca. La tecnología de expresión en fago se puede utilizar para aumentar la afinidad de fragmentos de anticuerpos, con nuevas bibliotecas que se preparan a partir de fragmentos de anticuerpos ya existentes por, la mutagénesis basada en codón dirigida al sitio o al azar, por desordenar las cadenas de dominios individuales con los de fragmentos de repertorios ingenuos o mediante el uso de cepas mutantes bacterianas.
- Alternativamente, un ratón SCID-hu, por ejemplo el modelo desarrollado por Genpharm, se puede usar para producir anticuerpos, o fragmentos de los mismos. Se contempla un nuevo tipo de molécula de enlace de alta avidéz, denominado peptacuerpo, creado mediante el aprovechamiento del efecto de interacción multivalente. Un ligando de péptido corto se fusionó a través de una región bisagra semirrígida con el dominio de ensamblaje enrollado de la bobina de la proteína de la matriz oligomérica de cartílago, resultando en una molécula de enlace multivalente pentamérica. Los inhibidores de ligandos y/o quiméricos pueden ser dirigidos a objetivos específicos de tumores o tejido, mediante el uso de anticuerpos biespecíficos, por ejemplo producido por el enlace químico de un anticuerpo anti-ligando (Ab) y un Ab dirigido hacia un objetivo específico. Para evitar las limitaciones de los conjugados químicos, conjugados moleculares de anticuerpos pueden ser utilizados para la producción de Abs de cadena sencilla biespecíficos recombinantes que dirigen inhibidores de ligandos y/o quiméricos a moléculas de superficie celular. Alternativamente, dos o más agentes activos y/o inhibidores unidos a fracciones dirigidas se pueden administrar, en donde cada conjugado incluye una fracción diana, por ejemplo, un anticuerpo diferente. Cada anticuerpo es reactivo con un epítipo sitio diana diferente (asociado con el mismo o un antígeno sitio diana diferente). Los diferentes anticuerpos con los agentes adjuntos se acumulan de forma aditiva en el sitio diana deseado. Las fracciones diana basadas en anticuerpos o basadas en no-anticuerpos pueden emplearse para entregar un ligando o el inhibidor a un sitio diana. Preferiblemente, para este propósito se utiliza un agente de enlace natural para un antígeno asociado con una enfermedad o no regulada.

Bioensayo para identificar inhibidores de Lp-PLA₂:

- Selección de la inhibición de la proteína Lp-PLA₂

Los métodos descritos en este documento se refieren al uso de inhibidores de la Lp-PLA₂ para el tratamiento de la demencia vascular, por ejemplo enfermedad de Alzheimer y/o el tratamiento de trastornos asociados con la permeabilidad de BBB. Cuando sea necesario, los agentes que inhiben la proteína Lp-PLA₂ se evalúan usando un bioensayo, tal como se revela en la Patente de EE.UU. 5,981,252. Uno de tales ensayos está probando el efecto del agente en la proteína Lp-PLA₂ recombinante. En un ensayo, por ejemplo, Lp-PLA₂ recombinante se purifica hasta la homogeneidad a partir de células Sf9 infectadas con baculovirus, utilizando una columna quelante de zinc, cromatografía de afinidad de sefarosa azul y una columna de intercambio de aniones. Seguido de la purificación y ultrafiltración, la enzima se puede almacenar a 6 mg/ml a 4 °C. La solución reguladora de ensayo comprende Tris-HCl (50 mM), NaCl (150 mM) y CHAPS 1 mM, pH 7.4 a temperatura ambiente. La actividad se mide por un aumento en la emisión a 535 nm en la hidrólisis de N-((6-(2,4-dinitrofenil) amino) hexanoil) -2-(4,4-difluoro- 5,7-dimetil-4-bora-3a,4a -diaz-s-indaceno-3-pentanoil) -1-hexadecanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, sal de trietilamonio (PED6, Molecular Probes referencia de catálogo D-23739) como sustrato, usando un lector de placas fluorométrico con placas de microtitulación de 384 pozos. La reacción se inició mediante la adición de enzima (aprox 400 pM final en peso) y el sustrato (5 µM final) a un inhibidor en un volumen total de 10 microlitros.



(PED6)

- Los compuestos según se describen en el presente documento, por ejemplo como se describe en las secciones tituladas como Ejemplos de Síntesis se ensayaron y se encontró que tenían valores de IC₅₀ en el intervalo de 0.1 a 10 nM.

Usos de los agentes que inhiben Lp-PLA₂ para el tratamiento de enfermedades o trastornos neurodegenerativos

- Trastornos asociados con la permeabilidad de BBB:

Sin desear estar limitado por la teoría, la BBB, una barrera funcional además de una barrera anatómica, es de gran importancia para el mantenimiento de un ambiente constante para la función del SNC óptima. La mayoría de sustratos metabólicos (i.e. azúcares y aminoácidos) son hidrófilos, y atraviesan la BBB solamente por los sistemas de transporte mediados por portadores específicos, que se expresan en ambos lados luminal y abluminal de células endoteliales de BBB. Existen marcadas diferencias apical/basal en la distribución de los portadores y enzimas, que distingue el endotelio de BBB especializado del endotelio periférico. Se han hecho progresos sustanciales en la comprensión de la fisiopatología y los mecanismos implicados en la atenuación de la permeabilidad de BBB. Las implicaciones clínicas de la "BBB enferma" se producen en muchas enfermedades que afectan al cerebro, siendo la BBB desestabilizada, o modificada, de tal manera que hay un dramático incremento en la permeabilidad vascular. Sin estar ligado por la teoría, existen varias formas en las que varias moléculas pueden pasar el endotelio. Estas incluyen rutas intercelulares, transporte vesicular, o la penetración transcelular directa a través del endotelio dañado.

Una disfunción de BBB o BBB anormal puede ser una causa o la consecuencia de un proceso de enfermedad en particular, por ejemplo, las enfermedades y trastornos neurodegenerativos. Se ha informado que las enfermedades en las cuales aumentó la permeabilidad de BBB incluyen neoplasia, isquemia, hipertensión, demencia, epilepsia, infección, esclerosis múltiple, y trauma. El efecto de una enfermedad en la función de BBB afectará secundariamente el flujo sanguíneo cerebral y el tono vascular en el cerebro, que además influye el transporte a través de la BBB.

Como se describe en el presente documento, la inhibición de Lp-PLA₂ usando los agentes, según se describe en el presente documento es útil para el tratamiento de trastornos o enfermedades en las que se produce la permeabilidad de BBB y/o se produce una ruptura de BBB. La inhibición de Lp-PLA₂ usando los agentes, por ejemplo, agentes según se describe en el presente documento, es útil para el tratamiento o prevención de trastornos o enfermedades donde se desea mantener una BBB intacta.

Los agentes inhibidores de Lp-PLA₂ según se describe en el presente documento pueden ser útiles en la prevención y el tratamiento de enfermedades y trastornos neurodegenerativos. Ejemplos de enfermedades neurológicas y enfermedades y trastornos neurodegenerativos incluyen, pero no se limitan a la enfermedad de Alzheimer (AD), enfermedad de Parkinson (PD), la enfermedad de Huntington (HD), la demencia vascular, el envejecimiento y deterioro cognitivo leve.

Los agentes que inhiben la Lp-PLA₂ según se describe en el presente documento pueden ser útiles en la prevención y tratamiento de enfermedades en las que la permeabilidad de BBB se ha determinado, o puede ser determinada, para desempeñar un papel, tal como, por ejemplo, pero no se limitan a: hiperosmolaridad; pH ácido; encefalopatía por quemadura; encefalopatía por plomo; encefalitis autoinmune; esclerosis múltiple; reperfusión post-isquemia; hipertensión aguda; irradiación de microondas; encefalopatía hepática; convulsiones; tumores; desarrollo; hipervolemia; la hipotermia; post-radiación; condiciones hiperbáricas; meningitis; encefalopatía linfostática; diabetes; síndrome de Wernicke-Korsakoff; retraso mental familiar y esclerosis lateral amiotrófica (ALS).

Los sujetos susceptibles de tratamiento mediante agentes inhibidores de Lp-PLA₂ según se describe en este documento incluyen sujetos en riesgo de enfermedad pero no muestra síntomas (por ejemplo sujetos asintomáticos), así como sujetos que muestran actualmente síntomas. En el caso de la enfermedad de Alzheimer, prácticamente cualquier persona está en riesgo de padecer la enfermedad de Alzheimer si él o ella vive lo suficiente. Por lo tanto, los presentes métodos se pueden administrar profilácticamente a la población general sin ninguna evaluación del riesgo del paciente sometido. Los métodos que en este documento se describen son especialmente útiles para las personas que tienen un riesgo genético conocido de la enfermedad de Alzheimer. Tales individuos incluyen los que tienen parientes que han experimentado esta enfermedad, y aquellos cuyo riesgo se determina por análisis de marcadores genéticos o bioquímicos, según se describe en el presente documento.

Enfermedades de demencia vascular

La demencia vascular está compuesta de una serie de condiciones patológicas heterogéneas, que resulta de lesiones cerebrales isquémicas o hemorrágicas, así como de las lesiones que se desarrollan durante la hipoperfusión prolongada.

La forma isquémica subcortical de la demencia vascular es un tipo común de demencia y deterioro cognitivo vascular, y una de las principales causas de deterioro cognitivo en las personas de edad avanzada. La demencia vascular isquémica subcortical se debe principalmente a la enfermedad de vasos pequeños, lo que provoca infartos lacunares y extensas lesiones de sustancia blanca, y se puede comparar con la demencia de vasos grandes o demencia vascular (Roman GC, Neurology. 1993;43:250-260, Roman GC Lancet Neurol. 2002;1:426-436). Las lesiones isquémicas en la demencia vascular isquémica subcortical afectan particularmente a los circuitos frontal subcortical, una observación que explica los principales efectos neurológicos cognitivos y clínicos de la demencia vascular (Ishii N, Neurology 1986; 36: 340-45, Cummings JL, Arch Neurol 1993; 50:873-80). La demencia vascular isquémica subcortical también es causada por la hipertensión persistente (de Leeuw FE, Brain. 2002;125:765-772) y la hipoperfusión por insuficiencia cardíaca congestiva (Roman GC Neurol Res 2004; 26:.. 454 a 458), la fibrilación auricular (de Leeuw FE, Neurología 2000; 54: 1795- 1801), y la apnea obstructiva del sueño (Kamba M, J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. 2001; 71; 334-339).

Las lesiones isquémicas de sustancia blanca, un hallazgo frecuente en las personas de edad avanzada, son los cambios patológicos característicos de la demencia vascular isquémica subcortical y el deterioro cognitivo y trastornos cognitivos están relacionados con la gravedad de la lesión (Hachinski VC, Arch Neurol. 1987;4:21-23, Pantoni L, Alzheimer Dis. Assoc. Disord. 1999;13(suppl 3):S49-S54, de Groot JC, Neurology2001; 56:1539-1545). Las lesiones de sustancia blanca cerebrovasculares constituyen la patología de núcleo en varios tipos de demencia vascular, tales como la enfermedad de Binswanger, angiopatía amiloide cerebral, y la arteriopatía cerebral autosómica dominante con infartos subcorticales y leucoencefalopatía (CADASIL). Estas lesiones de sustancia blanca cerebrovasculares son causadas por hipoperfusión cerebral crónica, que resultan de la estenosis severa de varias arterias o arteriolas principalmente en la sustancia blanca profunda (Pantoni L, Stroke 1997;28:652-659, de Groot JC, Neurology2001; 56:1539-1545, Roman GC, Neurol. Res. 2004;26:454-458, Capizzano AA, Am J Neuroradiol 2000;21:621-63 0).

Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (AD) es una enfermedad progresiva que resulta en la demencia senil. Véase en general Selkoe, TINS 16, 403-409 (1993); Hardy et al., WO 92/13069; Selkoe, J. Neuropathol. Exp. Neurol. 53, 438-447 (1994); Duff et al., *Nature* 373, 476-477 (1995); Games et al., *Nature* 373, 523 (1995). En términos generales la enfermedad se divide en dos categorías: de aparición tardía, que se produce en la vejez (65 + años) y de aparición temprana, que se desarrolla mucho antes del período senil, i.e. entre 35 y 60 años. En ambos tipos de la enfermedad, la patología es el mismo pero las β anomalías tienden a ser más grave y generalizada en los casos en que comienzan a una edad temprana. La enfermedad se caracteriza a nivel macroscópico por la contracción del cerebro significativa lejos de la bóveda craneal como se ve en las imágenes de RMN, como resultado directo de la pérdida neuronal y por dos tipos de lesiones macroscópicas en el cerebro, placas seniles y ovillos neurofibrilares. Las placas seniles son áreas que comprenden los procesos neuronales desorganizados hasta 150 μ m de ancho y depósitos amiloides extracelulares, que se concentran por lo general en el centro y visibles por análisis microscópico de secciones de tejido cerebral. Los ovillos neurofibrilares son depósitos intracelulares de proteína tau que constan de dos filamentos trenzados el uno del otro en pares.

El componente principal de las placas es un péptido denominado péptido A β o β -amiloide. El péptido A β es un fragmento interno de 39-43 aminoácidos de una proteína precursora denominada proteína precursora de amiloide (APP). Varias mutaciones dentro de la proteína APP se han correlacionado con la presencia de la enfermedad de Alzheimer. Véase, por ejemplo, Goate et al., *Nature* 349, 704 (1991) (valina⁷¹⁷ a isoleucina); Chartier Harlan et al. *Nature* 353, 844 (1991) (valina⁷¹⁷ a glicina); Murrell et al., *Science* 254, 97 (1991) (valina⁷¹⁷ a la fenilalanina); Mullan et al, glicina); Murrell et al., *Science* 254, 97 (1991) (valina⁷¹⁷ a la fenilalanina); Mullan et al., *Nature Genet.* 1, 345 (1992) (una doble mutación que cambia lisina⁵⁹⁵-metionina⁵⁹⁶ a asparagina⁵⁹⁵-leucina⁵⁹⁶). Se cree que tales mutaciones causan la enfermedad de Alzheimer mediante el procesamiento aumentado o alterado de APP para A β , particularmente el procesamiento de APP a cantidades aumentadas de la forma larga de A β (i.e. A β 1-42 y A β 1-43). Se cree que las mutaciones en otros genes, tales como los genes de presenilina, PS1 y PS2, indirectamente afectan el procesamiento de APP para generar mayores cantidades de la forma larga A β (véase Hardy, TINS 20, 154 (1997)). Estas observaciones indican que A β , y particularmente su forma larga, es un elemento causal en la enfermedad de Alzheimer. A β , también conocida como péptido β -amiloide, o péptido A4 (véase U.S. Pat. No. 4,666,829; Glenner & Wong, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120, 1131 (1984)), es un péptido de 39-43 aminoácidos, es el principal componente de las placas características de la enfermedad de Alzheimer. A β es generado por el procesamiento de una proteína más grande APP por dos enzimas, denominadas β y γ secretasas (véase Hardy, TINS 20, 154 (1997)). Las mutaciones conocidas en APP asociadas con la enfermedad de Alzheimer se producen próximas al sitio de β o γ -secretasa, o dentro de A β . Por ejemplo, la posición 717 está próxima al sitio de γ -secretasa de escisión de APP en su procesamiento a β , y las posiciones 670/671 están próximas al sitio de escisión β -secretasa. Se cree que las mutaciones causan la enfermedad AD, mediante la interacción con las reacciones de escisión por la cual A β se forma, de manera que aumenta la cantidad de la forma de aminoácido 42/43 de A β generada.

A β tiene la propiedad inusual que puede fijar y activar ambas cascadas del complemento clásico y alternativo. En particular, se une a C1q y en última instancia a C3bi. Esta asociación facilita el enlace con macrófagos que conducen a la activación de las células B. Además, C3bi se descompone adicionalmente y entonces se une a CR2 en las células B de una manera dependiente de las células T, lo que conduce a un aumento de 10.000 en la activación de estas células. Este mecanismo hace que A β genere una respuesta inmunitaria en exceso de la de los otros antígenos.

La mayoría de las estrategias terapéuticas para la enfermedad de Alzheimer están dirigidas a reducir o eliminar la deposición de A β 42 en el cerebro, normalmente a través de la reducción en la generación de A β 42 de APP y/o algún medio de reducción de los niveles existentes de A β 42 de fuentes que contribuyen directamente a la deposición de este péptido en el cerebro (De Felice and Ferreira, 2002). Una lista parcial de los factores causantes asociados con el envejecimiento en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer esporádica incluye un cambio en el equilibrio entre la producción de péptido A β y su visto bueno de las neuronas que favorece la acumulación intracelular, un aumento de la secreción de péptidos A β por las neuronas en los alrededores espacio extracelular, aumento de los niveles de daño oxidativo a estas células, y la hipoperfusión cerebral global y los cambios metabólicos compensatorios asociados en las

neuronas afectadas (Cohen et al., 1988; Higgins et al., 1990; Kalaria, 2000; Nalivaeva et al., 2004; Teller et al., 1996; Wen et al., 2004).

