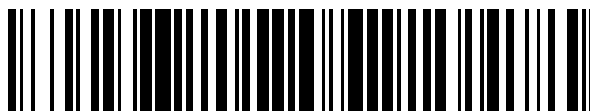


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 548 878**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61K 31/135 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.05.2008 E 08769397 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.07.2015 EP 2155225**

54 Título: **Métodos de tratamiento de úlceras de la piel**

30 Prioridad:

11.05.2007 US 928759 P

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

21.10.2015

73 Titular/es:

**THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF
PENNSYLVANIA (100.0%)
3160 CHESTNUT STREET SUITE 200
PHILADELPHIA, PA 19104-6283, US**

72 Inventor/es:

**WILENSKY, ROBERT;
HAMAMDZIC, DAMIR y
PROFKA, HARRILLA**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 548 878 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).

Métodos de tratamiento de úlceras de la piel**Descripción****5 CAMPO DE LA INVENCION**

Realizaciones de la presente invención se refieren generalmente a agentes que inhiben la expresión y/o actividad de la proteína Lp-PLA₂ para su uso en métodos para el tratamiento y/o la prevención de úlceras de la piel.

10 ANTECEDENTES

La fosfolipasa A₂ asociada a lipoproteína (Lp-PLA₂), también previamente conocida en la técnica con el factor de activación de plaquetas acetil hidrolasa (PAF acetil hidrolasa), es un miembro de la superfamilia de las enzimas fosfolipasa A₂ que participan en la hidrólisis de lípidos o fosfolípidos de lipoproteína. Es secretada por varias células que desempeñan una función importante en la respuesta inflamatoria sistémica a lesión, que incluye linfocitos, monocitos, macrófago, linfocitos T y mastocitos.

Durante la conversión de LDL en su forma oxidada, Lp-PLA₂ es responsable de hidrolizar el éster sn-2 de fosfatidilcolina oxidativamente modificada dando lisofosfatidilcolina y un ácido graso oxidativamente modificado. Lp-PLA₂ hidroliza la posición sn2 de un fosfolípido truncado asociado a LDL oxidado. Como resultado, hay una generación de 2 mediadores de la migración dirigida de células inflamatorias (ácidos grasos no esterificados (NEFA) y LISO PC). Tanto NEFA como LISO PC son quimioatrayentes para monocitos circulantes, desempeñan una función en la activación de macrófagos y aumentan el estrés oxidativo, además de afectar las respuestas funcionales e inmediatas de linfocitos T. Lp-PLA₂ se une en seres humanos y cerdos a la molécula de LDL mediante la lipoproteína B, y una vez en la pared arterial el LDL oxidado es susceptible a hidrólisis por Lp-PLA₂.

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

Además, se propone que Lp-PLA₂ desempeña una función directa en la oxidación de LDL. Esto es debido a que la acción de productos de Lp-PLA₂ de peróxidos lipídicos derivados de ácidos grasos poliinsaturados contribuye a y potencia el proceso oxidativo global. Concordando con esta idea, los inhibidores de Lp-PLA₂ inhiben la oxidación de LDL. Los inhibidores de Lp-PLA₂ pueden, por tanto, tener una aplicación general en cualquier trastorno que implique la peroxidación de lípidos conjuntamente con la actividad enzimática y/o respuestas inflamatorias activadas, por ejemplo, además de afecciones tales como aterosclerosis y diabetes, otras afecciones tales como artritis reumatoide, infarto de miocardio y lesión por reperfusión.

La piel es el mayor órgano del cuerpo humano. Esto se aplica a la superficie exterior, ya que cubre el cuerpo, que parece que tiene la mayor área superficial de todos los órganos. Además, se aplica al peso, ya que pesa más que cualquier órgano interno individual, representando aproximadamente el 15 por ciento del peso corporal. Para el ser humano adulto promedio, la piel tiene un área superficial de entre 1,5-2,0 metros cuadrados, la mayoría de ella tiene entre 2-3 mm de espesor. La pulgada cuadrada promedio de la piel contiene 650 glándulas sudoríparas, 20 vasos sanguíneos, 60.000 melanocitos y más de mil terminaciones nerviosas.

Como órgano, la piel es un sistema integumentario compuesto de múltiples capas de tejidos epiteliales: epidermis, dermis e hipodermis que protegen los músculos y órganos subyacentes. Al igual que la interfase con los alrededores, desempeña la función más importante en proteger contra patógenos, proporcionando una capa resistente al agua y de barrera para la infección. Sus otras funciones principales son aislamiento y regulación de la temperatura, sensación y síntesis de vitamina D y B. Menos secreción de urea y absorción de oxígeno y medicina también se logran mediante la piel. Por tanto, la piel se considera una de las partes más importantes del cuerpo.

Cuando se compromete la integridad de la piel, tal como en abrasión o un corte, hay una discontinuidad de las múltiples capas de las capas epiteliales y así se pierde localmente la función protectora de la piel. El cuerpo humano provoca una respuesta de cicatrización localizada que principalmente pretende taponar la discontinuidad epitelial y prevenir la invasión de patógenos. La respuesta a la cicatrización implica aumentar la circulación sanguínea a la herida, movilizar numerosas células inmunitarias (macrófagos fagocíticos) y respuestas inflamatorias para eliminar cualquier patógeno y residuos de células, movilizar células de fibroblasto al sitio de la herida y secretar matriz extracelular, y sellar la herida regenerando las capas dérmica y epidérmica.

Algunas veces, esta respuesta a la cicatrización se altera o impide debido a diversas afecciones médicas y/o traumatismo repetido, y combinaciones de los mismos, de forma que la herida sigue como una llaga o úlcera en la piel. Esta llaga es vulnerable a la infección por patógenos en el área de alrededor. La úlcera de la piel puede agrandarse por infección e inflamación aberrante. Se acumula pus (células inmunitarias muertas, células de la piel y

agentes infecciosos) en la cavidad de la úlcera de la piel para formar un absceso. Los abscesos en la mayoría de las partes del cuerpo raramente se curan por sí mismos, de manera que se indica atención médica rápida a la primera sospecha de un absceso.

5 Como la piel es la primera línea de defensa contra cualquier patógeno en nuestros alrededores, tener una úlcera crónica representa una situación médica muy grave y peligrosa que requiere tratamiento inmediato y agresivo, y el no tratar el problema de una manera oportuna puede conducir a consecuencias terribles tales como gangrena, pérdida de extremidades resultante de amputación, septicemia, e incluso muerte.

10 Las heridas crónicas de la piel son un problema muy frecuente en personas con diabetes, problemas circulatorios, cáncer, trastornos del sistema inmunitario, trastornos neurológicos o movilidad limitada que están así tanto postrados en silla de ruedas como confinados en la cama. La movilidad limitada puede ser de parálisis debida a lesiones o enfermedad, o anomalías congénitas tales como parálisis cerebral y espina bífida. La úlcera crónica de la piel es el principal factor contribuyente a la muerte del famoso actor Christopher Reeve que quedó parálítico en un accidente montando a caballo. La prevalencia de úlceras de la piel puede ser de hasta el 60 por ciento en pacientes cuádruplégicos y del 66 por ciento en pacientes ancianos ingresados por fractura femoral (véase "The Agency for Health Care Policy and Research" Clinical Practice Guideline Number 3, AHCPR Pub. No. 92-0047). Para pacientes diabéticos, el 15 % desarrollarán úlceras de la piel que son altamente susceptibles a infección al menos una vez en su vida. De hecho, el 85 % de las amputaciones diabéticas realizadas anualmente van precedidas por úlceras Glover J. L., et. al., 1997, Adv. Wound Care 10:33-38.

25 Se estima que en los Estados Unidos de América solo hay entre 5-7 millones de personas afectadas con úlceras crónicas de la piel (Petrie N, et. al, 2003, Surgical Clinics of North America 83(3):194-9). Anualmente en América, el coste directo total de las heridas crónicas, que incluye procedimientos de diagnóstico y quirúrgicos de heridas, productos farmacéuticos, dispositivos de cierre de heridas y gastos hospitalarios y de médicos, asciende aproximadamente a 20 billones de dólares (Frykberg R, et. al., 2000, J Foot Ankle Surg 39(5 Suppl):1-60; Harding K, et. al., 2002, BMJ 324(7330):160-3). Los costes indirectos de las heridas crónicas, tales como tiempo de trabajo perdido y alteración de la calidad de vida, no están incluidos en este cálculo estimado y son difíciles de cuantificar, pero pueden contemplarse por ser sustanciales.

30 Actualmente, el tratamiento de heridas crónicas incluye medicaciones tales como fármacos antibacterianos y antifúngicos, agente trombolítico o agentes destructores de coágulos tales como activador tisular del plasminógeno (tPA), el uso de vendas de compresión, sustitutos de piel de bioingeniería (aloinjertos epidérmicos cultivados), estimulaciones eléctricas, sistemas de administración de fármacos avanzados tales como sistema de administración transdérmica basada en iontoforesis, administración localizada de materiales que reparan tejido tales como factor de crecimiento derivado de plaquetas y autólogo, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (CSF G-M) y mesoglicano, terapia para heridas de presión negativa y ultrasonidos. Sin embargo, a pesar de un enfoque multidisciplinar para tratar y promover la curación de úlceras crónicas de la piel con tratamiento agresivo de la infección y mejorar la circulación de la sangre, las úlceras crónicas de la piel continúan siendo un problema clínico importante. La mayor parte del tiempo los médicos no han tenido forma de determinar pronto en qué heridas podrían requerirse estos procedimientos avanzados y caros. Por tanto, todavía existe la necesidad de un nuevo avance en el tratamiento, además de la prevención de úlceras de la piel en personas que entran dentro de la población de alto riesgo de desarrollar úlceras crónicas de la piel. Además, hay una necesidad apremiante de un nuevo avance en la prevención de episodios recurrentes de úlceras de la piel entre personas en riesgo.

45 Blackie J et al, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 13 (2003), 1067-1070 describen una serie de inhibidores de la fosfolipasa A2 asociada a lipoproteína recombinante.