5 El A β 42 que se deposita dentro de las neuronas y las placas también puede provenir de fuera de las neuronas (A β 42 exógeno) durante la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer. Los niveles de péptidos A β solubles en la sangre son conocidos por ser mucho mayores que en el espacio intersticial y CSF en los cerebros de individuos sanos (Seubert et al., 1992) con la sangre como una fuente de péptidos A β exógenos que eventualmente deposita en el cerebro de la enfermedad de Alzheimer (Zlokovic et al., 1993). Sin embargo, a excepción de cantidades traza de A β que son transportados activamente a través de las células endoteliales, es bien sabido que el acceso de péptidos A β transportados por la sangre al tejido cerebral en individuos sanos normales es bloqueado efectivamente por la integridad de la barrera hematoencefálica (BBB) (Kandimalla et al., 2005; Poduslo et al., 1999). La BBB es una estructura compleja compuesta de células endoteliales cerebrales que descansan sobre una lámina basal que es apoyada además por los procesos base de astrocitos locales (Gloor et al., 2001; Risau et al., 1998). Se regula estrechamente el paso de componentes de la sangre en el tejido cerebral y es altamente impermeable a casi todas las proteínas y otras macromoléculas mientras que, al mismo tiempo, lo que permite la entrada selectiva de moléculas esenciales (Mayhan, 2001). Muchas evidencias han revelado que el envejecimiento se asocia con cambios degenerativos a los vasos sanguíneos que pueden comprometer la integridad de BBB. Por ejemplo, se originan una serie de enfermedades neurodegenerativas relativamente comunes en los ancianos, incluyendo la demencia vascular, y AD, por lo menos en parte, de las patologías vasculares cerebrales que se desarrollan dentro de la microvasculatura del cerebro (Breteler, 2000; Buee et al., 1997; de la Torre, 1997; Esiri et al., 1999; Kalaria et al., 1996). Un enlace entre la enfermedad neurodegenerativa y neurovasculatura es bien conocido el hecho de que la patología de Alzheimer, incluyendo las placas amiloides y los ovillos neurofibrilares, se desarrolla posteriormente dentro de la vecindad de las lesiones de accidente cerebrovascular (Jellinger, 2002; Kalaria, 1996; Kalaria, 2002; Natte et al., 1998.).

25 Los marcadores genéticos de riesgo hacia la enfermedad de Alzheimer incluyen mutaciones en el gen APP, en particular las mutaciones en la posición 717 y las posiciones 670 y 671 denominadas como mutaciones Hardy y Swedish respectivamente (véase Hardy, TINS, supra). Otros marcadores de riesgo son las mutaciones en los genes de la presenilina, PS1 y PS2, y ApoE4, antecedentes familiares de la enfermedad de Alzheimer, la hipercolesterolemia o aterosclerosis. Los sujetos actualmente sufren de la enfermedad de Alzheimer se pueden reconocer a partir de la demencia característica, así como la presencia de factores de riesgo descritos anteriormente. Además, una serie de pruebas de diagnóstico están disponibles para la identificación de sujetos que tienen la enfermedad de Alzheimer. Estos incluyen la medición de los niveles de tau CSF y A β 42. Los niveles de Tau elevados y A β 42 mayores significan la presencia de la enfermedad de Alzheimer. Los individuos que sufren de la enfermedad de Alzheimer también pueden diagnosticarse por los criterios de MMSE o ADRDA. El tejido sencillo para el análisis por lo general es sangre, plasma, suero, moco o líquido cefalorraquídeo del paciente. La muestra se analiza para indicios de una respuesta inmune a cualquier forma de péptido A β , por lo general A β 42. La respuesta inmunitaria se puede determinar a partir de la presencia de, por ejemplo, anticuerpos o células T que se unen específicamente al péptido A β . Los métodos ELISA de detección de anticuerpos específicos para A β se describen en la sección de Ejemplos.

40 En los pacientes asintomáticos, el tratamiento puede comenzar a cualquier edad (por ejemplo, 10, 20, 30). Por lo general, sin embargo, no es necesario comenzar el tratamiento hasta que un paciente alcanza 40, 50, 60 o 70. El tratamiento por lo general implica múltiples dosificaciones durante un período de tiempo. El tratamiento puede ser monitoreado mediante el ensayo de presencia del péptido A β en el CSF o la permeabilidad de la BBB en el tiempo. Si el péptido A β todavía está presente en el CSF o la BBB permanece permeable o defectuosa, un tratamiento adicional con agentes inhibidores de Lp-PLA₂ según se describe en el presente documento se recomienda, y/o el tratamiento de terapias adicionales para la enfermedad de Alzheimer. En el caso de los pacientes con síndrome de Down potencial, el tratamiento puede comenzar antes del parto mediante la administración del agente terapéutico a la madre o poco después del nacimiento.

50 Los agentes que inhiben Lp-PLA₂ según se describe en el presente documento también pueden ser útiles en el tratamiento de otros trastornos neurodegenerativos o trastornos de deterioro cognitivo en general: por ejemplo, demencia, depresión, confusión, enfermedad de las vacas locas o Creutzfeldt-Jakob, enfermedad de Huntington, pérdida de coordinación motora, esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Pick et al. trastornos de almacenamiento del cerebro (por ejemplo, amiloidosis, gangliosidosis, trastornos de almacenamiento de lípidos, mucopolisacaridosis), síncope, y la demencia vascular. Así, el tratamiento puede ser dirigido a un sujeto que se ve afectado sin síntomas por la enfermedad neurodegenerativa; este puede mejorar la función cognitiva. La eficacia del tratamiento se puede determinar mediante el control de flujo sanguíneo cerebral (CBF) y/o la función de barrera hematoencefálica (BBB). Por ejemplo, la medición de la presencia de Tau o A β en el CSF. Los marcadores de la función de BBB se pueden utilizar, por ejemplo, como se revela en la Patente de EE.UU. 6,884,591 la función de BBB se puede monitorear utilizando técnicas de imagen conocidas por los expertos en la técnica, por ejemplo utilizando máquinas de RMN con capacidad de alto contraste. Se realiza la inyección vascular de agentes de contraste de RMN específicos inmediatamente antes de una RMN, en donde el agente de contraste se mantiene dentro de los vasos sanguíneos en un sujeto con una BBB normal, mientras que el agente de contraste penetra en el tejido cerebral y aparece como una "nube" en la RM en los individuos con una BBB permeable. Usando este método, las mediciones cuantitativas de la

ubicación y la extensión de la ruptura de BBB se puede determinar usando software de RMN. Por consiguiente, la eficacia del tratamiento con un inhibidor de Lp-PLA₂ se puede determinar mediante la detección de una reducción medible en la "nube" y/o reducción en la medida de la ruptura de BBB, después de la administración de los inhibidores de Lp-PLA₂ en comparación con la administración anterior según se describe en este documento.

5

Algunos métodos implican la determinación de un valor de referencia, por ejemplo del nivel de beta amiloide en el CSF de un sujeto antes de la administración de una dosis de agente, y la comparación de esto con un valor de beta amiloide en el CSF después del tratamiento. Una disminución, por ejemplo, una disminución del 10% en el nivel de beta amiloide en el CSF indica un resultado del tratamiento positivo (i.e. que la administración del agente ha logrado o aumentado una disminución de beta amiloide en el CSF). Si el valor de nivel de beta amiloide en el líquido cefalorraquídeo no cambia significativamente, o aumenta, un resultado de tratamiento negativo se indica. En general, se espera que los sujetos se sometan a un ciclo inicial de tratamiento con un agente para mostrar una disminución de beta amiloide en el CSF con dosis sucesivas de un agente, según se describe en este documento.

10

15

En otros métodos para determinar la eficacia del tratamiento, se determina un valor control (i.e. una media y desviación estándar) de beta amiloide para una población control. Por lo general los individuos de la población de control no han recibido tratamiento previo y no sufren de la enfermedad de Alzheimer. Los valores medidos de beta amiloide en el CSF en un sujeto después de la administración de un agente inhibidor de la Lp-PLA₂ según se describe en el presente documento se comparan entonces con el valor control. Una disminución en el amiloide beta en el CSF del sujeto en relación con el valor control (i.e. una disminución de al menos 10% de beta amiloide en un sujeto) indica un resultado de tratamiento positivo. La falta de disminución significativa indica un resultado de tratamiento negativo.

20

En otros métodos, se determina un valor control de, por ejemplo beta amiloide en el CSF a partir de una población control de sujetos que se han sometido a tratamiento con un agente terapéutico que es eficaz en la reducción de beta amiloide en el CSF. Los valores medidos de beta amiloide en el CSF en el sujeto se comparan con el valor control.

25

En otros métodos, un sujeto que no está recibiendo tratamiento actualmente por los agentes que inhiben la Lp-PLA₂ según se describe en el presente documento, pero se han sometido a un curso previo de tratamiento se controla para la beta amiloide en el CSF para determinar si se requiere una reanudación del tratamiento. El valor medido de beta amiloide en CSF, en el sujeto de prueba se puede comparar con un nivel de la beta amiloide en el CSF logrado previamente en el sujeto después de un curso previo de tratamiento. Una disminución significativa en beta amiloide CSF con respecto a la medición anterior (i.e. una disminución de al menos el 10%) es una indicación de que el tratamiento se puede reanudar. Alternativamente, el nivel de beta amiloide en el CSF en el sujeto puede ser comparado con un nivel de control de beta amiloide en CSF, determinado en una población de sujetos después de someterse a un curso de tratamiento. Alternativamente, el nivel de beta amiloide en CSF en un sujeto puede ser comparado con un valor control en poblaciones de sujetos tratados profilácticamente que permanecen libres de síntomas de la enfermedad, en particular, libres de síntomas de la permeabilidad de BBB, o poblaciones de pacientes tratados terapéuticamente que muestran mejora de síntomas de la enfermedad.

30

35

40

Métodos para identificar sujetos de riesgo de o con la enfermedad de Alzheimer.

Los sujetos susceptibles de tratamiento usando los métodos según se describen en este documento, incluyen sujetos en riesgo de una enfermedad neurodegenerativa, por ejemplo enfermedad de Alzheimer, pero que no muestran síntomas, así como sujetos que muestran síntomas de la enfermedad neurodegenerativa, por ejemplo sujetos con síntomas de la enfermedad de Alzheimer .

45

Los sujetos pueden ser examinados para su probabilidad de tener o desarrollar la enfermedad de Alzheimer basándose en una serie de marcadores bioquímicos y genéticos.

50

También se puede diagnosticar a un sujeto con un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer mediante marcadores genéticos de la enfermedad de Alzheimer. La anomalía genética en algunas familias se ha remontado al cromosoma 21 (St. George-Hyslop et al., Science 235:885-890, 1987). Un marcador genético es, por ejemplo, mutaciones en el gen APP, particularmente mutaciones en la posición 717 y las posiciones 670 y 671 conocidas como las mutaciones Hardy y Swedish respectivamente (véase Hardy, TINS, supra). Otros marcadores de riesgo son las mutaciones en los genes de la presenilina, PS1 y PS2, y ApoE4, antecedentes familiares de la enfermedad de Alzheimer, la hipercolesterolemia o aterosclerosis. Los sujetos con mutaciones APP, PS1 o PS2 son altamente propensos a desarrollar la enfermedad de Alzheimer. ApoE es un gen de susceptibilidad, y sujetos con la isoforma e4 de la ApoE (isoforma ApoE4) tienen un mayor riesgo de desarrollar enfermedad de Alzheimer. La prueba para los sujetos con la isoforma ApoE4 se revela en la Patente de EE.UU. 6,027,896. Otros enlaces genéticos se han asociado con un mayor riesgo de la enfermedad de Alzheimer, por ejemplo las variaciones en el receptor neuronal relacionado con sortilin SORL1 puede haber aumento de la probabilidad de desarrollar la enfermedad de Alzheimer de inicio tardío (Rogaeva et al, Nat Genet 2007 Feb; 39 (2): 168 -77). Otros posibles genes de susceptibilidad de la enfermedad de Alzheimer, incluyen, por ejemplo, ACE, CHRN2, CST3, ESR1, GAPDHS, IDE, MTHFR, NCSTN, PRNP, PSEN1, TF, TFAM y TNF y ser usados para identificar a los sujetos con mayor riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer (Bertram et al, Nat Genet. 2007 Jan;39(1):17-23), así como las variaciones en el gen alfa T -catenina (VR22) (Bertram et

55

60

65

al, *J Med Genet.* 2007 Jan;44(1):e63) y la enzima degradante de la insulina (IDE) y Kim et al, *J Biol Chem.* 2007;282:7825-32).

5 También se puede diagnosticar a un sujeto con riesgo aumentado de desarrollar la enfermedad de Alzheimer sobre la base de un examen de la vista simple, donde la presencia de cataratas y/o Abeta en la lente identifica un sujeto con riesgo aumentado de desarrollar la enfermedad de Alzheimer. Los métodos para detectar la enfermedad de Alzheimer incluyen el uso de un dispositivo de dispersión de luz cuasi-elástica (Goldstein et al, *Lancet* 2003; 12; 361:.. 1258-1265) de Neuroptix, utilizando Dispersión de luz cuasi-elástica (QLS) y escaneado de ligando fluorescente (FLS) y un dispositivo de exploración Neuroptix™ QEL, para permitir mediciones cuantitativas no invasivas de agregados amiloides en el ojo, para examinar y medir los depósitos en áreas específicas de la lente como un diagnóstico precoz de la enfermedad de Alzheimer. Método para diagnosticar un sujeto en riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer utilizando un método de este tipo de prueba del ojo no invasiva se revelan en la Patente de EE.UU. 7.107.092.

15 Actualmente, los individuos que sufren de la enfermedad de Alzheimer se pueden reconocer a partir de la demencia característica, así como la presencia de factores de riesgo descritos anteriormente. Además, una serie de pruebas de diagnóstico están disponibles para la identificación de individuos que tienen AD. Estas incluyen la medición de los niveles de tau CSF y A β 42. Los niveles elevados de tau y la disminución de A β 42 significan la presencia de la enfermedad de Alzheimer.

20 Existen dos "criterios" alternativos que se utilizan para diagnosticar clínicamente la enfermedad de Alzheimer: el criterio de DSM-III-R y el criterio NINCDS-ADRDA (que es un acrónimo de Instituto Nacional de Trastornos Neurológicos y Comunicativos y Accidentes Cerebrovasculares (NINCDS) y Asociación de Trastornos Relacionados y Enfermedad de Alzheimer (ADRDA); véase McKhann et al., *Neurology* 34:939-944, 1984). En pocas palabras, los criterios para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer bajo el DSM-III-R incluyen (1) la demencia, (2) el inicio insidioso con un supuesto deterioro general progresivo, y (3) la exclusión de todas las otras causas específicas de la demencia por la historia, el examen físico y las pruebas de laboratorio. En el contexto de los criterios de DSM-III-R, se entiende que la demencia implica "una pérdida multifacética de las capacidades intelectuales, como la memoria, el juicio, el pensamiento abstracto y otras funciones corticales superiores, y cambios en la personalidad y la conducta." (DSM-III-R, 1987).

30 Por el contrario, los criterios NINCDS-ADRDA establecen tres categorías de la enfermedad de Alzheimer, incluyendo enfermedad de Alzheimer "probable", "posible" y "definitivo". El diagnóstico clínico de enfermedad de Alzheimer "posible" se puede hacer sobre la base de un síndrome de demencia, en ausencia de otro trastorno neurológico, psiquiátrico o sistémico suficiente para causar demencia. Los criterios para el diagnóstico clínico de la enfermedad de Alzheimer "probable" incluyen

35 (a) la demencia establecida por examen clínico y documentada por una prueba como la prueba de Mini-Mental (Foldstein et al., *J. Psych. Res.* 12:189-198, 1975); (b) los déficits en dos o más áreas de la cognición; (c) empeoramiento progresivo de la memoria y otras funciones cognitivas; (d) ninguna alteración de la conciencia; (e) inicio entre los 40 y 90, con mayor frecuencia a continuación de los 65 años de edad; y (f) ausencia de órdenes sistémicas u otras enfermedades cerebrales que podrían explicar la demencia. Los criterios para el diagnóstico definitivo de la enfermedad de Alzheimer incluyen evidencia histopatológica obtenida a partir de una biopsia, o después de la autopsia. Dado que la confirmación de la Enfermedad de Alzheimer definitiva requiere el examen histológico de una muestra de biopsia cerebral (que es a menudo difícil de obtener), rara vez se utiliza para el diagnóstico precoz de la Enfermedad de Alzheimer.