El documento EP 0 832 875 A1 describe compuestos que inhiben la metaloproteínasa de la matriz derivada de vertebrados y/o enzimas conversoras del factor α de necrosis tumoral.

50 Shi et al, Atherosclerosis, 191 (2007) 54-62 describen la activación de leucocitos asociada a la aumentada expresión de Lp-PLA₂ y elevada respuesta inflamatoria en circulación y en la pared arterial coronaria bajo condiciones proaterogénicas.

El documento US 6177257 B1 describe la enzima Lp-PLA₂ en forma purificada, una molécula de ácido nucleico aislada que codifica Lp-PLA₂, el uso de un inhibidor de la enzima Lp-PLA₂ en terapia y un método de cribado de compuestos para identificar aquellos compuestos que inhiben la enzima.

55 El documento WO 2008/048867 A2 describe un grupo de 4-oxopirido[2,3-d]piridinas sustituidas que inhiben la enzima Lp-PLA₂.

RESUMEN DE LA INVENCION

60 La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un agente definido en las reivindicaciones adjuntas que inhibe la actividad y/o la expresión de la proteína Lp-PLA₂ para su uso en un método para tratar y/o prevenir úlceras de la piel en un sujeto, que comprende administrarla al sujeto en necesidad de la misma.

65 Una realización de la invención es una composición farmacéutica que comprende un agente definido en las reivindicaciones adjuntas que inhibe la actividad y/o la expresión de la proteína Lp-PLA₂ para su uso en un método

para tratar y/o prevenir úlceras de la piel en un sujeto, que comprende determinar si dicho sujeto tiene o está en riesgo de tener una úlcera de la piel, y administrar la composición farmacéutica al sujeto que tiene una úlcera de la piel o en riesgo de desarrollar una úlcera de la piel.

5 Las úlceras de la piel que son capaces de ser tratadas por los métodos de la presente invención están seleccionadas del grupo que consiste en úlceras de decúbito, úlceras por escaldado, úlceras por congelación, úlceras vasculares, úlceras metabólicas, úlceras neuropáticas, úlceras que acompañan a enfermedades de tejido conjuntivo, úlceras iatrogénicas, úlceras facticias, úlceras traumáticas, úlceras neoplásicas, úlceras que acompañan a enfermedades y trastornos inmunológicos y enfermedades autoinmunitarias, úlceras asociadas a enfermedades hematológicas, úlceras asociadas a trastornos de los glóbulos blancos, úlceras disproteinémicas, úlceras debidas a infección por patógenos, úlceras debidas a infestación por parásitos y úlceras que acompañan a enfermedades y trastornos de etiología desconocida.

15 Los factores de riesgo para desarrollar úlceras de la piel incluyen: tener un episodio previo de úlcera de la piel asociado a una enfermedad o trastorno o traumatismo que tiene tendencia a producir úlceras de la piel; ser personas ancianas; estar confinado en la cama; estar en una silla de ruedas; malnutrición; ausencia de actividad física; consumo excesivo de alcohol; incontinencia urinaria; incontinencia intestinal; piel frágil; capacidad mental reducida; fumar; haber sido diagnosticado con o tener diabetes; hipertensión arterial; altos niveles de homocisteína; tener sobrepeso; una historia familiar de venas varicosas; padecer vasculitis; haber sido diagnosticado con un trastorno de la coagulación de la sangre; tener una ocupación que requiere estar de pie muchas horas; tener anemia drepanocítica; estar tomando medicación que contiene bromuro; recibir quimioterapia basada en hidroxurea; insuficiencia renal; lepra; ser una víctima de quemaduras; y congelación.

25 En una realización, las composiciones reivindicadas son para su uso en un método en el que el sujeto tiene al menos un factor de riesgo. En otra realización, las composiciones reivindicadas son para su uso en un método en el que el sujeto tiene al menos dos factores de riesgo.

30 En la presente divulgación, el agente que inhibe la actividad de proteína de Lp-PLA₂ es una molécula pequeña, ácido nucleico, análogo de ácido nucleico, proteína, anticuerpo, péptido, aptámero o variantes o fragmentos de los mismos.

35 En algunas realizaciones, el agente que inhibe la actividad de proteína de Lp-PLA₂ es una molécula pequeña como se define en las reivindicaciones adjuntas, por ejemplo, pero no se limitan a, un inhibidor reversible o irreversible de molécula pequeña de la proteína Lp-PLA₂. En algunas realizaciones, una molécula pequeña tal como se define en las reivindicaciones adjuntas es un compuesto basado en pirimidiona. En algunas realizaciones, un inhibidor de molécula pequeña de Lp-PLA₂ es, por ejemplo, pero no se limita a, 1-1-(N-(2-(dietilamino)etil)-N-(4-(4-trifluorometilfenil)bencil)-aminocarbonilmetil)-2-(4-fluorobenciltio-5,6-trimetilpirimidin-4-ona (que también se conoce como SB480848) o una sal de la misma. En algunas realizaciones, un inhibidor de molécula pequeña de Lp-PLA₂ es, por ejemplo, pero no se limita a, 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 o una sal de la misma. En algunas realizaciones, un inhibidor de molécula pequeña de Lp-PLA₂ es, por ejemplo, pero no se limita a, N-(1-(2-metoxietil)piperidin-4-il)-2-[2-(2,3-difluorobenciltio)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)-acetamida; o una sal de la misma. En algunas realizaciones, un inhibidor de molécula pequeña de Lp-PLA₂ es, por ejemplo, pero no se limita a, 2-[4-({[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il]-acetil){[4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil}amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato de metilo o una sal del mismo.

Otras formas de inhibidores incluyen un agente de ácido nucleico que es un agente de iARN tal como un ARNip, ARNhp, miARN, ARNbc o ribozima o variantes de los mismos.

50 En una realización, el agente que inhibe la actividad de proteína de Lp-PLA₂ puede usarse en un método en el que dicho agente se administra al sujeto junto con agentes terapéuticos adicionales. Estos agentes terapéuticos adicionales están seleccionados de un grupo que consiste en terapia antimicrobiana, terapia antiparasítica, terapia antiobesidad, terapia para diabetes, terapia para enfermedad cardiovascular, terapia para insuficiencia renal, terapia para vasculitis, terapia para insuficiencia venosa, terapia para insuficiencia arterial, terapia para el cáncer, terapia inmunosupresora, terapia de inmunodeficiencia, terapia con esteroides, terapia para quemaduras y psicoterapia.

En otra realización más, el agente que inhibe la actividad de proteína de Lp-PLA₂ se usa en un método en el que dicho agente se administra al sujeto junto con agentes terapéuticos adicionales y el tratamiento de cuidado de heridas estándar.

60 En otra realización, el agente que inhibe la actividad de proteína de Lp-PLA₂ se usa en un método en el que dicho agente se administra al sujeto junto con sustitutos de piel de bioingeniería.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

65 Figura 1. Línea de tiempo (días) del desarrollo de abscesos (acumulación de pus en úlceras) y tratamiento de

úlceras en cerdos diabéticos/hipercolesterolémicos (DM/HC) tratados con el inhibidor de Lp-PLA₂, SB480848, y en cerdos DM/HC no tratados con el inhibidor de Lp-PLA₂. Hubo 21 cerdos DM/HC en el grupo no tratado de control y 22 cerdos DM/HC en el grupo SB480848 tratado experimental. Los cerdos n° 948 y n° 963 se trataron con inhibidor de Lp-PLA₂. Estos cerdos desarrollaron abscesos antes del inicio del tratamiento con el inhibidor. Los abscesos se trataron y se curaron en el plazo de tiempo promedio de 1-2 semanas. No se desarrolló absceso adicional después del inicio de dosis única diaria del tratamiento con el inhibidor SB480848. Los cerdos n° 975, n° 1024, n° 949, n° 947, n° 1007 y n° 15 no se trataron con el inhibidor de Lp-PLA₂ SB480848. Todos estos cerdos desarrollaron abscesos, teniendo dos cerdos desarrollo de abscesos recurrente, y teniendo un cerdo una ulceración crónica que duró durante más de > 2 meses.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Las realizaciones de la presente invención se basan en el descubrimiento de que los cerdos DM/HC, cuando se trataron con un agente que inhibió la enzima Lp-PLA₂, dejaron de desarrollar cualquier úlcera de la piel. El modelo de cerdo DM/HC demuestra fenotípicamente muchas similitudes a pacientes diabéticos humanos de alto riesgo. Una de las similitudes clave es la tendencia en desarrollar abscesos de la piel - úlceras de la piel infectadas, que se produce por estafilococos, el microorganismo más comúnmente aislado de infecciones diabéticas humanas. Los pacientes diabéticos humanos son muy propensos a úlceras de los pies como resultado de complicaciones tales como neuropatía, patología vascular periférica y mala curación que frecuentemente están asociados a elevada azúcar en sangre incontrolada. Cuando los cerdos se trataron con el inhibidor de la enzima Lp-PLA₂ SB480848 durante un período de 6 meses, ningún cerdo desarrolló ningún absceso de la piel. Además, se observó que los cerdos que tenían abscesos de la piel activos al principio del tratamiento siguieron estando libres de abscesos de la piel una vez se había curado el absceso inicial, y los cerdos dejaron de desarrollar episodios recurrentes de abscesos de la piel.

Por consiguiente, en una realización de la invención, las composiciones reivindicadas son para su uso en el tratamiento de úlceras de la piel en un sujeto en necesidad de las mismas inhibiendo la expresión y/o actividad de la proteína Lp-PLA₂. En otra realización de la invención, las composiciones reivindicadas son para su uso en la prevención de úlceras de la piel en un sujeto que había experimentado úlceras de la piel previamente, que comprende inhibir la expresión y/o actividad de la proteína Lp-PLA₂. En otra realización de la invención, las composiciones reivindicadas son para su uso en la prevención de úlceras de la piel en un sujeto que está en riesgo de desarrollar úlceras de la piel inhibiendo la expresión y/o actividad de la proteína Lp-PLA₂.