45 También se puede utilizar el diagnóstico neuropatológico de la enfermedad de Alzheimer, cuando se analizan los números de placas y ovillos en el neurocortex (lóbulos frontales, temporales y parietales), el hipocampo y la amígdala (Khachaturian, *Arch. Neurol.* 42:1097-1105; Esiri, "Anatomical Criteria for the Biopsy diagnosis of Alzheimer's Disease," *Alzheimer's Disease, Current Research in Early Diagnosis*, Becker and Giacobini (eds.), pp. 239-252, 1990).

50 También se puede utilizar el análisis electroencefalográfico cuantitativo (EEG) para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer. Este método emplea el análisis de Fourier de las bandas beta, alfa, theta y delta (Riekkinen et al., "EEG in the Diagnosis of Early Alzheimer's Disease," *Alzheimer's Disease, Current Research in Early Diagnosis*, Becker and Giacobini (eds.), pp. 159-167, 1990) para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer.

55 También se puede diagnosticar la enfermedad de Alzheimer mediante la cuantificación del grado de atrofia neuronal, ya que dicha atrofia está generalmente aceptada como una consecuencia de la Enfermedad de Alzheimer. Ejemplos de estos métodos incluyen barrido tomográfico computarizado (TAC) y la resonancia magnética (RM) (Leedom and Miller, "CT, MRI, and NMR Spectroscopy in Alzheimer's Disease," *Alzheimer's Disease, Current Research in Early Diagnosis*, Becker and Giacobini (eds.), pp. 297-313, 1990).

60 También se puede diagnosticar la Enfermedad de Alzheimer mediante la evaluación de la disminución del flujo sanguíneo cerebral o el metabolismo en la corteza cerebral temporo-parietal posterior midiendo la disminución del flujo sanguíneo o el metabolismo mediante tomografía por emisión de positrones (PET) (Parks and Becker, "Positron Emission Tomography and Neuropsychological Studies in Dementia", *Alzheimer's Disease's, Current Research in Early*

Diagnosis, Becker and Giacobini (eds.), pp. 315-327, 1990), tomografía computarizada de emisión de fotón único (SPECT) (Mena et al., "SPECT Studies in Alzheimer's Type Dementia Patients", Alzheimer's Disease, Current Research in Early Diagnosis, Becker and Giacobini (eds.), pp. 339-355, 1990), y métodos de inhalación de xenón (Jagust et al., Neurology 38:909-912; Prohovnik et al., Neurology 38:931-937; and Waldemar et al., Senile Dementias: II International Symposium, pp. 399-407, 1988).

También se puede diagnosticar inmunológicamente la enfermedad de Alzheimer (Wolozin, "Immunochemical Approaches to the Diagnosis of Alzheimer's Disease," Alzheimer's Disease, Current Research in Early Diagnosis, Becker and Giacobini (eds.), pp. 217-235, 1990). Wolozin and coworkers (Wolozin et al., Science 232:648-650, 1986) produjeron un anticuerpo monoclonal "Alz50", que reacciona con una proteína de 68-kDa "A68", que se expresa en las placas y ovillos de neuronas de pacientes con la enfermedad de Alzheimer. Utilizando el anticuerpo Alz50 y análisis de transferencia Western, se detectó A68 en el fluido espinal cerebral (CSF) de algunos pacientes de Alzheimer y no en el CSF de pacientes ancianos normales (Wolozin and Davies, Ann. Neurol. 22:521-526, 1987).

También se puede diagnosticar la enfermedad de Alzheimer utilizando marcadores neuroquímicos de la enfermedad de Alzheimer. Los marcadores neuroquímicos que se han asociado con la Enfermedad de Alzheimer incluyen niveles reducidos de la acetilcolinesterasa (Giacobini and Sugaya, "Markers of Cholinergic Dysfunction in Alzheimer's Disease," Alzheimer's Disease, Current Research in Early Diagnosis, Becker and Giacobini (eds.), pp. 137-156, 1990), de somatostatina reducida (Tammenga et al., Neurology 37:161-165, 1987), una relación negativa entre la serotonina y el ácido 5-hidroxiindolacético (Volicer et al., Arch Neurol. 42:127-129, 1985), mayor subida del ácido homovanílico inducida por probenecid (Gibson et al., Arch. Neurol. 42:489-492, 1985) y la reducción de enolasa específica de neurona (Cutler et al., Arch. Neurol. 43:153-154, 1986).

Métodos para identificar a los sujetos en riesgo de o que tienen demencia y/o métodos para la evaluación de la memoria.

La práctica estándar actual se puede utilizar para diagnosticar los diversos tipos de demencia y, una vez diagnosticados, para monitorizar la progresión de la enfermedad durante un período prolongado de tiempo. Uno de tales métodos incluye al menos uno de los siguientes; (i) una evaluación de la memoria, (ii) un extenso examen neuropsicológico, (iii) un examen por un neurólogo geriátrico y (iv) la imagen de RMN del cerebro. La progresión de la enfermedad está documentada por los cambios en estos parámetros con el tiempo. Los cambios en los parámetros de al menos una de estas valoraciones pueden ser utilizados para evaluar la eficacia de un inhibidor de Lp-PLA₂ en el sujeto con el tiempo.

Se puede utilizar una evaluación de la memoria, como el programa de la UMDNJ New Jersey Institute for Successful Aging. Los pacientes adultos con denuncia de deterioro cognitivo y/o de memoria a corto plazo se ven en el Programa de Evaluación de la Memoria, que comprende la evaluación por Neurología Geriátrica, Neuropsicología y los Servicios Sociales. Los pacientes pueden ser tanto auto-remitidos o conducidos de los médicos y los clínicos de la comunidad en la sospecha de un posible o probable trastorno de la memoria o demencia. En dicha evaluación de memoria, en el momento de la evaluación inicial, todas las evaluaciones, como (i) la evaluación de memoria (ii) un extenso examen neuropsicológico, (iii) un examen por un neurólogo geriátrico y (iv) se realizan el mismo día, imágenes de RMN del cerebro. La evaluación neuropsicología captura un amplio inventario de la función cognitiva que ayuda en la determinación de la matriz y la gravedad de los déficits. Estos incluyen evaluaciones de Juicio, Comprensión, Comportamiento, Orientación, Control Ejecutivo, Funcionamiento Intelectual General, función Visual Espacial, memoria y capacidad de aprendizaje Nuevo. La depresión, si está presente, se identifica. La evaluación neurológica capta la historia de la alteración cognitiva, así como la historia médica general, y por lo general se lleva a cabo un examen neurológico completo. El examen neurológico también puede comprender los estudios de laboratorio para excluir las causas reversibles de demencia, incluyendo la Vitamina B12, ácido fólico, Perfil Metabólico Básico, CBC, TSH, ALT, AST, proteína C reactiva, homocisteína sérica, y RPR. La imagen cerebral provee una imagen cerebral estructural, tal como la RMN del cerebro, aunque se pueden utilizar otros métodos de imágenes cerebrales conocidos por los expertos en la técnica. La matriz de datos de la historia, las pruebas neuropsicológicas, exploración neurológica, estudios de laboratorio y de neuroimagen se utiliza para formular el diagnóstico.

El diagnóstico de demencia se puede basar las directrices de la Academia Americana de Parámetros de Neurología Práctica publicado en 2001. El diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer se puede basar en los criterios NINDS-ADRDA. El diagnóstico de demencia vascular se puede basar en criterios de Centros de Diagnóstico y Tratamiento de AD del Estado de California. Se puede comunicar la conclusión del diagnóstico al paciente y su familia en una reunión posterior. Si la conclusión de diagnóstico indica que el paciente o sujeto tiene o es probable que tenga demencia y/o pérdida de la memoria, un clínico puede aconsejar a la administración de tratamiento con una cantidad efectiva de un agente inhibidor de la Lp-PLA₂ según se describe en el presente documento. A menudo, la presencia de un trabajador social en la siguiente reunión también puede ayudar y conducir al paciente y a su familia con las necesidades actuales y futuras.

Otros métodos para diagnosticar a un paciente en riesgo de o que tiene una enfermedad o trastorno neurodegenerativo, tales como la demencia vascular o la enfermedad de Alzheimer incluyen la medición de la actividad y/o expresión de Lp-

PLA₂ usando los métodos según se describe en el presente documento, por ejemplo usando la prueba PLAC disponible comercialmente de diaDexus.

Métodos para identificar sujetos en riesgo de, o que tienen rotura de BBB o permeabilidad de BBB.

La detección directa de rotura de la BBB se puede evaluar mediante RM y la inyección de un agente de contraste. Las mejoras en la resolución de IRM y en el uso de agentes de contraste especiales se pueden utilizar para detectar la permeabilidad de BBB. En un método, a los sujetos se les administra un agente de contraste inmediatamente antes de la formación de imágenes del cerebro, tales como imágenes de RMN. En los casos de BBB intacta, los agentes de contraste se limitan a los vasos sanguíneos del cerebro, mientras que, en sujetos con una BBB interrumpida, el agente de contraste se "pulveriza fuera" en el tejido cerebral, el cual se puede visualizar. Por lo tanto, los lugares del cerebro, el tamaño de rotura de la BBB y la extensión de la BBB comprometida, tal como la extensión de pérdida vascular en sujetos, se pueden evaluar directa y cuantitativamente como parámetros de medición de permeabilidad de BBB. Además, tales métodos se pueden utilizar para evaluar cualquier mejora en estos parámetros resultantes del tratamiento del sujeto con un agente que inhibe la Lp-PLA₂. La visualización directa de rotura de la BBB y su pérdida vascular asociada en el cerebro es útil en los métodos según se describe en este documento para el seguimiento de los efectos beneficiosos del tratamiento de un sujeto con permeabilidad de BBB con inhibidores de Lp-PLA₂. Una mejora en al menos un parámetro de medición de permeabilidad de BBB, tal como la ubicación, el tamaño de rotura de la BBB y la extensión de pérdida vascular en sujetos administrados con un inhibidor de Lp-PLA₂ indica un resultado positivo de la administración de un inhibidor de Lp-PLA₂. Los parámetros de la permeabilidad de BBB se pueden monitorizar mediante la visualización directa y cuantificar por análisis de imagen asociado a RMN y son útiles en los métodos según se describe en este documento.

Evaluación de los inhibidores de Lp-PLA₂ en modelos de demencia vascular y la enfermedad de Alzheimer.

Los agentes que inhiben la Lp-PLA₂ se pueden evaluar en modelos de animales para el efecto en el alivio de la permeabilidad de BBB. Por ejemplo, se puede utilizar el modelo de porcino de hiperglicemia e hipercolesterolemia (HG/HC) según se describe en el presente documento, donde se altera la permeabilidad BBB, por ejemplo, la BBB es permeable, en la cual la permeabilidad de BBB se puede evaluar en el presente y la ausencia de inhibidores de Lp-PLA₂ por métodos comúnmente conocidos por las personas en la técnica. Los marcadores de la función de BBB se pueden utilizar, por ejemplo, según se describe en la Patente de EE.UU. 6,884,591.

Los agentes que inhiben la Lp-PLA₂ se pueden evaluar en modelos de animales de demencia vascular, lo que permite el análisis de los efectos de agentes inhibidores de Lp-PLA₂ en el desarrollo de demencia vascular y el tratamiento, así como la evaluación de las dosis de los fármacos en el desarrollo, el pronóstico y la recuperación de demencia vascular.

Los modelos de animales de demencia vascular incluyen, por ejemplo la oclusión de las arterias carótidas en ratas. Véase, por ejemplo, Sarti et al., Persistent impairment of gait performances and working memory after bilateral common carotid artery occlusion in the adult Wistar rat, BEHAVIOURAL BRAIN RESEARCH 136: 13-20 (2002). Por lo tanto, las lesiones de sustancia blanca cerebrovascular se pueden inducir experimentalmente en el cerebro de rata como resultado de la hipoperfusión cerebral crónica. Este modelo se crea mediante la oclusión permanente de ambas arterias carótidas comunes. Por ejemplo, las ratas Wistar se pueden anestésiar, las arterias carótidas comunes bilaterales están expuestas a través de una incisión cervical de la línea media y las arterias carótidas comunes son doblemente ligadas con suturas de seda bilateralmente. El flujo sanguíneo cerebral (CBF) luego se disminuye inicialmente por aproximadamente 30 a 50% del control después de la ligadura. Los valores de CBF más tarde van desde 40 a 80% del control después de aproximadamente 1 semana a aproximadamente 1 mes. También se han observado las interrupciones de la barrera hematoencefálica así como el aumento de la actividad metaloproteínasa de matriz en lesiones de sustancia blanca. Estos cambios parecen muy similares a las de las lesiones de sustancia blanca cerebrovasculares humanas. Por otra parte, estos resultados sugieren que las reacciones inflamatorias e inmunológicas desempeñan un papel en la patogénesis de los cambios de la materia blanca.

Estos cambios fisiológicos se correlacionan con problemas de aprendizaje y memoria en el modelo de rata con arteria carótida ocluida. Por lo tanto, el rendimiento del modo de andar de las ratas con arterias ocluidas disminuye con el tiempo en comparación con la línea base, por ejemplo, en y 90 días, las ratas con oclusión de la arteria carótida común bilateral han disminuido actuaciones en el reconocimiento de objetos y prueba de alternancia espontánea de laberinto en Y, en comparación con ratas operadas de manera simulada. Por lo tanto, este modelo en ratas de hipoperfusión cerebral crónica experimental por oclusión permanente de las arterias carótidas comunes bilaterales es útil como un modelo para las deficiencias de aprendizaje significativas junto con rarefacción de la materia blanca. Este modelo es una herramienta útil para evaluar la efectividad de los agentes que inhiben la Lp-PLA₂ en la fisiopatología de la hipoperfusión cerebral crónica, y proporcionar datos para la determinación de las dosis óptimas y regímenes de dosificación para la prevención de las lesiones por deterioro cognitivo y la materia blanca en pacientes con enfermedad cerebrovascular.

La eficacia de los agentes que inhiben la Lp-PLA₂ para tratar o prevenir la demencia vascular, por lo tanto, se puede determinar mediante la observación del funcionamiento del modo de andar, la memoria, habilidades de aprendizaje y la

incidencia y la gravedad de las lesiones de la sustancia blanca en ratas con oclusiones de la arteria carótida. Del mismo modo, la programación de dosificación y administración de inhibidores de Lp-PLA₂ se puede ajustar de acuerdo con la memoria y la capacidad de aprendizaje de los pacientes humanos que están siendo tratados para la demencia vascular.

5 La dosificación óptima de los agentes que inhiben la Lp-PLA₂ puede ser una que reduce la actividad y/o expresión de Lp-PLA₂, por ejemplo, la expresión reducida del ácido nucleico, por ejemplo ARNm codificado por el gen de Lp-PLA₂ o expresión reducida o actividad de la proteína Lp-PLA₂. Alternativamente, la dosis óptima de los agentes que inhiben la Lp-PLA₂ puede ser una que genere el efecto protector máximo en la prevención de una enfermedad o trastorno neurodegenerativo, o reduzca un síntoma de una enfermedad o trastorno neurodegenerativo.

10 La dosis óptima de agentes que inhiben la Lp-PLA₂ puede ser una que genere el máximo efecto beneficioso sobre el tejido dañado causado por la oclusión arterial. Una dosificación eficaz hace que al menos una atenuación estadística o clínicamente significativa de al menos un marcador, síntoma o evidencia histológica característicos de la demencia vascular.

15 Los marcadores, síntomas y evidencias histológicas característicos de la demencia vascular incluyen pérdida de memoria, confusión, alteraciones en el transporte axonal, desmielinización, la inducción de metaloproteinasas (MMPs), la activación de células gliales, la infiltración de linfocitos, edema y reacciones inmunológicas que conducen a daños en los tejidos y además lesión vascular. La estabilización de los síntomas o disminución del daño tisular, en condiciones en donde los pacientes o animales de control experimentan un empeoramiento de los síntomas o daños en los tejidos, es un indicador de la eficacia de un tratamiento supresivo.

20 Otras enfermedades neurodegenerativas con permeabilidad de BBB; Los agentes inhibidores de Lp-PLA₂ usando los agentes según se describe en el presente documento son útiles en la prevención y el tratamiento de enfermedades y trastornos neurodegenerativos. Ejemplos adicionales de enfermedades neurológicas y neurodegenerativas incluyen, por ejemplo, trastornos de repetición de poliglutamina tales como la enfermedad de Huntington, ataxias espinocerebelosas (por ejemplo, tipos 1, 2, 3, 6, 7 y 17), enfermedad de Machado- Joseph, atrofia muscular espinal y bulbar (SBMA o la enfermedad de Kennedy), Atrofia Dentatorubro-páldoluisiana (DRPLA) y otras condiciones neurológicas derivadas de expansiones de poliglutamina, o enfermedad que surge de las expansiones de repetición de ADN no codificante, tal como el síndrome del cromosoma X frágil, retraso mental frágil XE, ataxia de Friedreich, la distrofia miotónica, ataxias Espinocerebelosas (tipos 8, 10 y 12) u otras enfermedades neurodegenerativas como la atrofia muscular espinal (enfermedad de Werdnig-Hoffman, enfermedad Kugelberg-Welander), la enfermedad de Pick, y las encefalopatías espongiiformes.