Definiciones

A menos que se defina de otro modo en el presente documento, los términos científicos y técnicos usados a propósito de la presente solicitud deben tener los significados que son comúnmente entendidos por aquellos expertos habituales en la materia. Además, a menos que se requiera de otro modo por el contexto, términos en singular deben incluir pluralidades y términos en plural deben incluir el singular.

El término "úlceras de la piel", como se usa en el presente documento, se refiere a una llaga sobre la piel en la que la epidermis está ausente. La dermis o hipodermis subyacente puede exponerse y ser visible. La piel de alrededor puede estar enrojecida e inflamada. Los síntomas y signos esenciales de cualquier tipo de proceso inflamatorio son rojez, calor, hinchazón, dolor y pérdida de función. Tales llagas son propensas a la infección por patógenos tales como bacterias, hongos y virus. En casos avanzados, la llaga puede estar supurando pus fluido. El pus (células inmunitarias muertas, células de la piel, fluido de células y agentes infecciosos) se acumula en la cavidad de la úlcera de la piel para formar un absceso.

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, interrumpiendo o alterando el rendimiento de las funciones y/o causando síntomas tales como malestar, disfunción, aflicción, o incluso muerte a la persona aquejada o aquellas en contacto con una persona. Una enfermedad o trastorno también puede referirse a un mal, achaque, problema, dolencia, trastorno, náuseas, enfermedad, dolor, indisposición o afectación.

El término "agente" se refiere a cualquier entidad que normalmente no está presente o no está presente a los niveles que se administran en la célula. El agente puede seleccionarse de un grupo que comprende: sustancias químicas; moléculas pequeñas; secuencias de ácidos nucleicos; análogos de ácidos nucleicos; proteínas; péptidos; aptámeros; anticuerpos; o fragmentos de los mismos. Una secuencia de ácidos nucleicos puede ser ARN o ADN, y puede ser mono o bicatenaria, y puede seleccionarse de un grupo que comprende; ácido nucleico que codifica una proteína de interés, oligonucleótidos, análogos de ácidos nucleicos, por ejemplo, ácido nucleico peptídico (PNA), PNA pseudo-complementario (pc-PNA), ácido nucleico bloqueado (LNA), etc. Tales secuencias de ácidos nucleicos incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a, proteínas que codifican secuencias de ácidos nucleicos, por ejemplo, que actúan de represores transcripcionales, moléculas antisentido, ribozimas, secuencias de ácidos nucleicos inhibidores pequeños, por ejemplo, pero no se limitan a, iARN, iARNhp, ARNip, imicroARN (imARN), oligonucleótidos antisentido, etc. Una proteína y/o péptido o fragmento de los mismos puede ser cualquier proteína de interés, por ejemplo, pero no se limitan a: proteínas mutadas; proteínas terapéuticas y proteínas truncadas, en las que la

proteína normalmente está ausente o se expresa a menores niveles en la célula. Las proteínas también pueden seleccionarse de un grupo que comprende; proteínas mutadas, proteínas genéticamente manipuladas, péptidos, péptidos sintéticos, proteínas recombinantes, proteínas quiméricas, anticuerpos, midicuerpos, minicuerpos, triacuerpos, 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 ácidos nucleicos en la célula y produciendo su transcripción la producción del ácido nucleico y/o inhibidor de proteína de Lp-PLA₂ dentro de la célula. Como se desvela en el presente documento, el agente es cualquier entidad o resto químico, que incluye sin limitación entidades no proteináceas sintéticas y que existen de forma natural. En ciertas realizaciones, el agente es una molécula pequeña como se define en las reivindicaciones adjuntas que tiene un resto químico. Por ejemplo, restos químicos incluyeron restos de alquilo, aromáticos, o de heterociclilo, sin sustituir o sustituidos, que incluyen 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 pueden seleccionarse de una biblioteca de diversos compuestos.

El término “inhibir”, como se usa en el presente documento, como se refiere a la expresión o actividad de la proteína o polipéptido de pL-PLA₂ o variantes u homólogos de la misma, no significa necesariamente la inhibición completa de la expresión y/o actividad. Más bien, la expresión o actividad de la proteína, polipéptido o polinucleótido se inhibe a un grado, y/o durante un tiempo, suficiente para producir el efecto deseado. En particular, la inhibición de Lp-PLA₂ puede determinarse usando un ensayo para la inhibición de Lp-PLA₂, por ejemplo, pero no se limita a, usar el bioensayo para la proteína Lp-PLA₂ como se desvela en el presente documento. Agentes que inhiben Lp-PLA₂ son agentes que inhiben la proteína Lp-PLA₂ y/o la función de Lp-PLA₂ al menos el 10 %. En algunas realizaciones, un inhibidor de Lp-PLA₂ es un agente que inhibe la proteína Lp-PLA₂ o expresión de Lp-PLA₂ al menos el 10 %.

Como se usa en el presente documento, el término “Lp-PLA₂” se refiere a la diana de proteína que va a inhibirse por los métodos que se desvelan en el presente documento. Lp-PLA₂ se usa indistintamente con Lp-PLA₂ y fosfolipasa A2 asociada a lipoproteína, también previamente conocida en la técnica como factor de activación de plaquetas acetil hidrolasa (PAF acetil hidrolasa). La Lp-PLA₂ humana está codificada por ácido nucleico correspondiente al nº de acceso: U20157 (SEC ID Nº: 1) o Ref Seq ID: NM_005084 (SEC ID Nº: 2) o y la Lp-PLA₂ humana se corresponde con la secuencia de proteínas correspondiente al nº de acceso: NP_005075 (SEC ID Nº: 3), que se desvelan en la solicitud de patente de EE.UU. 5.981.252.

Como se usa en el presente documento, “silenciamiento génico” o “gen silenciado” en referencia a una actividad de una molécula de iARN, por ejemplo un ARNip o miARN, se refiere a una disminución en el nivel de ARNm en una célula para un gen diana de al menos aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 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 el 100 % del nivel de ARNm encontrado en la célula sin la presencia del miARN o molécula de interferencia de ARN. En la presente divulgación, los niveles de ARNm pueden disminuirse al menos aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 99 %, aproximadamente el 100 %.

Como se usa en el presente documento, el término “iARN” se refiere a cualquier tipo de ARN interferente, que incluye, pero no se limita a, iARNip, iARNhp, microARN endógeno y microARN artificial. Por ejemplo, incluye secuencias previamente identificadas como ARNip, independientemente del mecanismo de procesamiento aguas abajo del ARN (es decir, aunque se cree que los ARNip tienen un método específico de procesamiento *in vivo* que produce la escisión de ARNm, tales secuencias pueden incorporarse en los vectores en el contexto de las secuencias flanqueantes descritas en el presente documento).

Como se usa en el presente documento, un “ARNip” se refiere a un ácido nucleico que forma un ARN bicatenario, ARN bicatenario que tiene la capacidad de reducir o inhibir la expresión de un gen o diana génica cuando el ARNip está presente o se expresa en la misma célula que el gen diana, por ejemplo, Lp-Lp-PLA₂. El ARN bicatenario ARNip puede estar formado por las hebras complementarias. En la presente divulgación, un ARNip puede referirse a un ácido nucleico que puede formar un ARNip bicatenario. La secuencia del ARNip puede corresponderse con la diana génica de longitud completa, o una subsecuencia de la misma. Normalmente, el ARNip tiene al menos aproximadamente 15-50 nucleótidos de longitud (por ejemplo, cada secuencia complementaria del ARNip bicatenario tiene aproximadamente 15-50 nucleótidos de longitud, y el ARNip bicatenario tiene aproximadamente 15-50 pares de bases de longitud, preferentemente aproximadamente 19-30 nucleótidos de base, preferentemente aproximadamente 20-25 nucleótidos de longitud, por ejemplo, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos de longitud).

Como se usa en el presente documento, “ARNhp” o “ARN de horquilla corta” (también llamado tallo-bucle) es un tipo de ARNip. Como se desvela en el presente documento, estos ARNhp pueden estar compuestos de una hebra no codificante corta, por ejemplo, aproximadamente 19 a aproximadamente 25 nucleótidos, seguida de un bucle de nucleótidos de aproximadamente 5 a aproximadamente 9 nucleótidos, y la hebra codificante análoga. Alternativamente, la hebra codificante puede preceder a la estructura de bucle del nucleótido y la hebra no codificante puede seguir.

Los términos “microARN” o “miARN” se usan indistintamente en el presente documento, son ARN endógenos, algunos de los cuales son conocidos por regular la expresión de genes codificantes de proteína al nivel posttranscripcional. Los microARN endógenos son ARN pequeños naturalmente presentes en el genoma que puede modular la utilización productiva de ARNm. El término microARN artificial incluye cualquier tipo de secuencia de ARN, distinta de microARN endógeno, que pueda modular la utilización productiva de ARNm. Se han descrito secuencias de microARN en publicaciones tales como Lim, et al., *Genes & Development*, 17, p. 991-1008 (2003), Lim et al *Science* 299, 1540 (2003), Lee y 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) y Lagos-Quintana et al, *ARN*, 9, 175-179 (2003). También pueden incorporarse múltiples microARN en una molécula precursora. Además, pueden expresarse tallo-tallo-bucles tipo miARN en células como vehículo para administrar miARN artificiales y ARN interferente pequeño (ARNip) con el fin de modular la expresión de genes endógenos mediante las vías de miARN y o iARN.

Como se usa en el presente documento, “ARN bicatenario” o “ARNbc” se refiere a moléculas de ARN que comprenden dos hebras. Las moléculas bicatenarias incluyen aquellas comprendidas de una única molécula de ARN que se vuelve sobre sí misma para formar una estructura bicatenaria. Por ejemplo, la estructura de tallo-bucle de las moléculas progenitoras de las que se deriva el miARN monocatenario, llamado el pre-miARN (Bartel et al. 2004. *Cell* 116:281-297) comprende una molécula de ARNbc.

Los términos “sujeto,” “individuo” y “paciente” se usan indistintamente en el presente documento, y se refieren a un animal, por ejemplo un ser humano, al que se proporciona tratamiento, que incluye tratamiento profiláctico, con la composición farmacéutica según la presente invención. El término “sujeto”, como se usa en el presente documento, se refiere a animales humanos y no humanos. Las expresiones “animales no humanos” y “mamíferos no humanos” se usan indistintamente en el presente documento, incluyen todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos, tales como primates no humanos (particularmente primates superiores), oveja, perro, roedor (por ejemplo, ratón o rata), cobaya, cabra, cerdo, gato, conejos, vacas y no mamíferos tales como pollos, anfibios, reptiles, etc. En una realización, las composiciones reivindicadas son para su uso en un método en el que el sujeto es un ser humano. En otra realización, las composiciones reivindicadas son para su uso en un método en el que el sujeto es un animal experimental o sustituto de animal como modelo de enfermedad.

El término “gen”, usado en el presente documento, puede ser un gen genómico que comprende secuencias reguladoras de la transcripción y/o traducción y/o una región codificante y/o secuencias no traducidas (por ejemplo, intrones, secuencias sin traducir de 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, miARN y ARN antisentido. Un gen también puede ser un ARNm o ADNc correspondiente a las regiones codificantes (por ejemplo, exones y miARN) que opcionalmente comprende secuencias sin traducir de 5' o 3' enlazadas al mismo. Un gen también puede ser una molécula de ácido nucleico amplificada producida *in vitro* que comprende toda o una parte de la región codificante y/o secuencias sin traducir de 5' o 3' enlazadas al mismo.

El término “ácido nucleico” u “oligonucleótido” o “polinucleótido” usado en el presente documento puede significar al menos dos nucleótidos enlazados covalentemente juntos. Como será apreciado por aquellos en la materia, la representación de la única hebra también define la secuencia de la hebra complementaria. Así, un ácido nucleico también engloba la hebra complementaria de una única hebra representada. Como también se apreciará por aquellos expertos en la materia, pueden usarse muchas variantes de un ácido nucleico para el mismo fin como ácido nucleico dado. Así, un ácido nucleico también engloba ácidos nucleicos sustancialmente idénticos y complementos de los mismos. Como también se apreciará por aquellos expertos en la materia, una hebra individual proporciona una sonda para una sonda que puede hibridarse con la secuencia diana bajo condiciones de hibridación rigurosas. Así, un ácido nucleico también engloba una sonda que se hibrida bajo condiciones de hibridación rigurosas.

Los ácidos nucleicos pueden ser monocatenarios o bicatenarios, o pueden contener porciones de tanto secuencia bicatenaria como monocatenaria. El ácido nucleico puede ser ADN, tanto ADN genómico como ADNc, ARN, o un híbrido, en el que el ácido nucleico puede contener combinaciones de desoxirribo- y ribo-nucleótidos, y combinaciones de bases que incluyen uracilo, adenina, timina, citosina, guanina, inosina, xantina hipoxantina, isocitosina e isoguanina. Los ácidos nucleicos pueden obtenerse por métodos de síntesis química o por métodos recombinantes.

Un ácido nucleico contendrá generalmente enlaces fosfodiéster, aunque pueden incluirse análogos de ácidos nucleicos que pueden tener al menos un enlace diferente, por ejemplo, enlaces fosforamidato, fosforotioato, fosforoditioato u O-metilfosforoamidito y esqueletos y enlaces de ácido nucleico peptídico. Otros ácidos nucleicos análogos incluyen aquellos con esqueletos positivos; esqueletos no iónicos, y esqueletos no de ribosa, que incluyen aquellos descritos en las patentes de EE.UU. nº 5.235.033 y 5.034.506. Ácidos nucleicos que contienen uno o más nucleótidos que no existen de forma natural o modificados también están incluidos dentro de una definición de ácidos nucleicos. El análogo de nucleótidos modificado puede localizarse, por ejemplo, en el extremo 5' y/o el extremo 3' de la molécula de ácido nucleico. Ejemplos representativos de análogos de nucleótidos pueden seleccionarse de ribonucleótidos modificados con azúcar o en el esqueleto. Debe observarse, sin embargo, que

también son adecuados ribonucleótidos modificados con nucleobases, es decir, ribonucleótidos que contienen una nucleobase que no existe de forma natural en lugar de una nucleobase que existe de forma natural tal como uridinas o citidinas modificadas en la posición 5, por ejemplo 5-(2-amino)propiluridina, 5-bromouridina; adenosinas y guanosinas modificadas en la posición 8, por ejemplo 8-bromoguanosina; deazanucleótidos, por ejemplo 7-deaza-adenosina; nucleótidos alquilados en O y N, por ejemplo N6-metiladenosina. El grupo OH de 2' puede sustituirse con un grupo seleccionado de H, OR, R, halógeno, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂ o CN, en los que R es alquilo C- C₆, alquenilo o alquinilo y halógeno es F, Cl, Br o I. Pueden hacerse modificaciones del esqueleto de ribosa-fosfato por una variedad de motivos, por ejemplo, para aumentar la estabilidad y semivida de tales moléculas en entornos fisiológicos o como sondas sobre un biochip. Pueden prepararse mezclas de ácidos nucleicos que existen de forma natural y análogos; alternativamente, pueden prepararse mezclas de diferentes análogos de ácidos nucleicos, y mezclas de ácidos nucleicos y análogos que existen de forma natural.

El término "vector" usado en el presente documento se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos 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 tanto un vector extracromosómico replicante como un vector que se integra en un genoma del huésped.

Como se usa en el presente documento, el término "tratar" incluye reducir o aliviar al menos un efecto adverso o síntoma de una afección, enfermedad o trastorno asociado a una úlcera de la piel.

El tratamiento se considera generalmente "eficaz" si se logra una mejora de al menos una etapa o nivel de clasificación en una escala clínicamente aceptada de gravedad de lesión o úlcera tras el tratamiento con un inhibidor de Lp-PLA₂. Alternativamente, o además, una reducción en el tamaño (área y/o profundidad) de una lesión de la piel de al menos el 25 % tras el tratamiento se considera tratamiento "eficaz".

La eficacia de prevención se monitoriza evaluando la piel del sujeto en riesgo de desarrollar una lesión de la piel tras el comienzo del tratamiento con un inhibidor de Lp-PLA₂. La ausencia de lesiones de la piel en un individuo en riesgo se considera un signo de prevención "eficaz". Similarmente, si un individuo tiene una historia de lesiones de la piel, la ausencia de nuevas lesiones, o incluso una reducción, por ejemplo, del 50 % o más, en la frecuencia o gravedad de cualquier lesión nueva es indicativa de prevención "eficaz" de úlceras de la piel por los métodos descritos en el presente documento.

El término "cantidad eficaz", como se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad de agente terapéutico de la composición farmacéutica para proporcionar tratamiento "eficaz" como ese término se define en el presente documento. Una cantidad eficaz como se usa en el presente documento también incluiría una cantidad suficiente para prevenir o retardar el desarrollo de un síntoma de la enfermedad, alterar el transcurso de un síntoma de enfermedad (por ejemplo, pero no se limita a, ralentizar la progresión de un síntoma de la enfermedad), o invertir un síntoma de la enfermedad.

Como se usa en el presente documento, los términos "administrar" e "introducir" se usan indistintamente y se refieren a la disposición de los agentes que inhiben Lp-PLA₂ como se desvela en el presente documento en un sujeto por un método o vía que produce al menos localización parcial de los agentes en un sitio deseado. Los compuestos de la presente invención pueden administrarse por cualquier vía adecuada que produzca un tratamiento eficaz en el sujeto.

El término "vectores" se usa indistintamente con "plásmido" para referirse a una molécula de ácido nucleico que puede transportar otro ácido nucleico con el que se ha enlazado. Los vectores que pueden dirigir la expresión de genes y/o secuencia de ácidos nucleicos con los que están operativamente enlazados se denominan en el presente documento "vectores de expresión". En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante están frecuentemente en forma de "plásmidos" que se refieren a bucles de ADN bicatenario circular que, en su forma de vector, no están unidos al cromosoma. Pueden usarse otros vectores de expresión, por ejemplo, pero no se limitan a, plásmidos, episomas, bacteriófagos o vectores virales, y tales vectores pueden integrarse en el genoma del huésped o replicarse autónomamente en la célula particular. También pueden usarse otras formas de vectores de expresión conocidas por aquellos expertos en la materia que sirven a las funciones equivalentes. Los vectores de expresión comprenden vectores de expresión para la expresión estable o transitoria que codifica el ADN.

Los artículos "un" y "una" se usan en el presente documento para referirse a uno o a más de uno (es decir, a al menos uno) del sujeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

Como se usa aquí, "iatrogénico" significa inducido en un paciente por una actividad del médico, manera, o terapia. Por ejemplo, inducido por farmacoterapia para una cierta enfermedad o trastorno.

Lp-PLA₂: Información general

Lp-PLA₂ también se denomina en la materia como aliasas Lp-PLA₂, LDL-PLA₂, fosfolipasa A2 asociada a

lipoproteína, PLA2G7, fosfolipasa A2 (grupo VII), o factor de activación de plaquetas acetil hidrolasa (PAF acetil hidrolasa o PAFAH). Lp-PLA₂ humana está codificada por ácido nucleico correspondiente al nº de acceso de GenBank: U20157 (SEC ID N°: 1) o Ref Seq ID: NM_005084 (SEC ID N°: 2) y la Lp-PLA₂ humana se corresponde con la secuencia de proteínas correspondiente al nº de acceso de GenBank: NP_005075 (SEC ID N°: 3), que se desvela en la patente de EE.UU. 5.981.252.

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

Se ha mostrado que Lp-PLA₂ es responsable de la conversión de fosfatidilcolina en lisofosfatidilcolina, durante la conversión de lipoproteína de baja densidad (LDL) en su forma oxidada. Se sabe que la enzima hidroliza el éster sn-2 de la fosfatidilcolina oxidada dando lisofosfatidilcolina y un ácido graso oxidativamente modificado. Ambos productos de la acción de Lp-PLA₂ son biológicamente activos con lisofosfatidilcolina, teniendo en particular varias actividades proaterogénicas atribuidas a ella que incluyen quimiotaxia de monocitos e inducción de disfunción endotelial, ambas de las cuales facilitan la acumulación de macrófagos derivada de monocitos dentro de la pared de la arteria.