35 Enfermedades neurodegenerativas adicionales para las que los agentes inhibidores de Lp-PLA₂ usando los agentes según se describe en el presente documento que pueden ser útiles incluyen, por ejemplo, deterioro de la memoria relacionado con la edad, demencia de grano argirofílico, complejo de Parkinson demencia de Guam, enfermedades autoinmunes (por ejemplo, síndrome de Guillain-Barre, lupus), enfermedad de Biswanger, tumores cerebrales y espinales (incluyendo neurofibromatosis), angiopatías cerebral amiloide, (Journal of Alzheimer's Disease vol 3, 65- 73 (2001)), parálisis cerebral, síndrome de fatiga crónica, degeneración corticobasal, condiciones debido a una disfunción del desarrollo del parénquima del SNC, las condiciones debido a una disfunción del desarrollo de la vasculatura cerebral, demencia multi-infarto, demencia-subcortical, la demencia con cuerpos de Lewy, demencia del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), la demencia que carece de distinta histología, Demencia Pugilística, ovillos neurofibrilares difusos con calcificación, enfermedades de los ojos, los oídos y los sistemas vestibulares que implican la neurodegeneración (incluyendo la degeneración macular y glaucoma), síndrome de Down, discinesias (paroxística), distonías, el temblor esencial, síndrome de Fahr, demencia frontotemporal y parkinsonismo ligado al cromosoma 17 (FTDP-17), la degeneración lobular frontotemporal, demencia del lóbulo frontal, la encefalopatía hepática, paraplejia espástica hereditaria, hidrocefalia, seudotumor cerebral y otras enfermedades relacionadas con las disfunción del CSF, la enfermedad de Gaucher, enfermedad Hallervorden-Spatz, síndrome de Korsakoff, deterioro cognitivo leve, amiotrofia monomérica, las enfermedades de las neuronas motoras, atrofia de múltiples sistemas, la esclerosis múltiple y otras enfermedades desmielinizantes (por ejemplo leucodistrofias), encefalomiелitis miálgica, mioclonías, neurodegeneración inducida por productos químicos, fármacos y toxinas, manifestaciones neurológicas del SIDA incluyendo demencia del SIDA, las manifestaciones cognitivas/neurológicas y consecuencias de las infecciones bacterianas y/o virus, incluyendo pero no limitado a enterovirus, la enfermedad de Niemann-Pick, enfermedad de la motoneurona no Guam con ovillos neurofibrilares, hiperglicemia no cetósica, atrofia olivo-ponto-cerebelosa, distrofia muscular oculofaríngea, manifestaciones neurológicas de la poliomiелitis incluyendo la poliomiелitis no paralítica y Síndrome post-polio, esclerosis lateral primaria, enfermedades priónicas incluyendo la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (incluyendo forma variante), kuru, insomnio familiar fatal, la enfermedad de Gerstmann-Straussler-Scheinker y otras encefalopatías espongiiformes transmisibles, angiopatía amiloide cerebral proteína priónica, parkinsonismo postencefalítico, atrofia muscular progresiva, parálisis progresiva bulbar, gliosis subcortical progresiva, parálisis supranuclear progresiva, síndrome de piernas inquietas, el síndrome de Rett, enfermedad de Sandhoff, espasticidad, demencia fronto-temporal esporádica, degeneración estriatonigral, panencefalitis esclerosante subaguda, la deficiencia de sulfito oxidasa, la corea de Sydenham, demencia causada solo por ovillos, enfermedad de Tay-Sach, síndrome de Tourette, la demencia vascular, y la enfermedad de Wilson.

Enfermedades neurodegenerativas adicionales, para agentes que inhiben la Lp-PLA₂ usando los agentes según se describe en este documento puede ser útil incluyen otras demencias no mencionadas anteriormente, tales como, pero sin limitación, otra demencia mixta, demencia frontotemporal, enfermedad de Pick, parálisis supranuclear progresiva (PSP), enfermedad de Parkinson con demencia asociada, degeneración corticobasal, atrofia sistémica múltiple, demencia inducida por el VIH, las demencias asociadas a la enfermedad de la materia blanca, deterioro cognitivo leve (MCI).

Los agentes inhibidores de Lp-PLA₂ usando los agentes según se describe en el presente documento pueden ser útiles en la prevención y el tratamiento de la permeabilidad de BBB en un sujeto. Otros ejemplos de enfermedades y trastornos en los que se produce la permeabilidad de BBB incluyen, por ejemplo, esclerosis múltiple, angiopatía amiloide cerebral, retinopatía diabética, trastornos por priones, la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), síndrome de la persona rígida, ataxias espinocerebelosa, Ataxia de Friedreich, Ataxia Telangiectasia, Atrofia bulboespinal (Síndrome de Kennedy), la atrofia muscular espinal, enfermedades de almacenamiento neuronal (lipofuscinosis), encefalomiopatías mitocondriales, leucodistrofias, secuelas neurales de shock medular/traumatismo cerrado, enfermedad hipertensiva cerebrovascular, tales como infartos lacunares, hemorragias de hendidura, Encefalopatía hipertensiva. La permeabilidad de BBB también se produce en los tumores cerebrales como aquellos con suministro vascular "sinusoidal" (también conocido como altos nutrientes).

La permeabilidad de BBB también se produce en secuelas neurológicas asociadas con infecciones por estreptococos; trastornos neuropsiquiátricos autoinmunes pediátricos asociados con infecciones por estreptococos (PANDAS), el síndrome de Tourette, trastorno compulsivo obsesivo (TOC). La permeabilidad de BBB también se produce en las siguientes enfermedades y trastornos; disfunción neuropsicológica después de la anestesia y los trastornos neuropsiquiátricos asociados con cualquier vasculopatía (por ejemplo, lupus, hipertensión, etc.). La permeabilidad de BBB también se produce en sujetos con infecciones (ya sea la entrada en el SNC, la propagación dentro del SNC, o la salida de la SNC a la infección establecida), por ejemplo, VIH, sífilis terciaria, Neuroborreliosis (enfermedad de Lyme), virus herpes simple tipo 1 (HSV-1)/virus herpes simple tipo 2 (VHS-2), Varicela-Zoster (Herpes Zoster), citomegalovirus, la poliomielitis, la rabia, leucoencefalopatía multifocal progresiva, panencefalitis esclerosante subaguda (post-sarampión), enfermedades por protozoos (toxoplasmosis, amebiasis y tripanosomiasis), infecciones por Rickettsia (tifus y la fiebre maculosa de las Montañas Rocosas), enfermedades metazoo, la malaria y la encefalitis/meningitis. La encefalitis/meningitis puede ser el resultado de la sepsis.

Los agentes inhibidores de Lp-PLA₂ usando los agentes según se describe en el presente documento pueden ser útiles en la prevención y/o tratamiento de la permeabilidad de BBB que ocurre en sujetos con o en riesgo de autismo. El autismo es un trastorno hereditario en gran medida que es caracterizado por la expresión de los déficits sociales, alteraciones del lenguaje y comportamientos estereotipados, repetitivos (American Psychiatric Association, 1994). Los estudios neuropatológicos y de neuroimagen han reportado aumento de tamaño y el peso del cerebro (Bailey et al., 1998; Kemper and Bauman, 1998; Sparks et al., 2002; Herbert et al., 2003; Palmen et al., 2004). Muchos estudios de cerebros autistas han informado de una reducción general en el tamaño celular y un aumento de la densidad de empaquetamiento de células, especialmente en el hipocampo, subiculum y la amígdala (Kemper and Bauman, 1993), lo que indica neuronas residentes tienen pequeños árboles dendríticos y posible maduración incompleta o desarrollo detenido.

La autoinmunidad puede contribuir a la patogénesis del autismo, donde el enlace de autoanticuerpos con neuronas altera el patrón normal de desarrollo neurológico en las etapas críticas. Los autoanticuerpos para el cerebro han sido reportados en niños autistas (Singh et al., 1988) y varios factores autoinmunes incluyendo autoanticuerpos específicos del cerebro (Gupta et al., 1996; Singh y Rivas, 2004), función de linfocitos alterada (Warren et al, 1996), la regulación de citoquinas anormal y asociaciones virales (Singh, 2001). Singh and Rivas (2004) han demostrado que el suero de los niños autistas alberga autoanticuerpos específicos del cerebro, y en 68 niños autistas de 4-12 años de edad, los anticuerpos para el núcleo caudado, se detectaron la corteza cerebral y el cerebelo en 49%, 18% y 9%, respectivamente, de los niños autistas, pero no en los niños normales.

Otro estudio ha demostrado que los niños con síndrome de Tourette poseen anticuerpos anti-estriatales, y la infusión experimental de estos anticuerpos en el cuerpo estriado de rata causó una disfunción neuronal similar al síndrome de Tourette en ratas (Hallet et al., 2000). Un vínculo fuerte entre la presencia de autoanticuerpos anti-neuronales y enfermedad neurológica ha demostrado más dramáticamente en los niños en los casos después de las infecciones por estreptococos, como en el trastorno obsesivo compulsivo (TOC), la corea de Sydenham, síndrome de Tourette, trastornos neuropsiquiátricos autoinmunes pediátricos asociados con estreptococos (PANDAS), paraneoplásica y en pacientes de edad avanzada con lupus eritematoso sistémico que muestran pérdida tanto cognitiva como de la memoria (Swedo et al., 1989; Kalume et al., 2004; Tanaka et al., 2004).

El acceso de los autoanticuerpos a neuronas dentro del cerebro, naturalmente, sería restringido por la integridad de la barrera hematoencefálica (BBB), al menos en individuos sanos normales. Los anticuerpos para acceder a las neuronas del cerebro, la barrera hematoencefálica puede ser defectuoso o retraso en el desarrollo. Un enlace entre el establecimiento de BBB en o cerca de seis meses de edad, el desarrollo del repertorio inmune normal del neonato y alteraciones en el neurodesarrollo en última instancia, puede conducir al autismo. Durante el período fetal tardío y primeros meses de vida, vías neuronales críticos que controlan la recepción de las señales ambientales y las vías de

respuesta individuales y apropiadas a estas señales se están estableciendo y refinando. Un retraso o defecto en el desarrollo en la formación de la BBB en este momento pueden permitir la exposición de las neuronas a autoanticuerpos antineuronales transmitidas por la sangre que podrían afectar el patrón normal de cableado neuronal, lo que lleva al autismo.

5

Evaluación de los inhibidores de Lp-PLA₂ en modelos de enfermedades neurodegenerativas y/o permeabilidad de BBB.

10

15

20

La idoneidad de un inhibidor de Lp-PLA₂ para el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa se puede evaluar en cualquiera de una serie de modelos de animales para la enfermedad neurodegenerativa. Por ejemplo, los ratones transgénicos para una repetición de poliglutamina expandida mutante de la ataxina-1 desarrollan ataxia típica de ataxia espinocerebelosa tipo 1 (SCA-1) son conocidos (Burrigh et al., 1995, *Cell* 82: 937-948; Lorenzetti et al., 2000, *Hum. Mol. Genet.* 9: 779-785; Watase, 2002, *Neuron* 34:905- 919), y se pueden utilizar para determinar la eficacia de un inhibidor de agente de Lp-PLA₂ para el tratamiento o prevención de la enfermedad neurodegenerativa. Los modelos en animales adicionales, por ejemplo, para la enfermedad de Huntington (véase, por ejemplo, Mangiarini et al., 1996, *Cell* 87: 493-506; Lin et al., 2001, *Hum. Mol. Genet.* 10: 137- 144), la enfermedad de Alzheimer (Hsiao, 1998, *Exp. Gerontol.* 33: 883-889; Hsiao et al., 1996, *Science* 274: 99-102), la enfermedad de Parkinson (Kim et al., 2002, *Nature* 418:50-56), esclerosis lateral amiotrófica (Zhu et al., 2002, *Nature* 417: 74-78), enfermedad de Pick (Lee & Trojanowski, 2001, *Neurology* 56 (Suppl. 4): S26-S30, y las encefalopatías espongiiformes (He et al., 2003, *Science* 299: 710-712) se puede utilizar para evaluar la eficacia de los agentes que inhiben la Lp-PLA₂ según se describe en el presente documento de una manera similar.

25

30

Los modelos de animales no se limitan a los modelos de mamíferos. Por ejemplo, las cepas de *Drosophila* proporcionan modelos aceptados para una serie de trastornos neurodegenerativos (Fortini & I Bonini, 2000, *Trends Genet.* 16: 161-167; Zoghbi & Botas, 2002, *Trends Genet.* 18: 463-471). Estos modelos incluyen no sólo las moscas que llevan genes de la mosca mutados, sino también moscas que llevan transgenes humanos, opcionalmente con mutaciones dirigidas. Entre los modelos de *Drosophila* están disponibles, por ejemplo, ataxias espinocerebelosas (por ejemplo, SCA-1 (véase, por ejemplo, WO 02/058626), SCA-3 (Warrick et al., 1998, *Cell* 93: 939-949)), la enfermedad de Huntington (Kazemi-Esfarjani & Benzer, 2000, *Science* 287: 1837-1840), enfermedad de Parkinson (Feany et al, 2000, *Nature* 404: 394-398; Auluck et al., 2002, *Science* 295: 809-8 10), neurodegeneración dependiente de la edad (Genetics, 2002,161:4208), la enfermedad de Alzheimer (Selkoe et al., 1998, *Trends Cell Biol.* 8: 447-453; Ye et al., 1999, *J. Cell Biol.* 146:1351-1364), la esclerosis lateral amiotrófica (Parkes et al., 1998, *Nature Genet.* 19: 171-174), y la adrenoleucodistrofia.

35

40

El uso de *Drosophila* como organismo modelo ha demostrado ser una herramienta importante en el esclarecimiento de las vías neurodegenerativas humanas, como el genoma de *Drosophila* contiene muchos ortólogos humanos pertinentes que están muy bien conservados en la función (Rubin, G.M., et al., *Science* 287: 2204-2215 (2000)). Por ejemplo, *Drosophila melanogaster* lleva un gen que es homólogo a la APP humana que está implicado en la función del sistema nervioso. El gen, similar a APP (APPL), es de aproximadamente 40% idéntica para APP695, la isoforma neuronal (Rosen et al., *Proc. Nati. Acad. Sci. U.S.A.* 86:2478-2482 (1988)), y como APP695 humana se expresa exclusivamente en el sistema nervioso. Las moscas deficientes para el gen de APPL muestran defectos de comportamiento que pueden ser rescatados por el gen APP humano, lo que sugiere que los dos genes tienen funciones similares en los dos organismos (Luo et al., *Neuron* 9:595-605 (1992)). Modelos de *Drosophila* para la enfermedad de Alzheimer se revelan en las solicitudes de patente de EE.UU. 2004/0244064, 2005/0132425, 2005/0132424, 2005/0132423, 2005/0132422, 2005/0132421, 2005/0108779, 2004/0255342, 2004/0255341, 2004/0250302.

45

50

55

Además, los modelos de *Drosophila* de enfermedades de repetición de poliglutamina (Jackson, G.R., et al., *Neuron* 21:633- 642 (1998); Kazemi-Esfarjani, P. and Benzer, S., *Science* 287:1837-1840 (2000); Fernandez- Funez et al., *Nature* 408:101-6 (2000)), la enfermedad de Parkinson (Feany, M.B. and Bender, W.W., *Nature* 404:394-398 (2000)) y otras enfermedades han establecido que imitan con detalle el estado de la enfermedad en los seres humanos en los niveles celulares y fisiológicos, y se han empleado con éxito en la identificación de otros genes que pueden estar implicados en estas enfermedades. Las moscas transgénicas muestran neurodegeneración progresiva, que puede conducir a una variedad de fenotipos alterados incluyendo fenotipos del aparato locomotor, fenotipos de comportamiento (por ejemplo, el apetito, el comportamiento de apareamiento, y/o duración de la vida), y fenotipos morfológicos (por ejemplo, la forma, el tamaño o la ubicación de un célula, órgano o apéndice, o el tamaño, la forma o la tasa de crecimiento de la mosca).

60

Los animales administrados con los compuestos son evaluados para los síntomas respecto a los animales no administrados con los compuestos. Un cambio que se puede medir en la gravedad de un síntoma (i.e. una disminución de al menos un síntoma, i.e. 10% o mayor disminución), o un retraso en la aparición de un síntoma, en los animales tratados con un inhibidor de Lp-PLA₂ en comparación con los animales no tratados es indicativo de la eficacia terapéutica.

65

Se puede evaluar a los animales para la memoria y el aprendizaje, por ejemplo mediante la realización de las pruebas de comportamiento. Se puede usar cualquier prueba de comportamiento para la memoria y el aprendizaje conocida comúnmente por una persona con experiencia normal en la técnica, pero no limitando a la prueba del laberinto de agua de Morris para los modelos de origen animal en roedores. Un aumento mensurable en la capacidad de realizar la prueba

del laberinto de agua de Morris en los animales administrados con un inhibidor de Lp-PLA₂ frente a los animales no tratados es indicativo de la eficacia terapéutica.

5 La idoneidad de un inhibidor de Lp-PLA₂ para el tratamiento de una enfermedad o trastorno de BBB se puede evaluar en cualquiera de una serie de modelos de animales donde se produce la anormalidad de BBB y/o permeabilidad de BBB. Un método que se puede utilizar es evaluar la capacidad de los componentes transportados por la sangre, tales como péptidos beta amiloide (Aβ) o Ig para cruzar la BBB e interactuar con las neuronas en el cerebro. Un método útil en los métodos según se describe en el presente documento para evaluar los componentes de transmisión sanguínea, tales como péptidos beta amiloide (Aβ) o Ig que cruzan la BBB utiliza Abeta42 fluorescente marcado, y se describe en
10 Clifford et al., 2007, Brain Research 1142: 223-236. En este método, se evaluó la capacidad de péptidos Aβ transmitidos por la sangre para cruzar una BBB defectuosa utilizando isotiocianato de fluoresceína (FITC) marcado con Aβ42 y Aβ40 introducidos a través de inyección en la vena de la cola en ratones con una BBB transformada permeable por tratamiento con toxina pertussis. Se mostró que tanto Aβ40 y Aβ42, cruza la BBB permeabilizada y unidas selectivamente a ciertos subtipos neuronales, pero no las células gliales, con las neuronas Aβ42 positivas dispersas en el cerebro 48 horas después de la inyección. Como control, los animales con BBB intacta (controles inyectados con solución salina) bloquearon la entrada de péptidos Aβ transmitidos por la sangre en el cerebro. Se puede usar dicho modelo de animales para evaluar la capacidad de un inhibidor de Lp-PLA₂ en la prevención o tratamiento de rotura de BBB o permeabilidad de BBB mediante la evaluación de las neuronas Aβ42-positivas en el cerebro, 48 horas después de la inyección de la toxina pertussis y Aβ42 marcada con FITC en la presencia o ausencia de un inhibidor de Lp-PLA₂.
15 Una disminución en las neuronas Aβ42-positivas en el cerebro en animales administrados con un inhibidor de Lp-PLA₂ en comparación con los animales no administrados con un inhibidor de Lp-PLA₂ indica que el inhibidor de Lp-PLA₂ es eficaz en el tratamiento y/o prevención de permeabilidad de BBB.

25 También se pueden utilizar otras moléculas traza en modelos de animales de la permeabilidad de BBB. Se puede detectar componentes marcados transmitidos por la sangre en el tejido cerebral, por ejemplo péptidos Abeta marcados con fluorescente o marcados con 35S, inmunoglobulina marcada con 125I o 35S (Ig), peroxidasa de rábano picante (HRP), Azul de Evans, microperlas fluorescentes o magnéticas (Sondas Moleculares) y dextranos de diferente peso molecular.

30 La toxina Pertussis se deriva de *Bordetella pertussis*, se sabe que aumenta eficazmente la permeabilidad de la BBB en ratones tan temprano como 24 h después de la inyección y durante un período de hasta varias semanas (Amiel, 1976; Bruckener et al., 2003), y probablemente se implica en el desarrollo de secuelas neurológicas asociadas con la tos ferina que están vinculados a la interrupción de BBB integridad en el epitelio del plexo coroideo y/o endotelio capilar cerebral. La toxina Pertussis también se ha utilizado para mejorar el desarrollo de la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), un modelo de ratón ampliamente utilizado para la esclerosis múltiple (Ben-Nun et al., 1997; Linthicum et al, 1982;.. Yong et al, 1993).

Formulaciones de composiciones

40 Los compuestos, por ejemplo, agentes inhibidores de Lp-PLA₂ según se describe en este documento, se pueden utilizar como un medicamento o usarse para formular una composición farmacéutica con uno o más de las utilidades reveladas en este documento. Se pueden administrar *in vitro* a las células en cultivo, *in vivo* a células en el cuerpo, o *ex vivo* a células fuera de un individuo que más tarde se puede devolver al cuerpo del mismo individuo o otra. Tales células se pueden desglosar o proporcionar como tejido sólido.

45 Los compuestos, por ejemplo, agentes inhibidores de Lp-PLA₂ según se describe en este documento se pueden utilizar para producir un medicamento u otras composiciones farmacéuticas. El uso de agentes inhibidores de Lp-PLA₂ que comprenden además un portador farmacéuticamente aceptable y composiciones que además comprenden componentes útiles para la entrega de la composición a un individuo son conocidos en la técnica. La adición de tales portadores y otros componentes a los agentes según se describe en el presente documento está suficientemente dentro del nivel de expertos en esta técnica.

50 Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar como una formulación adaptada para el paso a través de la barrera hematoencefálica o contacto directo con el endotelio. Las composiciones se pueden administrar como una formulación adaptada para la administración sistémica. Las composiciones se pueden administrar como una formulación adaptada para la entrega a órganos específicos, por ejemplo, pero no limitando al hígado, médula ósea, o la administración sistémica.

55 Alternativamente, las composiciones farmacéuticas se pueden adicionar al medio de cultivo de células *ex vivo*. Además del compuesto activo, tales composiciones pueden contener portadores farmacéuticamente aceptables y otros ingredientes conocidos para facilitar la administración y/o mejorar la absorción (por ejemplo, solución salina, sulfóxido de dimetilo, lípido, polímero, sistemas específicos dirigidos a células basados en la afinidad). La composición se puede incorporar en un gel, esponja, u otra matriz permeable (por ejemplo, formado como pellets o un disco) y se coloca en proximidad al endotelio para una liberación local, controlada. La composición se puede administrar en una sola dosis o
60 en dosis múltiples que se administran en diferentes momentos.

Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar por cualquier vía conocida. A modo de ejemplo, la composición puede ser administrada por vía mucosa, pulmonar, tópica, u otra vía localizada o sistémica (por ejemplo, enteral y parenteral). Las frases "administración parenteral" y "administrado por vía parenteral" como se utiliza en este documento, significa modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, normalmente por inyección, e incluye, sin limitación, inyección intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intraventricular, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, intracerebro espinal e intraesternal, infusión y otras técnicas de inyección o infusión, sin limitación. Las frases "administración sistémica", "administrado sistémicamente", "administración periférica" y "administrado periféricamente" como se utiliza en este documento significan la administración de los agentes según se describe en el presente documento de tal manera que entra en el sistema del animal y, por tanto, está sujeto al metabolismo y otros procesos como, por ejemplo, la administración subcutánea.

La frase "farmacéuticamente aceptable" se emplea en este documento para referirse a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que están, dentro del alcance del criterio médico, apropiados para uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, u otro problema o complicación, acorde con una relación beneficio/riesgo razonable.

La frase "portador farmacéuticamente aceptable" como se usa en el presente documento significa un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como una carga líquida o sólida, diluyente, excipiente, solvente o material encapsulante, implicado en llevar o transportar los agentes en cuestión de un órgano, o parte del cuerpo, a otro órgano, o parte del cuerpo. Cada portador debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación, por ejemplo, el portador no disminuye el impacto del agente en el tratamiento. En otras palabras, un portador es farmacéuticamente inerte.

Opciones apropiadas en cantidades y horarios de la dosis, formulación, y vías de administración se pueden hacer con los objetivos de lograr una respuesta favorable en el sujeto con la demencia vascular, por ejemplo, un sujeto con enfermedad de Alzheimer o un riesgo de los mismos (i.e. eficacia), y evitar la toxicidad y otros daños de la misma (i.e. la seguridad). Por lo tanto, "eficaz" se refiere a tales elecciones que implican manipulación rutinaria de las condiciones para lograr un efecto deseado.

Un bolo de la formulación administrado a un individuo durante un corto período de tiempo una vez al día es un horario de dosificación conveniente. Alternativamente, la dosis diaria eficaz puede ser dividida en múltiples dosis con fines de administración, por ejemplo, dos a doce dosis por día. Los niveles de dosificación de ingredientes activos en una composición farmacéutica también se puede variar a fin de lograr una concentración transitoria o sostenida del compuesto o derivado del mismo en un individuo, especialmente en y alrededor del endotelio vascular del cerebro, y para dar como resultado la respuesta terapéutica deseada o protección. Pero también está dentro de la experiencia de la técnica comenzar con dosis a niveles inferiores a los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se logre el efecto deseado.

La cantidad de agentes inhibidores de Lp-PLA2 administrados depende de factores conocidos por una persona experta en la técnica tales como bioactividad y biodisponibilidad del compuesto (por ejemplo, la vida media en el cuerpo, estabilidad, y metabolismo); propiedades químicas del compuesto (por ejemplo, peso molecular, hidrofobicidad, y solubilidad); ruta y la programación de administración, y similares. También se entenderá que el nivel de dosis específica a lograr para cualquier individuo particular puede depender de una variedad de factores, incluyendo la edad, el género, la salud, historial médico, peso, combinación con uno o más de otros fármacos, y la gravedad de la enfermedad.

El término "tratamiento", con respecto al tratamiento de la demencia vascular, o la enfermedad de Alzheimer o una enfermedad asociada con BBB defectuosa se refiere a, entre otras cosas, la prevención del desarrollo de la enfermedad, o alteración del curso de la enfermedad (por ejemplo, pero no limitando a, retardar la progresión de la enfermedad), o revertiendo un síntoma de la enfermedad o la reducción de uno o más síntomas y/o uno o más marcadores bioquímicos en un sujeto, la prevención de uno o más síntomas de empeoramiento o progresión, promoviendo la recuperación o mejora del pronóstico, y/o la prevención de la enfermedad en un sujeto que está libre de los mismos, así como retrasar o reducir la progresión de la enfermedad existente. En un sujeto dado, se pueden determinar la mejora en un síntoma, su empeoramiento, regresión, o progresión, mediante una medición objetiva o subjetiva. La modificación de uno o más marcadores bioquímicos, por ejemplo la permeabilidad, la presencia de Ig extravascular en el cerebro, o beta amiloide en el CSF, por ejemplo, se puede medir.

La eficacia del tratamiento se puede medir como una mejora en la morbilidad o la mortalidad (por ejemplo, el alargamiento de la curva de supervivencia de una población seleccionada). También se consideran tratamiento, los métodos profilácticos (por ejemplo, prevenir o reducir la incidencia de recaídas).

El tratamiento también puede implicar la combinación con otros modos existentes de tratamiento, por ejemplo agentes existentes para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, por ejemplo, pero no se limitan a ARICEPT o donepezil,

COGNEX o tacrina, EXELON o rivastigmina, REMINYL o galantamina, vacuna antiamiloides, terapias de bajada de Abeta, ejercicio mental o estimulación; véase para su revisión Zlokovic, Adv. Drug Deliv. Rev. 54:1533-1660, 2002).

5 Los agentes que inhiben Lp-PLA₂ según se describe en este documento se pueden combinar con otro agente, por ejemplo agente terapéutico para prevenir y/o tratar enfermedades neurodegenerativas. Tales agentes pueden ser cualquier agente actualmente en uso o que se está desarrollando para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad o trastorno neurodegenerativo, donde el agente puede tener un efecto profiláctico y/o uno curativo y/o reducir un síntoma de una enfermedad o trastorno neurodegenerativo.

10 Cuando los agentes inhibidores de Lp-PLA₂ según se describe en el presente documento se utilizan para la prevención y/o tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y/o la demencia vascular, los agentes inhibidores de Lp-PLA₂ según se describe en el presente documento se pueden usar en combinación con medicamentos conocidos comúnmente por persona de habilidad normal en la técnica que se reivindican por ser útiles como tratamientos sintomáticos de la demencia. Ejemplos de tales medicamentos incluyen, pero no se limitan a, agentes conocidos por modificar la transmisión colinérgica tales como moduladores alostéricos o agonistas del receptor muscarínico M1, antagonistas muscarínicos M2, inhibidores de la acetilcolinesterasa (tales como tetrahydroaminoacridina, donepezil, galantamina y rivastigmina), agonistas de los receptores nicotínicos o moduladores alostéricos (tales como moduladores alostéricos o agonistas $\alpha 7$ o moduladores alostéricos o agonistas de $\alpha 4\beta 2$), agonistas de los receptores activados por el proliferador de peroxisomas (PPAR) (tales como agonistas PPAR γ), agonistas parciales de los receptores 5-HT₄, antagonistas de histamina H₃ y agonistas inversos, antagonistas del receptor 5-HT₆ o antagonistas de los receptores 5HT_{1A}, los moduladores positivos de AMPA (alfa-amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propionato, un subtipo de receptor de glutamato) y antagonistas o moduladores del receptor del ácido N-metil-D-aspartico (NMDA) (tales como memantina).

25 Cuando los agentes inhibidores de Lp-PLA₂ según se describe en este documento se utilizan para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, los agentes inhibidores de Lp-PLA₂ según se describe en este documento pueden ser utilizados en combinación con los medicamentos mencionados anteriormente que se reivindican por ser útiles como tratamientos sintomáticos de la demencia y/o agentes modificadores de la enfermedad. Los agentes modificadores de la enfermedad incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a los moduladores e inhibidores de la gamma secretasa, e inhibidores de beta-secretasa humana (BACE). Agentes modificadores de la enfermedad también son, por ejemplo pero no limitan a inhibidores y moduladores de la gamma secretasa, inhibidores beta-secretasa (BACE) y cualquier otro enfoque anti-amiloides, incluyendo la inmunización activa y pasiva, por ejemplo agentes identificados por los métodos según se revela en la Solicitud de la Patente de EE.UU. 2005/0170359, así como agentes según se revela en las solicitudes de patente internacional WO05/07277, WO03/104466 y WO07/028133, y la Patente de EE.UU. 6,866,849, 6,913,745.

35 Por lo tanto, se puede practicar el tratamiento de combinación con uno o más agentes que inhiben la Lp-PLA₂ con uno o más de otros procedimientos médicos.

40 Además, el tratamiento también puede comprender múltiples agentes para inhibir la expresión o actividad de Lp-PLA₂. Por ejemplo, otros agentes incluyen el uso de estatinas con Niacina (véase (véase <http://www.genengnews.com/news/bnitem.aspx?name=6724568>) y fenofibrato (véase <http://www.genengnews.com/news/bnitem.aspx?name=14817756&taxid=19>)

45 Del mismo modo, el diagnóstico se puede practicar con otros procedimientos de diagnóstico. Por ejemplo, el endotelio del sistema vascular, el cerebro o la médula espinal (por ejemplo, sangre o vasos leptomeníngicos) se pueden ensayar para un cambio en los perfiles de expresión génica utilizando kits de diagnóstico molecular de enfermedades específicas (por ejemplo, las matrices a medida, multiplex QPCR, matrices proteómicas multiplex). Además, se puede utilizar un procedimiento de diagnóstico no invasivo (por ejemplo, CAT, RMN, SPECT, PET o) en combinación para mejorar la exactitud y/o la sensibilidad del diagnóstico. El diagnóstico precoz y fiable es especialmente útil para los tratamientos que sólo son eficaces para enfermedad de Alzheimer leve a moderada o solamente retrasar su progresión.

55 La cantidad que se administra a un sujeto es preferiblemente una cantidad que no induce efectos tóxicos que superen las ventajas que resultan de su administración. Otros objetivos son reducir en número, disminuir en severidad, y/o de otra manera aliviar el sufrimiento de los síntomas de la enfermedad en el individuo en comparación con las normas reconocidas de la atención.

60 La producción de compuestos de acuerdo con las regulaciones actuales se regulará por las buenas prácticas de laboratorio (GLP) y buenas prácticas de manufactura (GMP) de los organismos gubernamentales (por ejemplo, la U.S. Food and Drug Administration). Esto requiere el mantenimiento de registros exactos y completos, así como el seguimiento de QA/QC. También se prevé la supervisión de los protocolos de los pacientes por parte de organismos y paneles institucionales, para asegurar que se obtenga el consentimiento informado; seguridad, bioactividad, dosis apropiada y eficacia de los productos son estudiados en fases; los resultados son estadísticamente significativos; y se siguen las directrices éticas. Se requiere la supervisión de protocolos similares utilizando modelos de animales, así como el uso de sustancias químicas tóxicas, y cumplimiento de la normativa.