Agentes que inhiben Lp-PLA₂

En algunas realizaciones, la presente invención se refiere a la inhibición de Lp-PLA₂. Como se ha desvelado en el presente documento, la inhibición puede ser la inhibición de transcritos de ácido nucleico que codifican Lp-PLA₂, por ejemplo, la inhibición de ARN mensajero (ARNm), o la inhibición de Lp-PLA₂ puede ser la inhibición de la expresión y/o inhibición de la actividad del producto génico de Lp-PLA₂, por ejemplo, el polipéptido o proteína de Lp-PLA₂, o isoformas de la misma. Como se usa en el presente documento, el término "producto génico" se refiere a ARN transcrito de un gen, o un polipéptido codificado por un gen o traducido a partir de ARN.

La inhibición de Lp-PLA₂ es por un agente. Puede usarse cualquier agente, por ejemplo, pero no se limita a, ácidos nucleicos, análogos de ácidos nucleicos, péptidos, fago, fagémidos, polipéptidos, peptidomiméticos, ribosomas, aptámeros, anticuerpos, moléculas orgánicas o inorgánicas pequeñas o grandes, o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, los agentes de la presente invención, como se definen en las reivindicaciones adjuntas, para su uso en los métodos desvelados en el presente documento, incluyen agentes que funcionan de inhibidores de la expresión de Lp-PLA, por ejemplo, inhibidores de ARNm que codifican Lp-PLA.

Agentes útiles en los métodos como se desvelan en el presente documento también pueden inhibir la expresión génica (es decir, suprimir y/o reprimir la expresión del gen). Tales agentes se denominan en la materia "silenciadores génicos" y son comúnmente conocidos para aquellos expertos habituales en la materia. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a, una secuencia de ácidos nucleicos, para un ARN, ADN o análogo de ácido nucleico, y puede ser mono o bicatenaria, y puede 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 a, ácido nucleico peptídico (PNA), PNA pseudo-complementario (pc-PNA), ácidos nucleicos bloqueados (LNA) y derivados de los mismos, etc. Los agentes de ácido nucleico también incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a, secuencias de ácidos nucleicos que codifican proteínas que actúan de represores transcripcionales, moléculas antisentido, ribozimas, secuencias de ácidos nucleicos inhibidores pequeños, por ejemplo, pero no se limitan a, iARN, iARNhp, ARNip, microiARN (miARN), oligonucleótidos antisentido, etc.

Como se usa en el presente documento, agentes útiles en el método como inhibidores de la expresión y/o inhibición de Lp-PLA₂ de la función de proteína de Lp-PLA₂ pueden ser cualquier tipo de entidad, por ejemplo, pero no se limita a, sustancias químicas, secuencias de ácidos nucleicos, análogos de ácidos nucleicos, proteínas, péptidos o fragmentos de los mismos. En la presente divulgación, el agente es cualquier sustancia química, entidad o resto, que incluye sin limitación, entidades no proteínicas sintéticas y que existen de forma natural. En la presente invención el agente es una molécula pequeña como se define en las reivindicaciones adjuntas que tiene un resto químico. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el resto químico es un compuesto basado en pirimidina como se desvela en el presente documento.

También se desvelan agentes útiles en los métodos como se desvela en el presente documento que son 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 proteína, proteínas mutadas, proteínas terapéuticas, proteínas truncadas y fragmentos de proteínas. También pueden seleccionarse agentes de proteína de un grupo que comprende proteínas mutadas, proteínas genéticamente manipuladas, péptidos, péptidos sintéticos, proteínas recombinantes, proteínas químicas, anticuerpos, midicuerpos, minicuerpos, triacuerpos, proteínas humanizadas, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, proteínas modificadas y fragmentos de los

mismos.

Alternativamente, agentes útiles en los métodos como se desvelan en el presente documento como inhibidores de Lp-PLA₂ puede ser una sustancia química, molécula pequeña, molécula o entidad o resto grande, que incluye sin limitación entidades no proteínaceas sintéticas y que existen de forma natural. En ciertas realizaciones, el agente es una molécula pequeña como se define en las reivindicaciones adjuntas que tiene los restos químicos que se desvelan en el presente documento.

Moléculas pequeñas

En la presente invención, los agentes que inhiben Lp-PLA₂ son moléculas pequeñas como se define en las reivindicaciones adjuntas. Pueden usarse inhibidores de Lp-PLA₂ irreversibles o reversibles en los métodos desvelados en el presente documento.

Se desvelan inhibidores de Lp-PLA₂ irreversibles en las solicitudes de patente WO 96/13484, WO96/19451, WO 97/02242, WO97/217675, WO97/217676, WO 97/41098 y WO97/41099 (SmithKline Beecham plc) y se desvelan, entre ellos, diversas series de compuestos de 4-tionil/sulfinil/sulfonil-azetidina que son inhibidores de la enzima Lp-PLA₂. Éstos son inhibidores acilantes irreversibles (Tew et al, Biochemistry, 37, 10087, 1998).

Inhibidores de Lp-PLA₂ eficaces en seres humanos son comúnmente conocidos por expertos habituales e incluyen aquellos que se someten a evaluación, por ejemplo, que se someten a evaluación pre-clínica y clínica que incluyen ensayos clínicos de fase II. Se han presentado varias aplicaciones y publicado por SmithKline Beecham y su sucesor GlaxoSmithKline. Una lista de solicitudes publicadas relevantes cedidas al mismo 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, habiendo sido ambas presentadas el 13 de octubre de 2006.

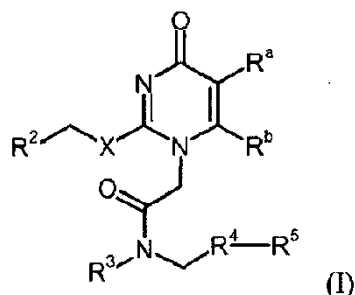
Otros inhibidores de Lp-PLA₂ útiles en los métodos como se desvelan en el presente documento se describen en las solicitudes de patente publicadas, por ejemplo, WO2006063791-A1, WO2006063811-A1, WO2006063812-A1, WO2006063813-A1, todas a nombre de Bayer Healthcare; y los documentos US2006106017-US2006106017-A1 cedidos a Korea Res. Inst. Bioscience & Biotechnology. Los inhibidores de Lp-PLA₂ también incluyen agentes conocidos, por ejemplo, pero no se limitan 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 de los compuestos desvelados en estos documentos son útiles para la profilaxis o tratamiento de úlceras de la piel. El modelo porcino de úlceras de la piel diabéticas descrito en el presente documento y ejemplificado en el ejemplo puede usarse por un experto habitual en la materia para determinar cuál de los compuestos desvelados u otros inhibidores de Lp-PLA₂, por ejemplo, anticuerpos, moléculas pequeñas o iARN son eficaces para el tratamiento o prevención de úlceras de la piel como se reivindica en el presente documento.

En una realización particular, los inhibidores de Lp-PLA₂ como se desvelan en las patentes 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 desvelados en el presente documento para la profilaxis o para el tratamiento de úlceras de la piel. En algunas realizaciones, los inhibidores de Lp-PLA₂ definidos en las reivindicaciones son como se han desvelado en la publicación de EE.UU. n° 2005/0033052A1, y las solicitudes de patente internacional WO 02/30904, WO 03/042218, WO 03/042206, WO03/042179, WO 03/041712, WO 03/086400 y WO 03/87088 son inhibidores de Lp-PLA₂ reversibles.

Fórmula (I)

Puede usarse un grupo de inhibidores de Lp-PLA₂ reversibles que se desvela 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) descrito en el documento WO 01/60805 y reivindicado en las patentes de EE.UU. 6.649.619 y 7.153.861, concretamente:



15 en la que:

Ra y Rb, junto con los átomos de carbono del anillo de pirimidina a los que están unidos, forman un anillo carbocíclico de 5 miembros condensado;

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

R3 es metilo o alquilo C(1-3) sustituido con NR8R9; o

25 R3 es Het-alquilo C(0 2) en el que Het es un anillo de heterocíclico de 5 a 7 miembros que tiene N y en el que N está sin sustituir o sustituido con alquilo C(1 6);

25 R4 y R5 forman juntos un resto de 4-(4-trifluorometilfenil)fenilo;

30 R8 y R9, que pueden ser iguales o diferentes, están seleccionados del grupo que consiste en hidrógeno, o alquilo C(16));

X es S, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

35 Son incluso de más interés los siguientes compuestos, todos dentro del alcance de la fórmula (I) y desvelada en la solicitud y patentes indicadas anteriormente:

1-(N-(2-(dietilamino)etil)-N-(4-(4-trifluorometilfenil)bencil)-aminocarbonilmetil)-2-(4-fluorobencil)tio-5,6-trimetilpirimidin-4-ona, usada en el estudio de cerdo descrito en el presente documento;

40 1-(N-(2-(dietilamino)etil)-N-(4-(4-trifluorometilfenil)bencil)-aminocarbonilmetil)-2-(2,3-difluorobencil)tio-5,6-trimetilpirimidin-4-ona;

1-(N-(2-(dietilamino)etil)-N-(4-(4-trifluorometilfenil)bencil)amino-carbonilmetil)-2-(3,4-difluorobencil)tio-5,6-trimetilpirimidin-4-ona;

45 1-(N-(2-(dietilamino)etil)-N-(4-(4-trifluorometilfenil)bencil)amino-carbonilmetil)-2-(2,3,4-trifluorobencil)tio-5,6-trimetilpirimidin-4-ona;

50 1-(N-(2-(dietilamino)etil)-N-(4-(4-trifluorometilfenil)bencil)amino,carbonilmetil)-2-(2-fluorobencil)tio-5,6-trimetilpirimidin-4-ona;

1-(N-metil-N-(4-(4-trifluorometilfenil)bencil)aminocarbonilmetil)-2-(4-fluorobencil)tio-5,6-trimetilpirimidin-4-ona;

55 1-(N-(2-(1-piperidino)etil)-N-(4-(4-trifluorometilfenil)bencil)amino-carbonilmetil)-2-(4-fluorobencil)tio-5,6-trimetilpirimidin-4-ona;

1-(N-(1-etilpiperidin-4-il)-N-(4-(4-trifluorometilfenil)bencil)amino-trifluorometilfenil)bencil)amino-carbonilmetil)-2-(4-fluorobencil)tio-5,6-trimetilpirimidin-4-ona;

60 1-(N-(2-etilamino-2-metilpropil)-N-(4-(4-trifluorometilfenil)bencil)-aminocarbonilmetil)-2-(4-fluorobencil)tio-5,6-trimetilpirimidin-4-ona;

N-(2-terc-butilaminoetil)-N-(4-(4-trifluorometilfenil)bencil)amino-carbonilmetil)-2-(4-fluorobencil)tio-5,6-trimetilpirimidin-4-ona;

65 1-(N-(1-metilpiperidin-4-il)-N-(4-(4-trifluorometilfenil)bencil)-trifluorometilfenil)bencil)-aminocarbonilmetil)-2-

(4-fluorobencil)tio-5,6-trimetilenpirimidin-4-ona;

1-(N-(1-isopropilpiperidin-4-il)-N-(4-(4-trifluorometilfenil)bencil)-trifluorometilfenil)bencil)-aminocarbonilmetil)-2-(4-fluorobencil)tio-5,6-trimetilenpirimidin-4-ona;

1-(N-(1-(2-metoxietilpiperidin-4-il)-N-(4-(4-trifluorometilfenil)bencil)-aminocarbonilmetil)-2-(4-fluorobencil)tio-5,6-trimetilenpirimidin-4-ona;

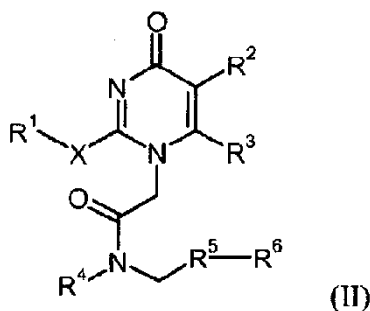
1-(N-(2-(etilamino)etil)-N-(4-(4-trifluorometilfenil)bencil)-aminocarbonilmetil)-2-(4-fluorobencil)tio-5,6-trimetilenpirimidin-4-ona; o una sal farmacéuticamente aceptable de estos compuestos.

Métodos para preparar estos compuestos se desvelan en los documentos citados.

Un segundo proceso para preparar 1-(N-(2-(dietilamino)etil)-N-(4-(4-trifluorometilfenil)bencil)-aminocarbonilmetil)-2-(4-fluorobencil)tio-5,6-trimetilenpirimidin-4-ona puede encontrarse en la solicitud WO 03/016287 (publicación de EE.UU. nº 20050014793A1).

Fórmula (II)

Otro grupo de compuestos que puede ser útil en la puesta en práctica de los métodos desvelados en el presente documento se desvelan en el documento WO 02/30911; la patente de EE.UU. 7.169.924 se corresponde con esta solicitud internacional. La fórmula genérica en ese caso, representada aquí como la fórmula (II), es la siguiente:



en la que:

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), hidroxil, halógeno, CN y mono a perfluoro-alquilo C(1-4);

R2 es halógeno, alquilo C(1-3), alcoxi C(1-3), hidroxialquilo C(1-3), alquiltio C(1-3), alquil C(1-3)-sulfinilo, aminoalquilo C(1-3), mono- o di-alquil C(1-3)-aminoalquilo C(1-3), alquil C(1-3)-carbonilaminoalquilo C(1-3), alcoxi C(1-3)-alquil C(1-3)-carbonilaminoalquilo C(1-3), alquil C(1-3)-sulfonilaminoalquilo C(1-3), alquil C(1-3)-carboxil, alquil C(1-3)-carboxialquilo C(1-3), y

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 a los que están unidos, forman un anillo carbocíclico de 5 o 6 miembros condensado; o

R2 y R3, junto con los átomos de carbono del anillo de pirimidona a los que están unidos, forman un anillo benzo o de heteroarilo condensado 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), C(1-alquiltio C(1-6) o mono a perfluoro-alquilo C(1-4);

R4 es hidrógeno, alquilo C(1-6) que puede estar sin sustituir o sustituido con 1, 2 o 3 sustituyentes seleccionados de hidroxil, halógeno, OR7, COR7, carboxil, COOR7, CONR9R10, NR9R10, NR7COR8, mono- o di (hidroxil-alquil C(1-6))amino y N-hidroxialquil C(1-6)-N-alquil C(1-6)amino; o

R4 es Het-alquilo C(0-4) en el que Het es un anillo de heterociclilo de 5 a 7 miembros que comprende N y opcionalmente O o S, y en el que N puede estar sustituido con COR7, COOR7, CONR9R10 o alquilo C(1-6) opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 sustituyentes seleccionados de hidroxil, halógeno, OR7, COR7, carboxil, COOR7, CONR9R10 o NR9R10, por ejemplo, piperidin-4-ilo, pirrolidin-3-ilo;

R5 es un anillo de 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 de arilo o de heteroarilo que está adicionalmente 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), alquil 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 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);

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

X es alquileo C(2-4), opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 sustituyentes seleccionados de metilo y etilo, o CH=CH.

Todas las sales de fórmula (II), además, pueden usarse en el presente método de tratamiento.

Son de particular interés los compuestos de fórmula (II) aquí, donde, como se indica en el documento WO 02/30911 para la fórmula (I) allí, R1 puede ser un grupo fenilo opcionalmente sustituido con 1, 2, 3 o 4 sustituyentes que pueden ser iguales o diferentes seleccionados de halógeno, alquilo C1-C6, trifluorometilo o alcoxi C1-C6. Más específicamente, fenilo está sin sustituir o sustituido con 1, 2, 3 o 4 sustituyentes de halógeno, particularmente, de 1 a 3 grupos flúor, y lo más particularmente, 2,3-diflúor, 2,4-diflúor o 4-flúor.

Otra realización de fórmula (II) aquí es donde Y es -CH₂CH₂-.

Además, son de interés los compuestos de fórmula (II) en la que R2 es hidrógeno, por defecto, o es halógeno, 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. Son de particular interés los compuestos de fórmula (II) en la que R2 es distinto de hidrógeno, n en (R₂)_n es 1, 2 o 3, y el patrón de sustitución es meta y/o para, particularmente para, es decir, un sustituyente en la posición 4. Véanse también aquellos compuestos en los que R2 es 4-trifluorometilo o 4-trifluorometoxi.

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

R5 puede ser hidrógeno, alquilo C(1-6) que es una cadena lineal, o ramificada. Es de particular interés 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 el presente documento hay otro sub-grupo de compuestos en los que:

R1 es fenilo sustituido con 2,3-diflúor;

R2 y R3, junto con los átomos de carbono del anillo de pirimidina a los que están unidos, forman un anillo de ciclopentenilo de 5 miembros condensado;

R4 es 2-(dietilamino)etilo;

R5 es fenilo;

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.

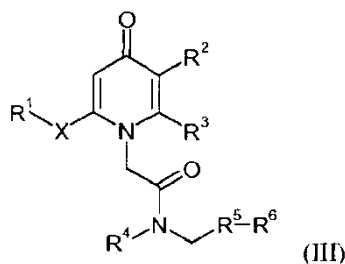
Compuestos particulares de fórmula (II) en el presente documento de interés son:

- 5 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 de 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;
- 10 bitartrato de 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 de 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;
- 15 bitartrato de 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 de 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;
- 20 bitartrato de 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 de 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;
- 25 bitartrato de (+/-)-N-(2-dietilaminoetil)-2-(2-fenil-propil)-4-oxo-4,5,6,7-tetrahidro-ciclopentapirimidin-1-il)-N-(4'-trifluorometil-bifenil-4-ilmetil)acetamida;
- 30 bitartrato de 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 de 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;
- 35 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;
- 40 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;
- bitartrato de 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;
- 45 N-(2-dietilaminoetil)-2-(2-(2-(3-clorofenil)-etil)-4-oxo-4,5,6,7-tetrahidro-ciclopentapirimidin-1-il)-N-(4'-trifluorometil-bifenil-4-ilmetil)acetamida;
- 50 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-metilfenil)-etil)-4-oxo-4,5,6,7-tetrahidro-ciclopentapirimidin-1-il)-N-(4'-trifluorometil-bifenil-4-ilmetil)acetamida;
- 55 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;
- bitartrato de 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;
- 60 bitartrato de 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;

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

65

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



en la que:

15 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, mono a perfluoro-alquilo C(1-4), mono a perfluoro-alcoxi C(1-4)-arilo y aril-alquilo C(14);

20 R2 es halógeno, alquilo C(1-3), alcoxi C(1-3), hidroxialquilo C(1-3), alquiltio C(1-3), alquil C(1-3)-sulfonilo, aminoalquilo C(1-3), mono- o di-alquil C(1-3)-aminoalquilo C(1-3), alquil C(1-3)-carbonilaminoalquilo C(1-3), alcoxi C(1-3)-alquil C(1-3)-carbonilaminoalquilo C(1-3), alquil C(1-3)-sulfonilaminoalquilo C(1-3), alquil C(1-3)-carboxi, alquil C(1-3)-carboxialquilo C(1-3), y

25 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 piridona a los que están unidos, forman un anillo carbocíclico de 5 o 6 miembros condensado; o

30 R2 y R3, junto con los átomos de carbono del anillo de piridona a los que están unidos, forman un anillo benzo o de heteroarilo condensado 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);

35 R4 es hidrógeno, alquilo C(1-6) que puede estar sin sustituir o sustituido con 1, 2 o 3 sustituyentes seleccionados de hidroxilo, halógeno, OR7, COR7, carboxi, COOR7, CONR9R10, NR9R10, NR7COR8, mono- o di (hidroxilo-alquil C(1-6))amino y N-hidroxialquil C(1-6)-N-alquil C(1-6)amino; o