65

Las dosis, las formulaciones, los volúmenes de dosificación, los regímenes, y métodos para analizar los resultados dirigidos a inhibir la expresión y/o actividad de Lp-PLA₂ pueden variar. Por lo tanto, las dosificaciones eficaces mínimas y máximas varían dependiendo del método de administración. La supresión de los cambios clínicos e histológicos asociados con la demencia vascular pueden ocurrir dentro de un intervalo de dosificación específico, que, sin embargo, varía dependiendo del organismo que recibe la dosis, la vía de administración, si los agentes que inhiben la Lp-PLA₂ se administran en combinación con otras moléculas co-estimuladoras, y el régimen específico de administración del inhibidor de Lp-PLA₂. Por ejemplo, en general, la administración nasal requiere una dosis menor que oral, enteral, rectal, o administración vaginal.

Para las formulaciones oral o enteral, los comprimidos se pueden formular de acuerdo con procedimientos convencionales que emplean portadores sólidos bien conocidos en la técnica. Las cápsulas empleadas para formulaciones orales se pueden hacer de cualquier material farmacéuticamente aceptable, tal como gelatina o derivados de celulosa. También se contemplan, los sistemas de entrega de liberación sostenida oral y/o recubrimientos entéricos para las formas de dosificación administradas por vía oral, tales como los descritos en la Patente de EE.UU. No. 4,704,295, "Enteric Film-Coating Compositions", publicada el 03 de noviembre, 1987; La patente de EE.UU. No. 4,556,552, "Enteric Film-Coating Compositions", publicada el 03 de diciembre, 1985; Patente de Estados Unidos No. 4,309,404, "Sustained Release Pharmaceutical Compositions", publicada el 05 de enero, 1982; y la Patente de EE.UU. No. 4,309,406, "Sustained Release Pharmaceutical Compositions", publicada el 05 de enero, 1982.

Los ejemplos de portadores sólidos incluyen almidón, azúcar, bentonita, sílica y otros portadores de uso común. Otros ejemplos no limitantes de vehículos y diluyentes que se pueden usar en las formulaciones descritas incluyen solución salina, jarabe, dextrosa, y agua.

Formulación recubierta entérica

En cuanto a las formulaciones para la administración de las pequeñas entidades químicas para los inhibidores de Lp-PLA₂ del tipo de fórmulas (I) - (IV), según se describe en el presente documento, un ejemplo particularmente útil es una formulación de comprimido que comprende el inhibidor de Lp-PLA₂ con una cubierta de polímero entérico. Un ejemplo de tal preparación se puede encontrar en el documento WO2005 / 021002. El material activo en el núcleo puede estar presente en una forma micronizada o solubilizada. Además de materiales activos el núcleo puede contener aditivos convencionales en la técnica de elaboración de comprimidos. Los aditivos apropiados en tal comprimido pueden comprender diluyentes tales como lactosa anhidra, lactosa monohidrato, carbonato de calcio, carbonato de magnesio, fosfato dicálcico o mezclas de los mismos; aglutinantes tales como celulosa microcristalina, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxipropil-celulosa, polivinilpirrolidona, almidón pregelatinizado o goma de acacia o mezclas de los mismos; disgregantes tales como celulosa microcristalina (cumpliendo funciones tanto de aglutinante como de desintegrante) polivinilpirrolidona reticulada, glicolato sódico de almidón, croscarmelosa de sodio o mezclas de los mismos; lubricantes, tales como estearato de magnesio o ácido esteárico, agentes de deslizamiento o auxiliares de flujo, tales como sílica coloidal, talco o almidón, y estabilizadores tales como la sílica amorfa de desecación, agentes colorantes, sabores, etc. Preferiblemente, el comprimido comprende lactosa como diluyente. Cuando un aglutinante está presente, preferiblemente es la hidroxipropilmetilcelulosa. Preferiblemente, el comprimido comprende estearato de magnesio como lubricante. Preferiblemente, el comprimido comprende croscarmelosa sódica como disgregante. Preferiblemente, el comprimido comprende celulosa microcristalina.

El diluyente puede estar presente en un rango de 10 - 80% en peso del núcleo. El lubricante puede estar presente en un rango de 0.25 a 2% en peso del núcleo. El desintegrante puede estar presente en un rango de 1 - 10% en peso del núcleo. La celulosa microcristalina, si está presente, puede estar presente en un rango de 10 - 80% en peso del núcleo.

El ingrediente activo comprende preferiblemente entre 10 y 50% del peso del núcleo, más preferiblemente entre 15 y 35% del peso del núcleo. (Calculado como base libre equivalente). El núcleo puede contener cualquier nivel de dosificación terapéuticamente apropiado del ingrediente activo, pero contiene preferiblemente hasta 150 mg como base libre del ingrediente activo. Se prefiere particularmente, que el núcleo contenga 20, 30, 40, 50, 60, 80 o 100 mg como base libre del ingrediente activo. El ingrediente activo puede estar presente como la base libre, o como cualquier sal farmacéuticamente aceptable. Si el ingrediente activo está presente como una sal, el peso se ajusta de manera que el comprimido contenga la cantidad deseada del ingrediente activo, calculado como base libre de la sal. Preferiblemente, el ingrediente activo está presente como una sal de clorhidrato.

El núcleo puede estar hecho de una mezcla compactada de sus componentes. Los componentes se pueden comprimir directamente, o se pueden granular antes de la compresión. Tales gránulos se pueden formar mediante un proceso de granulación convencional como se conoce en la técnica. Alternativamente, los gránulos pueden ser recubiertos individualmente con una cubierta entérica, y luego ser encerrados en una cubierta de cápsula estándar.

El núcleo está rodeado por una cubierta que comprende un polímero entérico. Ejemplos de polímeros entéricos son acetato ftalato de celulosa, acetato de celulosa succinato, ftalato de metilcelulosa, ftalato de etilhidroxilcelulosa, ftalato de polivinilacetato, acetato de polivinilbutirato, copolímero de anhídrido maleico-acetato de vinilo, copolímero de estireno-maleico monoéster, copolímero de ácido metacrílico- metil acrilato o copolímero de metacrilato - ácido metacrílico-

5 acrilato de octilo. Estos pueden ser usados solos o en combinación, o junto con otros polímeros distintos de los mencionados anteriormente. La cubierta también puede incluir sustancias insolubles que no se descomponen ni solubilizan en organismos vivos, tales como derivados de celulosa de alquilo tal como etil celulosa, polímeros reticulados tales como copolímero de estireno-divinilbenceno, polisacáridos que tienen grupos hidroxilo, tales como dextrano, derivados de celulosa que se tratan con agentes de reticulación bifuncionales tales como epiclorhidrina, diclorhidrina o 1, 2, 3, 4-diepoxibutano. La cubierta también puede incluir almidón y/o dextrina.

10 Los materiales de recubrimiento entérico preferidos son los polímeros entéricos Eudragit® comercialmente disponibles, tales como Eudragit® L, Eudragit® S y Eudragit® NE, utilizado solos o con un plastificante. Tales recubrimientos se aplican normalmente usando un medio líquido, y la naturaleza del plastificante depende de si el medio es acuoso o no acuoso. Los plastificantes para uso con un medio acuoso incluyen propilenglicol, citrato de trietilo, citrato de acetil trietilo o Citroflex® o Citroflex® A2. Los plastificantes no acuosos incluyen estos, y también ftalato de dibutilo y de dietilo y sebacato de dibutilo. Un plastificante preferido es el citrato de trietilo. La cantidad de plastificante incluido será evidente para los expertos en la técnica.

15 La cubierta también puede incluir un agente anti-adherente tal como talco, sílica o monoestearato de glicerilo. Preferiblemente, el agente antiadherente es monoestearato de glicerilo. Por lo general, la cubierta puede incluir aproximadamente 5-25% en peso de plastificante y hasta aproximadamente 50% en peso de agente anti-adherente, preferiblemente 1-10% en peso de agente anti-adherente.

20 Si se desea, un surfactante se puede incluir para ayudar con la formación de una suspensión acuosa del polímero. Muchos ejemplos de posibles surfactantes son conocidos por el experto en la técnica. Los ejemplos preferidos de surfactantes son polisorbato 80, polisorbato 20, o laurilsulfato de sodio. Si está presente, un surfactante puede formar 0.1 - 10% de la cubierta, preferiblemente de 0.2 - 5% y particularmente preferiblemente de 0.5 a 2%

25 Puede haber una capa de sellado incluida entre el núcleo y el recubrimiento entérico. Una capa de sellado es un material de recubrimiento que se puede utilizar para proteger la cubierta entérica de un posible ataque químico por cualquier ingrediente alcalino en el núcleo. La capa de sellado también puede proporcionar una superficie más lisa, permitiendo de ese modo una fijación más fácil de la cubierta entérica. Un experto en la técnica sería consciente de recubrimientos apropiados. Preferiblemente, la capa de sellado está hecha de un recubrimiento de Opadry, y se prefiere particularmente el Opadry White OY-S-28876.

30 En una realización, el ingrediente farmacéuticamente activo es 1-(N-(2-(dietilamino)etil)-N-(4-(4-trifluorometilfenil)bencil)aminocarbonilmetil)-2-(4-fluorobencil)tio-5,6-trimetilenopirimidin-4-ona, o una sal del mismo.

35 Un ejemplo de una formulación de este tipo con recubrimiento entérico, según se describe en WO2005 / 021002, comprende cantidades variables de 1-(N-(2-(dietilamino)etil)-N-(4-(4-trifluorometilfenil)bencil)aminocarbonilmetil)-2-(4-fluorobencil) tio-5,6-trimetilenopirimidin-4-ona (llamado "activo" en este ejemplo) como la sal de clorhidrato.

40 En ese ejemplo, la lactosa monohidrato, la celulosa microcristalina, el ingrediente activo, la hidroxipropil metil celulosa y la mitad de la croscarmelosa sódica se filtraron en un mezclador de alta cizalla Fielder de 10 Litros (cualquier mezclador de alta cizalla apropiado podría ser utilizado) y se mezclaron durante 5 minutos a 300 rpm con el cortador apagado. A continuación, la mezcla se granuló mediante la adición de aproximadamente 750 ml de agua mientras se continúa en la mezcladora. Los gránulos se secaron en un secador de lecho fluido Glatt 3/5, adaptado por Comil en un mezclador con depósito de 5 Litros Pharmatec y a continuación se mezcla con cualquier lactosa anhidra dada en la fórmula más el restante de la croscarmelosa sódica durante 5 minutos a 20 rpm. El estearato de magnesio se tamizó en el mezclador y el proceso de mezcla continuó durante 1 minuto a 10 rpm. La mezcla lubricada se comprime mediante una prensa de comprimidos giratoria Riva Piccola equipada con punzones convexos normales redondos de 9.5mm (cualquier prensa de comprimidos apropiada podría ser utilizada). El recubrimiento de sellado, y posteriormente el recubrimiento entérico, se aplican por pulverización de una suspensión acuosa de los ingredientes del recubrimiento en un dispositivo de recubrimiento Manesty 10, utilizando los parámetros para el proceso de recubrimiento según lo recomendado por los fabricantes de los polímeros de recubrimiento (de nuevo, cualquier dispositivo de recubrimiento apropiado podría ser utilizado).

55 Otras preparaciones con recubrimiento entérico de este tipo pueden ser preparados por un experto en la técnica, utilizando estos materiales o sus equivalentes.

EJEMPLOS

60 Los ejemplos presentados en el presente documento se refieren a los métodos y composiciones para la prevención y/o tratamiento de trastornos neurodegenerativos, por ejemplo, pero no limitando a la demencia vascular y trastornos de la barrera hematoencefálica, por ejemplo enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson mediante la inhibición de Lp-PLA₂. A lo largo de esta solicitud, se hace referencia a diversas publicaciones. Los siguientes ejemplos no están destinados a limitar el alcance de las reivindicaciones a la invención, sino más bien están

destinados a ser ejemplares de ciertas realizaciones. Cualquier variación en los métodos ilustrados que se produzca por el experto está destinada a caer dentro del alcance de la presente invención.

Métodos

5

Modelo en animales: Un modelo en cerdos hipercolesterolémicos diabéticos/diabéticos (DM/HC) fue desarrollado que imita aterosclerosis similar a humanos. Los cerdos de granja que pesan 25-30 kg y de edades comprendidas ~ 4 meses se hicieron diabéticos con una sola inyección intravenosa de 125 mg/kg de estreptozotocina (Sicor Pharmaceuticals, Irvine, CA). Después de la estabilización durante 1-2 semanas, los animales con niveles elevados de glucosa en plasma (> 150 mg / dl) fueron alimentados con dieta aterogénica (alto contenido de grasa), como se muestra en la Tabla 1 (Animal Specialties, Quakertown, PA) para lograr un nivel de colesterol de aproximadamente 250-800 mg/dl. Mantenimiento del nivel de colesterol se determinó por el método como se muestra en la Tabla 2.

10

Tabla 1. Dieta para 2.0% de colesterol de dieta, los componentes son:

15

Componente	% Peso/Peso
Purina * comida para cerdos en crecimiento	47.5 %
Manteca de cerdo	25.0 %
Caseína	11.1 %
Leche entera secada	7.9 %
Aceite de cacahuete	2.37 %
Colesterol	2.0 %
Mezcla de sal Wesson	2.37 %
Purina * mezcla de vitaminas	1.58 %
Colato de sodio	1.58 %
Carbonato de calcio	0.4 %
Cloruro de colina	0.2 %

* Purina Mills, LLC, Plaza de tablero de ajedrez, St. Louis, Missouri, 63164, EE.UU.. Estos alimentos fueron preparados por Animal Specialties and Provisions, LLC, Quakertown, PA USA..

20

Para la dieta al 0.5% de colesterol, los componentes son similares con la excepción de 0.5% de colesterol y 20% de manteca de cerdo. Los animales fueron cerdos Yorkshire machos castrados a la edad de 3-5 y se obtuvieron de Archer Farms, Darlington, MD. Estos alimentos fueron preparados por Animal Specialties y Provisions, LLC, Quakertown, PA USA.

25

En los días 1-2, los animales fueron alimentados con pienso normal, en los siguientes días 3-14, los animales fueron alimentados con una dieta al 0.5% de colesterol, en el día 14, se midieron los niveles de colesterol y la dieta se ajustó según el caso para aumentar a 2% de colesterol, 10% de manteca de cerdo si el colesterol es <300 mg/dl. Después de la inducción de DM/HC, se midió el colesterol hasta que los niveles de colesterol son estables entre 300 y 800 mg/dl, y luego de la estabilización del colesterol, el colesterol se midió mensualmente. Si los niveles de colesterol eran inestables se siguió la fase inicial de estabilización, la dieta del animal se regresó a la programación inicial de medición de dos semanas. Los niveles de colesterol se determinaron mensualmente, incluyendo los niveles de colesterol total, LDL, HDL, VLDL y triglicéridos. El ajuste de la dieta del animal para un nivel colesterol estable se determinó de acuerdo con los perfiles mostrados en la Tabla 2.

30

Tabla 2. Ajuste de dieta y colesterol.