40 R4 es Het-alquilo C(0-4) en el que Het es un anillo de heterociclilo de 5 a 7 miembros que comprende N y opcionalmente O o S, y en el que N puede estar sustituido con COR7, COOR7, CONR9R10 o alquilo C(1-6) opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 sustituyentes seleccionados de hidroxilo, halógeno, OR7, COR7, carboxi, COOR7, CONR9R10 o NR9R10, por ejemplo, piperidin-4-ilo, pirrolidin-3-ilo;

45 R5 es un anillo de 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), aril-alcoxi (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);

50 R6 es un anillo de arilo o heteroarilo que está adicionalmente 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), alquil 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-C(1-4)alcoxi o alquilo C(5-10);

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

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

65 X es un grupo alquilenilo C(2-4) (opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 sustituyentes seleccionados de metilo y etilo), CH=CH, (CH2)_nS o (CH2)_nO en las que n es 1, 2 o 3;

o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

Son de particular interés aquellos compuestos de fórmula (III) en la que R2 y R3, junto con los átomos de carbono del anillo de piridona a los que están unidos, forman un anillo benzo o de heteroarilo condensado 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(1-4) o alquiltio C(1-4), o mono a perfluoro-alquilo C(1-4). Preferentemente, R1 es fenilo opcionalmente sustituido con halógeno, alquilo C(1-6), trifluorometilo, alcoxi C(1-6), preferentemente, de 1 a 3 flúor, más preferentemente, 2,3-diflúor. Ejemplos representativos de R4 incluyen piperidin-4-ilo sustituido en la posición 1 con metilo, isopropilo, 1-(2-metoxietilo), 1-(2-hidroxietilo), t-butoxicarbonilo o etoxicarbonilmetilo; etilo sustituido en la posición 2 con aminoetilo; 1-etilpiperidinilmetilo; piperidin-4-ilo; 3-dietilaminopropilo; 4-pirrolidin-1-ilbutilo y 1-etilpirrolidin-3-ilo. Preferentemente, R4 es 1-(2-metoxietil)piperidin-4-ilo, 1-metilpiperidin-4-ilo o 1-etilpirrolidin-3-ilo. Ejemplos representativos de R5 incluyen fenilo y piridilo. Preferentemente, R5 es fenilo. Ejemplos representativos de R6 incluyen fenilo opcionalmente sustituido con halógeno, o trifluorometilo, preferentemente en la posición 4 y hexilo. Preferentemente, R6 es fenilo sustituido con trifluorometilo en la posición 4. Ejemplos representativos adicionales de R6 incluyen fenilo sustituido con 1 o más alquilo C(1-3). Preferentemente, R6 es fenilo sustituido con etilo en la posición 4. Preferentemente, R5 y R6 forman juntos un sustituyente 4-(fenil)fenilo o 2-(fenil)piridinilo en el que el anillo de fenilo remoto puede estar opcionalmente sustituido con halógeno o trifluorometilo, preferentemente en la posición 4. Preferentemente, X es alquilenilo C(2-4), más preferentemente alquilenilo C(2-3), lo más preferentemente, (CH₂)₂, o CH₂S.

Se apreciará que dentro del grupo de compuestos que comprenden la fórmula (III) está el sub-grupo de compuestos en el que:

R1 es fenilo sustituido con 2,3-diflúor;

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

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

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

X es CH₂S o (CH₂)₂.

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

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

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

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

bitartrato de N-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2,3-difluorobenciltio)-4-oxo-5,6-trimetilpiridin-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;

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

bitartrato de N-(1-metilpiperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4H-[1,8]naftiridin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

N-(1-(2-metoxietil)piperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4H-[1,8]naftiridin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

bitartrato de N-(1-(2-metoxietil)piperidin-4-il)-2-[2-(2,3-difluorobenciltio)-4-oxo-4H-[1,8]naftiridin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

bitartrato de N-(1-etilpiperidin-4-il)-2-[2-(2,3-difluorobenciltio)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-etilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

- bitartrato de N-(1-etilpiperidin-4-il)-2-[5-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-2-metil-7-oxo-7H-tiazolo[4,5-b]piridin-4-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;
- 5 bitartrato de (\pm)-N-(1-etilpirrolidin-3-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;
- bitartrato de (\pm)-N-(1-etilpirrolidin-3-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorobenciltio)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;
- 10 bitartrato de N-(1-(2-metoxietil)piperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorobenciltio)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;
- diclorhidrato de N-(1-(2-metoxietil)piperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorobenciltio)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;
- 15 monoparatoluenosulfonato de N-(1-(2-metoxietil)piperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorobenciltio)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;
- bitartrato de N-(1-(2-metoxietil)piperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4H-[1,8]naftiridin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;
- 20 monoclorhidrato de N-(1-(2-metoxietil)piperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4H-[1,8]naftiridin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;
- 25 diclorhidrato de N-(1-(2-metoxietil)piperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4H-[1,8]naftiridin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;
- bitartrato de N-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(4-fluorobenciltio)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-trifluoro-metilbifenil-4-ilmetil)acetamida;
- 30 bitartrato de N-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(4-fluorobenciltio)-4-oxo-5,6-trimetilenpiridin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;
- bitartrato de N-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2,3-difluorobenciltio)-4-oxo-5,6-trimetilenpiridin-1-il]-N-(4'-trifluorometil-bifenil-4-ilmetil)acetamida;
- 35 N-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(4-fluorofenil)etil)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-trifluoro-metilbifenil-4-ilmetil)acetamida;
- bitartrato de N-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2-(3,4-difluorofenil)etil)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;
- 40 bitartrato de N-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2-(2-fluorofenil)etil)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-trifluoro-metilbifenil-4-ilmetil)acetamida;
- 45 bitartrato de N-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2-(3-clorofenil)etil)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-trifluoro-metilbifenil-4-ilmetil)acetamida;
- bitartrato de N-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4H-[1,8]naftiridin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;
- 50 N-(1-etilpiperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4H-[1,8]naftiridin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;
- 55 bitartrato de N-(1-etilpiperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;
- bitartrato de N-(2-pirrolidin-1-iletel)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;
- 60 bitartrato de N-(1-isopropilpiperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)-acetamida;
- bitartrato de N-(2-piperidin-1-iletel)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;
- 65

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

- bitartrato de N-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2,3-difluorobenciltio)-4-oxo-4H-[1,8]naftiridin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;
- 5 bitartrato de N-(1-etilpiperidin-4-il)-2-[2-(2,3-difluorobenciltio)-4-oxo-4H-[1,8]naftiridin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;
- bitartrato de N-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-metilbifenil-4-ilmetil)acetamida;
- 10 bitartrato de N-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2,3-difluorobenciltio)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-metilbifenil-4-ilmetil)acetamida;
- bitartrato de N-(1-etoxicarbonilmetilpiperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)-acetamida;
- 15 bitartrato de N-(1-isopropilpiperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4H-[1,8]naftiridin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;
- bitartrato de N-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2,3-difluorobenciltio)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(3',4'-dimetilbifenil-4-ilmetil)acetamida;
- 20 bitartrato de N-(1-(t-butoxicarbonil)piperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4H-[1,8]naftiridin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;
- 25 bitartrato de N-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2,3-difluorobenciltio)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(3',4'-difluorobifenil-4-ilmetil)acetamida;
- bitartrato de N-(2-dietilaminoetil)-2-[6-(2,3-difluorobenciltio)-4-oxo-4H-tieno[2,3-b]piridin-7-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;
- 30 bitartrato de N-(1-metilpiperidin-4-il)-2-[2-(2,3-difluorobenciltio)-4-oxo-4H-[1,8]naftiridin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;
- bitartrato de N-(1-etilpiperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3,4-trifluorofeniletel)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;
- 35 bitartrato de N-(2-dietilaminoetil)-2-[6-(2,3-difluorobenciltio)-2-metil-4-oxo-2,4-dihidro-pirazolo[3,4b]piridin-7-il]-N-(4'-trifluorometil-bifenil-4-ilmetil)acetamida;
- 40 bitartrato de 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 de 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;
- 45 bitartrato de N-(1-etilpiperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-etil-bifenil-4-ilmetil)acetamida;
- bitartrato de N-(1-isopropilpiperidin-4-il)-2-[5-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-2-metil-7-oxo-7H-tiazolo[4,5-b]piridin-4-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;
- 50 bitartrato de N-(1-(2-metoxietil)piperidin-4-il)-2-[5-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-2-metil-7-oxo-7H-tiazolo[4,5-b]piridin-4-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;
- 55 bitartrato de N-(1-etilpiperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-5,6-trimetilenpiridin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;
- bitartrato de N-(1-metilpiperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-5,6-trimetilenpiridin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;
- 60 bitartrato de N-(1-(2-metoxietil)piperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-5,6-trimetilenpiridin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;
- 65 bitartrato de N-(1-isopropilpiperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-5,6-trimetilenpiridin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;