Nivel de colesterol	Ajuste de la dieta	Siguiente medición	Nivel de colesterol	Ajuste de la dieta	Siguiente medición de colesterol
<250 mg/dl	Cambio a dieta al 25% de manteca de cerdo.	2 semanas	<300 mg/dl	Continuar dieta al 25% de manteca de cerdo	2 semanas
			300-800 mg/dl	Cambio a dieta 75% de manteca de cerdo (25% de manteca de cerdo): 25% dieta normal	2 semanas
			>800 mg/dl	Cambio a dieta 100%, 10% de manteca de cerdo	2 semanas
			>1000 mg/dl	Cambio a dieta mezcla 50:50 de 10% de manteca de cerdo	2 semanas
			>1500 mg/dl	Cambio a dieta normal	2 semanas*

ES 2 540 933 T3

Nivel de colesterol	Ajuste de la dieta	Siguiente medición	Nivel de colesterol	Ajuste de la dieta	Siguiente medición de colesterol
300-800 mg/dl	Sin cambio. dieta a 10% de manteca de cerdo	2 semanas	< 300 mg/dl	Cambio a dieta al 25% de manteca de cerdo	2 semanas
			300-800 mg/dl	Sin cambio	Programación regular
			>800 mg/dl	Cambio a mezcla 50:50 con 10% de manteca de cerdo	2 semanas
			>1000 mg/dl	Cambio a mezcla 25:75 con 10% de manteca de cerdo	2 semanas
			>1500 mg/dl	Pienso normal	2 semanas
800-1000 mg/dl	Cambio a dieta mezcla 50:50 de 10% de manteca de cerdo y pienso normal.	2 semanas	< 300 mg/dl	Cambio a dieta 25:75 mezcla con 10% de manteca de cerdo	2 semanas
			300-800 mg/dl	Sin cambio en dieta (50:50) 10% de manteca de cerdo	2 semanas
			>800 mg/dl	Cambio a mezcla 25:75 (10% de manteca de cerdo)	2 semanas
			>1000 mg/dl	Cambio a mezcla 25:75 (10% de manteca de cerdo)	2 semanas
			>1500 mg/dl	Pienso normal	2 semanas*
>1000 mg/dl	Dieta mezcla 25:75 de 10% de manteca de cerdo y pienso normal.	2 semanas	< 300 mg/dl	Cambio a dieta mezcla 50:50 de 10% de manteca de cerdo y pienso normal.	2 semanas
			300-800 mg/dl	Sin cambio en dieta mezcla 25:75 de dieta al 10% de manteca de cerdo y pienso normal	2 semanas
			>800 mg/dl	Sin cambio en dieta	2 semanas
			>1000 mg/dl	Pienso normal	2 semanas*
			>1500 mg/dl	Pienso normal	2 semanas*
>1500 mg/dl	Dieta pienso normal.	2 semanas	< 300 mg/dl	Cambio a dieta de 100% de 10% de manteca de cerdo.	2 semanas
			300-800 mg/dl	Cambio dieta a mezcla 50:50 de dieta al 10% de manteca de cerdo y pienso normal	2 semanas
			>800 mg/dl	Pienso normal	2 semanas*
			>1000 mg/dl	Pienso normal	2 semanas*
			>1500 mg/dl	Pienso normal	2 semanas*

En un mes después de la estabilización del colesterol a 250-800 mg/dl, los animales fueron asignados al azar en dos grupos experimentales, grupo DM/HC (hiperglicemia e hipercolesterolemia) sin tratamiento y grupo con tratamiento (10 mg/kg/día de SB -480 848, también conocido como 1-(N-(2-(dietilamino)etil)-N-(4-(4-trifluorometilfenil)bencil)-aminocarbonilmetil)- 2-(4-fluorobencil)tio-5,6-trimetilenopirimidin-4-ona). Los animales se sacrificaron a los 6 meses después de la aleatorización. El protocolo de los animales ha sido aprobado por el Comité de Cuidado y Uso de Animales Institucional de la Universidad de Pennsylvania.

Se evaluaron dos grupos diabéticos/ hipercolesterolémicos: 1. grupo DM/HC y 2. animales DM/HC que reciben inhibidores de Lp-PLA₂. Los experimentos incluyeron: el grupo de control (grupo DM/HC - 17 cerdos) y el grupo experimental (animales DM/HC que reciben inhibidores de Lp-PLA₂ - 20 cerdos). Además se mantuvieron los niveles de colesterol en sangre entre 300 y 800 mg/dl en los animales de experimentación, se ha determinado este rango para proveer un mejor modelo de prueba. Los niveles de colesterol en sangre se monitorizaron en todos los animales cada dos meses, como se muestra en la Tabla 4 y se hicieron ajustes para el contenido de grasa de la alimentación según el caso, como se muestra en la Tabla 2. El porcentaje de colesterol y la manteca de cerdo estuvieron en el rango de 0.5-2 % y 10-25%, respectivamente, y todos los animales recibieron alimentación que contenía la concentración de colesterol y manteca de cerdo dentro de ese rango. Las muestras de sangre se obtuvieron al inicio del estudio, 1 mes, 3 meses y 6 meses. Cada vez se obtuvo menos de 1 ml/kg de sangre. En el ensayo de nivel de colesterol en la sangre bimestrales, se pusieron a prueba los niveles de colesterol total, LDL, HDL, VLDL y triglicéridos, glucosa en sangre, la Lp-PLA₂ y células de médula ósea primaria (PBMCs) (véase Tabla 4).

El número de animales, seleccionado para justificar el requisito mínimo para la validez estadística fueron 2 grupos de animales por experimento, de la siguiente manera: 1. Grupo de control (n = 17); Diabético e hiperlipidémico; 2. Grupo experimental (n = 20), diabético, hiperlipidémico que recibe 10 mg/kg del inhibidor de Lp-PLA₂, como se muestra en la Tabla 3.

Los cerdos de granja domésticos, jabalíes Yorkshire, que varían en peso entre 25-35 kg fueron adquiridos de una granja local y se colocaron en un alojamiento interior bajo el cuidado de un veterinario. Ellos fueron castrados 3-5 días antes de la fecha de inicio del estudio. Los cerdos de prueba se hicieron diabéticos mediante la infusión de una dosis de estreptozocina (125 mg/kg) IV, en un periodo de 30 min. Si los animales no se vuelven diabéticos, se administró una segunda dosis de (50 mg/kg). Para evitar la posible aparición de hipoglicemia inicial, se adicionaron 20 g de polvo de glucosa a la alimentación para el primero 2. La glucosa en sangre se midió usando un glucómetro cada día antes de la alimentación durante los primeros 14 días y luego una vez a la semana.

Los animales de ensayo fueron alojados por separado de los animales de control, para evitar la transferencia entre los animales del fármaco debido a coprofagia. Todos los animales fueron alimentados con una dieta aterogénica dos veces al día con libre acceso al agua. La dieta a medida contenía 0.5 y 2% de colesterol y 10 y 25% de manteca de cerdo, los componentes de los cuales se muestra en la Tabla 1.

Tabla 3. Programación de los animales y los procedimientos (dividido en 2 grupos):

	Número animal	Cronología
Grupo 1: DM/HC	N=20	7 meses
Grupo 2: DM/HC que reciben inhibidor de Lp-PLA ₂	N = 17	7 meses
Total	N=37	7 meses

Tabla 4. Resumen de Procedimientos

	Inicio	28 d	57 d	85 d	113 d	141 d	168 d	196 d
Suero de glucosa, LDL, HDL, triglicéridos	X	X	X	X	X	X	X	X
Lp-PLA ₂ (suero-EDTA congelado)	X	X	X	X	X	X	X	X
PBMCs	X		X		X			X
Cultivo de tejidos								X

La dosificación diaria se inició el día 29, momento en el cual a cada animal de ensayo se le administró una dosis diaria de 10 mg/kg de SB-480848 (dado como bolo equivalente de comida para perros). Los animales fueron NPO desde la medianoche anterior. Los animales fueron sacrificados en el día 196 y los tejidos se cultivaron inmediatamente.

Preparación del tejido de cerebro. Todo el cerebro se retiró dentro de una hora, después de que los animales se sacrificaran. El hemisferio derecho se fijó en formalina al 10% durante al menos una semana. Los tejidos cerebrales fueron entonces cortados en rodajas y embebidos en parafina. De cada animal, se generaron un total de ~ 11 bloques de tejido (véase ilustración) para inmunohistoquímica (IHC). Del hemisferio izquierdo, la corteza cerebral (de múltiples ubicaciones), el hipocampo y tronco cerebral fueron preservados para el análisis de ARN y proteínas.

Tejido cerebral humano post-mortem utilizado para comparar con tejido cerebral porcino. El hipocampo y la corteza entorrinal de pacientes con diagnóstico clínico, AD esporádica ($n = 21$, rango de edad = 72-84) y tejidos de control de individuos normales, edad coincidente, normales neurológicamente ($n = 13$, rango de edad = 69-81) se obtuvieron de Harvard Brain Tissue Resource Center (Belmont, MA) y the Cooperative Human Tissue Network (Philadelphia, PA). Los intervalos post-mortem para estos cerebros fueron < 24 h y la confirmación patológica de AD para cada espécimen del cerebro se llevó a cabo de acuerdo con los criterios definidos por National Institute on Aging and Reagan Institute Working Group on Diagnostic Criteria for the Neuropathological Assessment of AD (1997). Las muestras cerebrales de los controles de la misma edad fueron seleccionadas con los mismos criterios. Los tejidos se caracterizan inmunohistoquímicamente para la presencia de placas neuríticas (amiloides) y ovillos neurofibrilares como se ha descrito previamente (D'Andrea et al., 2001; Nagele et al., 2002). Los tejidos de control no mostraron patología macroscópica y mínima neuropatología similar a AD microscópica localizada. Los tejidos se procesaron para rutina de inclusión en parafina y corte de acuerdo con los protocolos establecidos. Se cortan en serie secciones de cinco micrómetros, montadas en microportaobjetos SuperFrost Plus+ (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) y se secaron durante la noche.

Histología e inmunohistoquímica (IHC) de tejido cerebral humano y de cerdo. La inmunohistoquímica se llevó a cabo sobre los tejidos embebidos en parafina como se ha descrito previamente (D'Andrea et al., 2001; Nagele et al., 2002). Brevemente, después de la eliminación de la parafina con xileno y la rehidratación a través de una serie graduada de concentraciones decrecientes de etanol, la antigenicidad de proteínas se ve reforzada por secciones de microondas en Solución Reguladora Diana (Dako, Carpinteria, CA), durante 2 min. Alternativamente, las secciones congeladas fueron tratadas durante 2 min en acetona, y de nuevo se secaron con aire. Tras una incubación de 30 min en 0.3% de H_2O_2 , las secciones se trataron durante 30 min en el suero normal de bloqueo y a continuación se incubaron con anticuerpos primarios a diluciones apropiadas durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación de un enjuague a fondo en PBS, se aplicó un anticuerpo secundario marcado con biotina, durante 30 min. Las inmunoreacciones fueron tratadas con el complejo avidina-biotina marcado con peroxidasa (ABC, Vector Labs, Foster City, CA) y visualizadas mediante el tratamiento de secciones con 3-3-diaminobencidina-4 HCl (DAB)/ H_2O_2 (Biomeda, Foster City, CA). Las secciones fueron ligeramente contra-teñidas con hematoxilina, deshidratadas a través de una serie graduada de concentraciones crecientes de etanoles, aclaradas en xileno y montados en Permount. Los controles consistieron en secciones de cerebro tratadas con suero no inmune, anticuerpos pre absorbido u omisión del anticuerpo primario. Las muestras fueron examinadas y fotografiadas con un microscopio Nikon FXA, y las imágenes digitales se registraron con una cámara digital Nikon DXM1200F y se procesaron el software de imágenes usando Image Pro Plus (Fase 3 Imaging, Glen Mills, PA).

Los cortes histológicos en serie de la corteza frontal se tiñeron de la siguiente manera: hematoxilina y eosina (H & E) para revelar la estructura vascular y hemorragia; IHC para revelar la fuga en BBB (inmunoglobulina de cerdo como un marcador para la pérdida vascular y permeabilidad de BBB), la activación de astrocitos (proteína ácida fibrilar glial) y el aspecto morfológico y la integridad estructural de las neuronas (proteína asociada a microtúbulos-2), la placa amiloide (Abeta -42).

EJEMPLO 1

La inhibición de la Actividad de Lp-PLA₂ Evita la Demencia Vascular & la Enfermedad de Alzheimer: Hemorragia intracerebral inducida por DM/HC y compromiso de la barrera hematoencefálica (BBB).

La función primaria de la BBB es mantener un control preciso sobre las sustancias que entran o salen del cerebro de modo que el entorno en el cual las neuronas funcionan, permanece homeostático. Si la BBB se ve comprometida, componentes de la sangre que normalmente están excluidos podría entrar en el tejido cerebral, interferir con la función de la neurona, desencadenar una respuesta inmune y provocar la neuroinflamación, todo lo cual contribuye a la Demencia Vascular y el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. Como se muestra en la Figura 1, en contraste con el vaso control (izquierda), hemorragia (Arriba a la derecha, H & E 200x) y la fuga en BBB (Abajo a la derecha, IHC para 100x inmunoglobulina cerdo) se observaron en cerebro DM/HC. Las flechas de color negro indican las células inflamatorias fuera del vaso sanguíneo (Arriba) y nubes de fugas perivasculares (Abajo a la derecha, BV: vaso sanguíneo). Además, hay un aumento de la adhesión de células inflamatorias en la superficie de las células endoteliales (flecha blanca, Superior Derecha). IHC se utilizó para (i) detectar pérdidas vasculares resultantes de una BBB defectuosa y (ii) realizar el seguimiento del destino del material de filtrado en el tejido cerebral. Similar a lo que se observa en cerebro humano con enfermedad de Alzheimer (AD), inmunoglobulinas filtradas (Ig) unidas a las neuronas y provoca el colapso del árbol de dendritas, como se demuestra por retroceso y torsión de los troncos principales de dendritas (i.e. la apariencia "dendrita sacacorchos") (Figura 2).

Durante el período de estudio, se observó que los animales administrados con el inhibidor de Lp-PLA₂ fueron más sensibles a los estímulos externos, demostraron una mayor actividad en la jaula, y tendían a responder de manera más alerta a la alimentación y manejo en comparación con los animales control, no tratados. Además, a pesar de niveles similares de glucosa y de colesterol en suero, los animales tratados con el inhibidor Lp-PLA₂ demostraron un aumento de peso en comparación con los animales control (62.5 kg vs 50.9 kg para los animales de control) desde un punto de partida de 26.9 kg y 30.3 kg de peso, respectivamente. El peso en los animales administrados con el inhibidor de Lp-

PLA₂ es un reflejo directo de su bienestar general, en la medida en que los animales más enfermizos (i.e. los animales de control, no tratados) no comen. Se observó que la inhibición de la inflamación mediante el inhibidor de Lp-PLA₂ da lugar a un mayor bienestar y la salud en el entorno de la inflamación sistémica.

5 EJEMPLO 2

Patología de Enfermedad de Alzheimer Etapa Inicial demostrada en Animales DM/HC

10 La activación de astrocitos y la acumulación intracelular de Aβ42 dentro de las neuronas han sido reconocidos como los eventos clave y primeros en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer (AD) y han sido bien documentados en los cerebros de pacientes con AD. Como se muestra en la Figura 3, con tan solo 7 meses después de la exposición a factores de riesgo CV, la activación inducida por DM/HC de los astrocitos, como se indica por la expresión elevada de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP). Los astrocitos que muestran una intensa inmunotinción de GFAP fueron vistos en la vecindad inmediata de las neuronas mostrando una morfología anormal. Además, las neuronas y células musculares lisas vasculares (SMCs) demostraron un aumento de la reactividad inmune con anticuerpos contra Aβ42 (Figura 4). Es de destacar que los astrocitos mostraron reactividad inmunológica negativa contra Aβ42, lo que demuestra que la acumulación de Aβ42 se produce relativamente de forma selectiva en las neuronas y las SMC vasculares. Estos hallazgos demuestran que las neuronas y las SMC vasculares son las células que son más vulnerables para acumular Aβ42, que es comparable a lo que se observa en los cerebros de los pacientes en etapas tempranas de la enfermedad de Alzheimer. Es importante tener en cuenta que las neuronas Aβ42-positivos también mostraron características de las neuronas enfermas, con algunas de ellos mostrando "troncos dendríticos sacacorchos," una indicación de que el árbol de dendritas de la neurona está en el proceso de colapso (Figura 5). En contraste con las neuronas Aβ42(+), las neuronas Aβ42-negativas parecían sanas.

25 EJEMPLO 3

La inhibición de la actividad de Lp-PLA₂ disminuye la fuga de BBB inducida por DM/HC

30 Como se muestra en la Figura 5, DM/HC causó fugas en BBB generalizadas en los 6 animales, mientras que los animales tratados con el inhibidor de Lp-PLA₂ mostraron insignificantes fugas en BBB. La mancha de color marrón indica que componentes de la sangre (en este caso Ig) han filtrado de las arterias pequeñas en el tejido cerebral circundante y enlace de Ig extenso con las neuronas. Por el contrario, en los animales tratados, no hay pérdidas de Ig de los vasos sanguíneos, no hay enlace de Ig con las neuronas, y ningún colapso de dendritas (Figura 5 y Figura 6).

35 EJEMPLO 4

La inhibición de la actividad de Lp-PLA₂ evita la acumulación de Abeta-42 inducida por DM/HC en las neuronas y minimiza la Amiloidosis cerebrovascular.

40 Los animales DM/HC demostraron un grado variable de acumulación de Abeta 42 dentro de las neuronas, así como el daño neuronal (Figura 7, panel izquierdo), mientras que los animales tratados con el inhibidor de Lp-PLA₂ (Figura 7, panel derecho) no mostraron inmunorreactividad de Abeta-42 neuronal. Además, las neuronas enfermas rara vez se observaron en los animales tratados en comparación con los animales no tratados. Del mismo modo el inhibidor de Lp-PLA₂ también impidió la acumulación de Abeta42, en las SMC vasculares y por lo tanto se minimiza la amiloidosis cerebrovascular (Figura 8).

50 En resumen, la inhibición de la Lp-PLA₂ previene el deterioro rotura de BBB inducida por factores de riesgo metabólico, el enlace de Ig con las neuronas y la acumulación de Abeta42 en las neuronas. La inhibición de la Lp-PLA₂ también redujo las células gliales activadas (por ejemplo, la activación de astrocitos) y redujo al mínimo la deposición de Abeta42 en los vasos sanguíneos cerebrales (i.e. amiloidosis cerebrovascular).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica que comprende 1-(N-(2-(dietilamino)etil)-N-(4-(4-trifluorometilfenil)bencil)-aminocarbonilmetil)- 2-(4-fluorobencil)tio-5,6-trimetilenopirimidin-4-ona (SB480848) o una sal de este farmacéuticamente aceptable, y un portador farmacéuticamente aceptable para uso en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad o trastorno neurodegenerativo, en donde el trastorno neurodegenerativo es la Demencia Vascular.
- 10 2. La composición farmacéutica para uso en el tratamiento de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la enfermedad o trastorno neurodegenerativo está asociado con una barrera hematoencefálica anormal.
- 15 3. La composición farmacéutica para uso en el tratamiento de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la barrera hematoencefálica anormal es una barrera hematoencefálica permeable.
- 20 4. La composición farmacéutica para uso en el tratamiento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde la Demencia Vascular comprende deterioro vascular cognitivo leve, demencia multi-infarto, demencia vascular debido a un infarto único estratégico, demencia vascular debido a lesiones hemorrágicas, enfermedad de los vasos pequeños, enfermedad de Alzheimer mixta con demencia vascular o demencia vascular isquémica subcortical.
- 25 5. La composición farmacéutica para uso en el tratamiento de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el tratamiento y/o prevención de la enfermedad o trastorno neurodegenerativo comprende además el uso de agentes terapéuticos adicionales seleccionados del grupo que consiste en: donepezil; tacrina; rivastigmina; galantamina; vacuna anti-amiloide; y terapias de descenso de Abeta.
- 30 6. La composición farmacéutica para uso en el tratamiento de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el tratamiento y/o prevención de la enfermedad o trastorno neurodegenerativo comprende además el uso de agentes terapéuticos adicionales seleccionados del grupo que consiste de: moduladores alostéricos o agonistas del receptor muscarínico M1; antagonistas muscarínicos M2; inhibidores de la acetilcolinesterasa incluyendo tetrahidroaminoacridina, donepezil, galantamina y rivastigmina; agonistas de los receptores nicotínicos o moduladores alostéricos incluyendo moduladores alostéricos o agonistas de $\alpha 7$ o moduladores alostéricos o agonistas de $\alpha 4\beta 2$; agonistas de los receptores activados por el proliferador de peroxisomas (PPAR) incluyendo agonistas de PPAR γ ; agonistas parciales del receptor de 5-HT $_4$; antagonistas de histamina H $_3$ y agonistas inversos; antagonistas de los receptores de 5-HT $_6$ o antagonistas de los receptores 5HT $_1A$; moduladores positivos de AMPA incluyendo alfa-amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propionato, un subtipo del receptor de glutamato; y los antagonistas o moduladores del receptor del ácido N-metil-D-aspartico (NMDA), incluyendo la memantina.

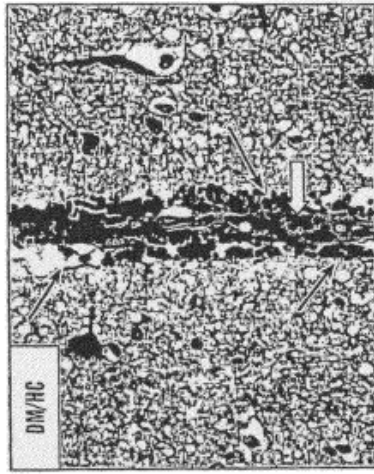


FIG. 1B

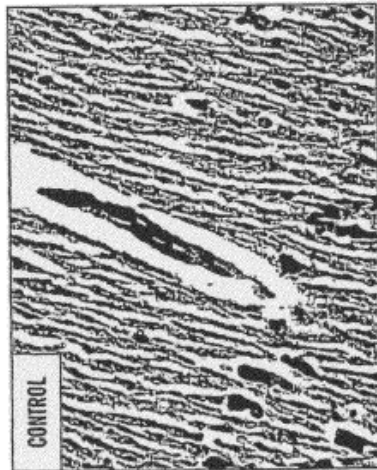


FIG. 1A

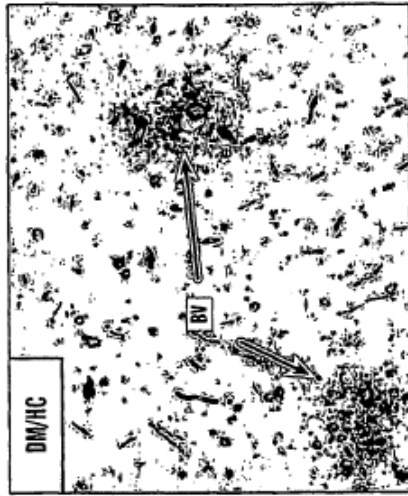


FIG. 1D

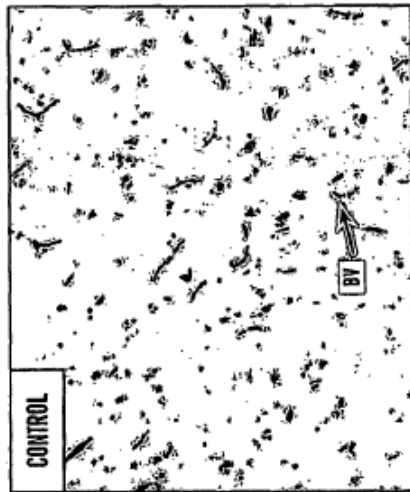


FIG. 1C

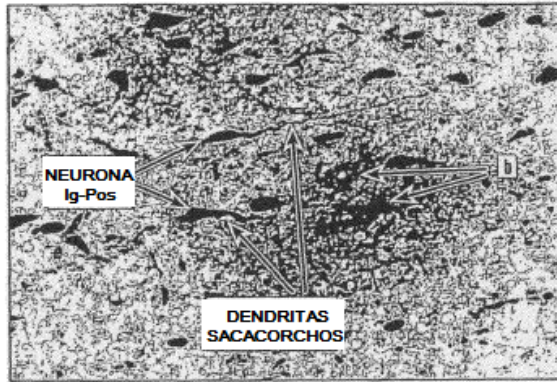


FIG. 2A

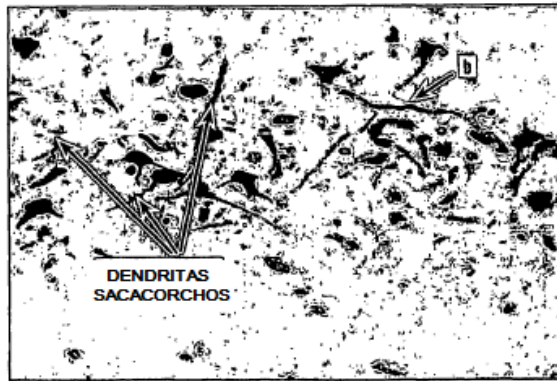


FIG. 2B

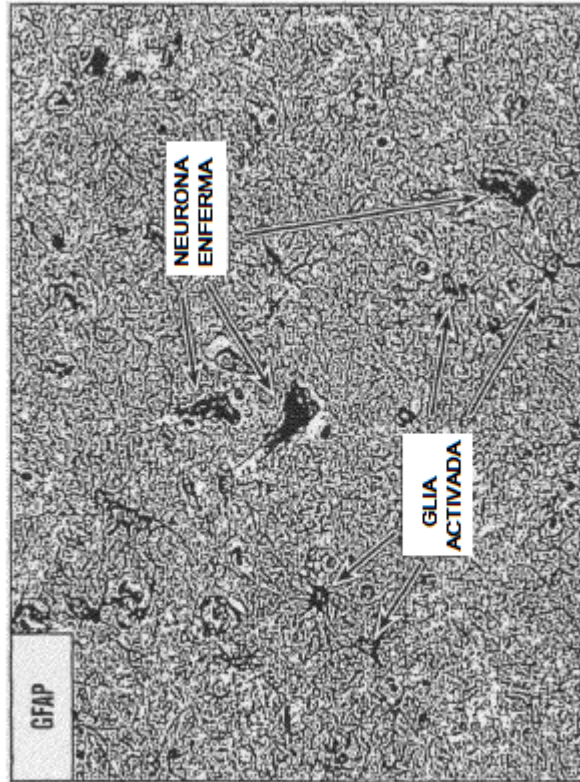


FIG. 3

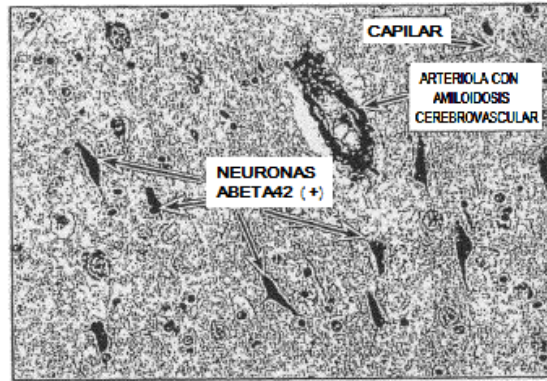


FIG. 4A

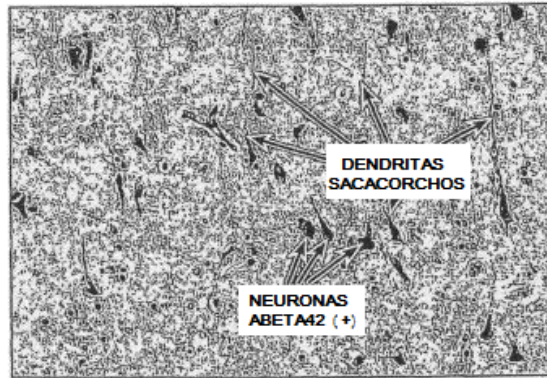
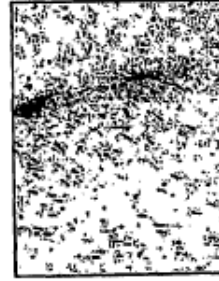


FIG. 4B



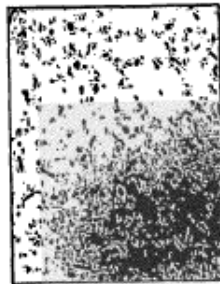
DM/HC N=6

FIG. 5C



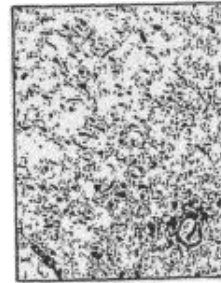
DM/HC N=6

FIG. 5F



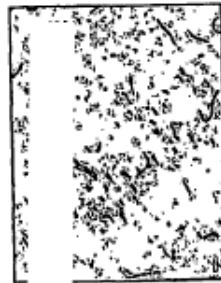
DM/HC N=6

FIG. 5B



DM/HC N=6

FIG. 5E



DM/HC N=6

FIG. 5A



DM/HC N=6

FIG. 5D



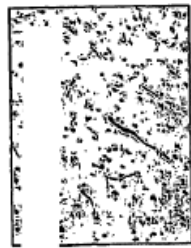
N TRATADO = 6

FIG. 5I



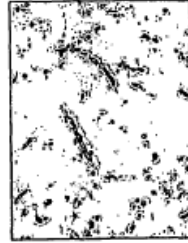
N TRATADO = 6

FIG. 5H



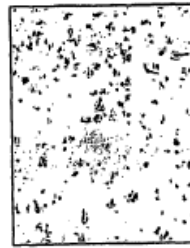
N TRATADO = 6

FIG. 5G



N TRATADO = 6

FIG. 5L



N TRATADO = 6

FIG. 5K

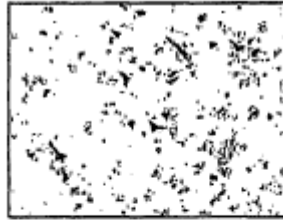


N TRATADO = 6

FIG. 5J

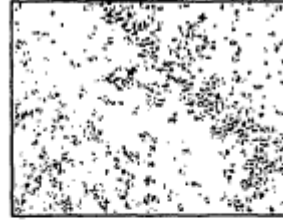


FIG. 6



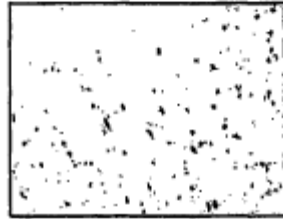
DM/HC

FIG. 7A



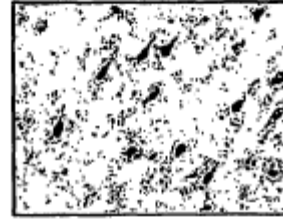
DM/HC

FIG. 7B



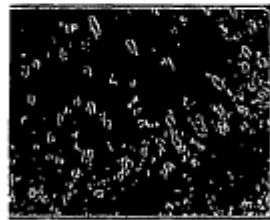
DM/HC

FIG. 7C



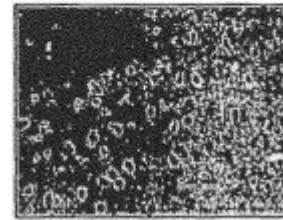
DM/HC

FIG. 7D



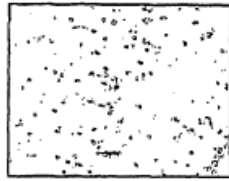
DM/HC

FIG. 7E



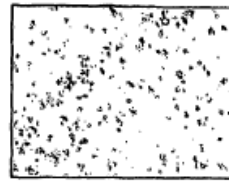
DM/HC

FIG. 7F



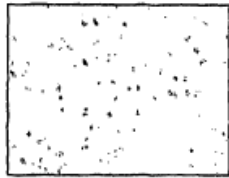
TRATADA

FIG. 7G



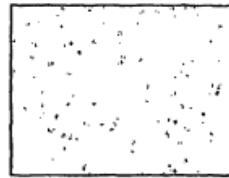
TRATADA

FIG. 7H



TRATADA

FIG. 7I



TRATADA

FIG. 7J



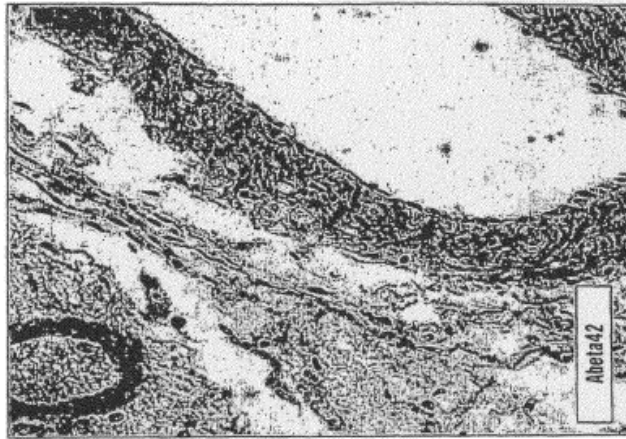
TRATADA

FIG. 7K



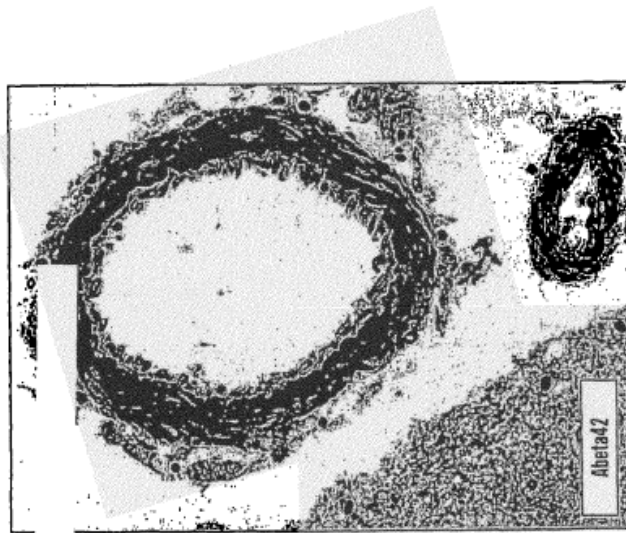
TRATADA

FIG. 7L



TRATADA

FIG. 8B



DM/TC

FIG. 8A



FIG. 9A

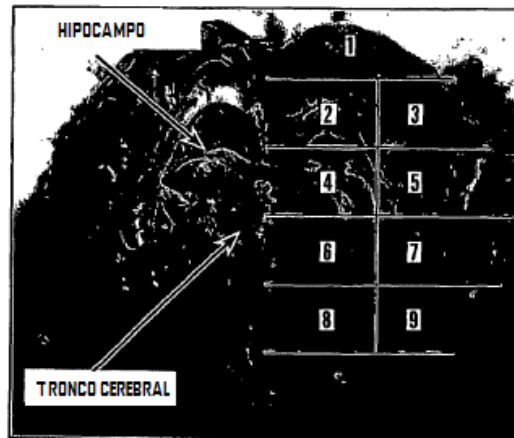


FIG. 9B