- bitartrato de N-(1-etilpiperidin-4-il)-2-[5-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-2-metil-7-oxo-2,7-dihidropirazolo[4,3b]piridin-4-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;
- 5 bitartrato de 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 de N-(1-etilpiperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-5,6-trimetilenpiridin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;
- 10 bitartrato de N-(1-etilpiperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-7-metil-4-oxo-4H-[1,8]naftiridin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;
- bitartrato de N-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-7-metil-4-oxo-4H-[1,8]naftiridin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;
- 15 bitartrato de N-(1-metilpiperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-7-metil-4-oxo-4H-[1,8]naftiridin-1-il]-N-(4'-trifluoro-metilbifenil-4-ilmetil)acetamida;
- 20 bitartrato de N-(1-isopropilpiperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-7-metil-4-oxo-4H-[1,8]naftiridin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)-acetamida;
- bitartrato de N-(1-(2-metoxietil)piperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-7-metil-4-oxo-4H-[1,8]naftiridin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)-acetamida;
- 25 bitartrato de N-(1-metilpiperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorobenciltio)-4-oxo-5,6-trimetilenpiridin-1-il]-N-(4'-trifluorometil-bifenil-4-ilmetil)acetamida;
- bitartrato de N-(1-etilpiperidin-4-il)-2-[2-(2,3-difluorobenciltio)-4-oxo-5,6-trimetilenpiridin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;
- 30 bitartrato de N-(1-isopropilpiperidin-4-il)-2-[2-(2,3-difluorobenciltio)-4-oxo-5,6-trimetilenpiridin-1-il]-N-(4'-trifluorometil-bifenil-4-ilmetil)acetamida;
- 35 bitartrato de N-(1-(2-metoxietil)piperidin-4-il)-2-[2-(2,3-difluorobenciltio)-4-oxo-5,6-trimetilenpiridin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;
- bitartrato de N-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-5,6-tetrametilenpiridin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)-acetamida;
- 40 bitartrato de N-(1-metilpiperidin-4-il)-2-[2-(2,3-difluorobenciltio)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-clorobifenil-4-ilmetil)acetamida;
- bitartrato de N-(1-metilpiperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-clorobifenil-4-ilmetil)acetamida;
- 45 bitartrato de N-(1-etilpiperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-clorobifenil-4-ilmetil)acetamida;
- 50 bitartrato de N-(1-(2-metoxietil)piperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-clorobifenil-4-ilmetil)acetamida;
- bitartrato de N-(1-isopropilpiperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-clorobifenil-4-ilmetil)acetamida;
- 55 bitartrato de N-(2-dietilaminoetil)-2-[6-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-2-metil-4-oxo-4H-pirazolo[3,4-b]piridin-7-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;
- N-(1-(t-butoxicarbonil)piperidin-4-il)-2-[2-(2,3-difluorobenciltio)-4-oxo-4H-[1,8]naftiridin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;
- 60 bitartrato de N-(1-etilpiperidin-4-il)-2-[6-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-2-(2-metoxietil)-4-oxo-4H-pirazolo-[3,4-b]piridin-7-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida;
- 65 bitartrato de N-(2-dietilaminoetil)-2-[4-oxo-2-(2-(2,3,4-trifluorofenil)etil)-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-trifluorometil-bifenil-4-ilmetil)acetamida;

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

5 bitartrato de N-(2-dietilaminoetil)-2-[2-(2-(3-fluoro-fenil)etil)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-il-metil)acetamida;

bitartrato de N-(piperidin-4-il)-2-[2-(2,3-difluorobenciltio)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-trifluoro-metilbifenil-4-il-metil)acetamida;

10 bitartrato de N-(piperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-il-metil)-acetamida;

bitartrato de N-(piperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-5,6-trimetilpiridin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-il-metil)acetamida;

15 bitartrato de N-(piperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4H-[1,8]naftiridin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-il-metil)acetamida;

20 trifluoroacetato de N-(piperidin-4-il)-2-[2-(2,3-difluorobenciltio)-4-oxo-4H-[1,8]naftiridin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-il-metil)acetamida;

N-(2-etilaminoetil)-2-[2-(2,3-difluorobenciltio)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-il-metil)acetamida;

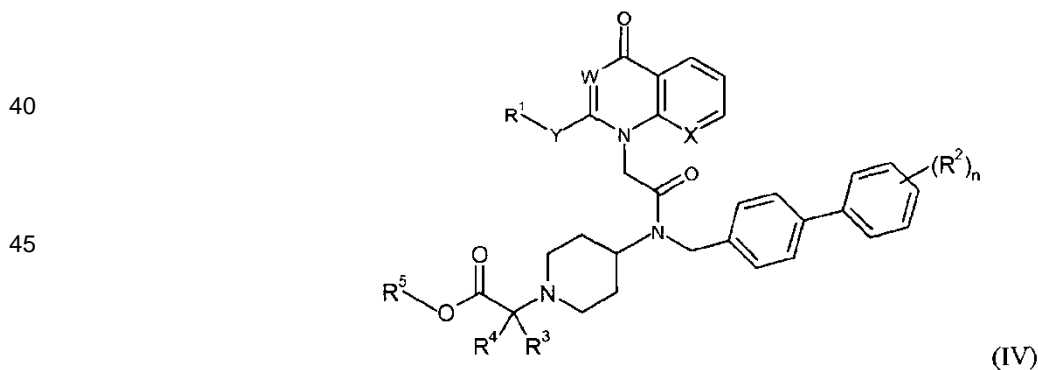
25 N-(2-etilaminoetil)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-il-metil)acetamida;

bitartrato de N-(1-(2-hidroxietil)piperidin-4-il)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4H-quinolin-1-il]-N-(4'-trifluorometilbifenil-4-il-metil)acetamida;

30 o la base libre de los mismos, u otra sal farmacéuticamente aceptable.

Fórmula (IV)

35 También son de interés compuestos de fórmula (IV)



en la que:

55 R1 es un grupo arilo, sin sustituir o sustituido con 1, 2, 3 o 4 sustituyentes que pueden ser iguales o diferentes seleccionados del grupo que consiste en alquilo C1-C6, alcoxi C1-C6, alquiltio C1-C6, aril-alcoxi C1-C6, hidroxilo, halógeno, CN, COR6, COOR6, NR6COR7, CONR8R9, SO2NR8R9, NR6SO2R7, NR8R9, haloalquilo C1-C4 y haloalcoxi C1-C4;

60 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 C2-C4,

65 R2 es hidrógeno, alquilo C1-C6, alcoxi C1-C6, alquiltio C1-C6, aril-alcoxi C1-C6, hidroxilo, halógeno, CN, COR6, carboxi, COOR6, NR6COR7, CONR8R9, SO2NR8R9, NR6SO2R7, NR8R9, mono a perfluoro-alquilo C1-C6, o mono a perfluoro-alcoxi C1-C6;

n es 0-5;

R3 es alquilo C1-C4;

5 R4 es alquilo C1-C4;

10 R5 es hidrógeno, alquilo C1-C10, alqueno C2-C10, alquino C2-C10, haloalquilo C1-C4, cicloalquilo C3-C8, cicloalquilo C3-C8, cicloalquil C3-C8-alquilo C1-C4, cicloalqueno C5-C8, cicloalqueno C5-C8-alquilo C1-C4, heterocicloalquilo de 3-8 miembros, heterocicloalquil de 3-8 miembros-alquilo C1-C4, arilo C6-C14, aril C6-C14-alquilo C1-C10, heteroarilo, o heteroarilalquilo C1-C10; en el que cada grupo está opcionalmente una o más veces con el mismo grupo y/o diferente que es alcoxi C1-C6, alquilitio C1-C6, arilalcoxi C1-C6, hidroxilo, halógeno, CN, NR8R9 o haloalcoxi C1-C4

15 R6 y R7 son independientemente hidrógeno o alquilo C1-C10;

20 R8 y R9 son iguales o diferentes y son hidrógeno o alquilo C1-C10, o R9 y R10, junto con el nitrógeno al que están unidos, forman un anillo de 5 a 7 miembros que opcionalmente contiene uno o más heteroátomos adicionales seleccionados de oxígeno, nitrógeno y azufre, y opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en hidroxilo, oxo, alquilo C1-C4, alquil C1-C4-carboxilo, arilo y aril-alquilo C1-C4;

o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

25 Sin pretender excluir ningún sustituyente definido y/o sus radicales citados del alcance de la fórmula (IV), los siguientes grupos R y los radicales asociados son de particular interés:

30 Con respecto a R1, puede ser un grupo fenilo opcionalmente sustituido con 1, 2, 3 o 4 sustituyentes que pueden ser iguales o diferentes seleccionados de halógeno, alquilo C1-C6, trifluorometilo o alcoxi C1-C6. Más específicamente, fenilo está sin sustituir o sustituido con 1, 2, 3 o 4 sustituyentes de halógeno, particularmente de 1 a 3 grupos flúor, y lo más particularmente 2,3-diflúor, 2,4-diflúor o 4-flúor.

En el presente documento se desvela la fórmula (I) en la que Y es -CH₂CH₂-.

35 La divulgación también proporciona un compuesto de fórmula (I) en la que R2 es hidrógeno, por defecto, o es halógeno, 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. Son de particular interés los compuestos en los que R2 es distinto de hidrógeno, n en (R2)n es 1, 2 o 3, y el patrón de sustitución es meta y/o para, particularmente para, es decir, un sustituyente de la posición 4. Compuestos ejemplificados incluyen aquellos en los que R2 es 4-trifluorometilo o 4-trifluorometoxi.

40 R3 y R4 pueden ser iguales o diferentes y son metilo, etilo, n-propilo o n-butilo. Son de particular interés aquellos compuestos de fórmula (I) en la que R3 y R4 son iguales y son metilo o etilo; metilo es de particular interés.

45 R5 puede ser hidrógeno, siendo alquilo C(1-6) una cadena lineal, o ramificada. Es de particular interés metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, sec-butilo, iso-butilo, t-butilo, n-pentilo o n-hexilo.

50 Cualquiera de los compuestos descritos anteriormente en el presente documento puede prepararse en forma cristalina o no cristalina, y, si es cristalina, puede estar solvatado, por ejemplo, como el hidrato. La presente invención incluye dentro de su alcance solvatos estequiométricos (por ejemplo, hidratos) de los agentes definidos en las reivindicaciones adjuntas.

55 Ciertos de los compuestos descritos en el presente documento pueden contener uno o más átomos quirales, o pueden ser capaces de existir de otro modo como dos enantiómeros. Los compuestos útiles en los métodos como se describen en el presente documento incluyen mezclas de enantiómeros, además de enantiómeros purificados o mezclas enantioméricamente enriquecidas. También están incluidos dentro del alcance de la presente divulgación los isómeros individuales de los compuestos representados por la fórmulas (I) - (IV), además de cualquier mezcla completa o parcialmente equilibrada de los mismos. La presente invención también cubre los isómeros individuales de los compuestos definidos en las reivindicaciones adjuntas como mezclas con isómeros de los mismos en los que uno o más centros quirales están invertidos. Por tanto, se entiende que cualquier tautómero y mezclas de tautómeros de los compuestos definidos en las reivindicaciones adjuntas están incluidos dentro del alcance de la invención. Las diferentes formas isoméricas pueden separarse o resolverse una de la otra por métodos convencionales, o puede obtenerse cualquier isómero dado por métodos sintéticos convencionales o por síntesis estereoespecíficas o asimétricas.

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

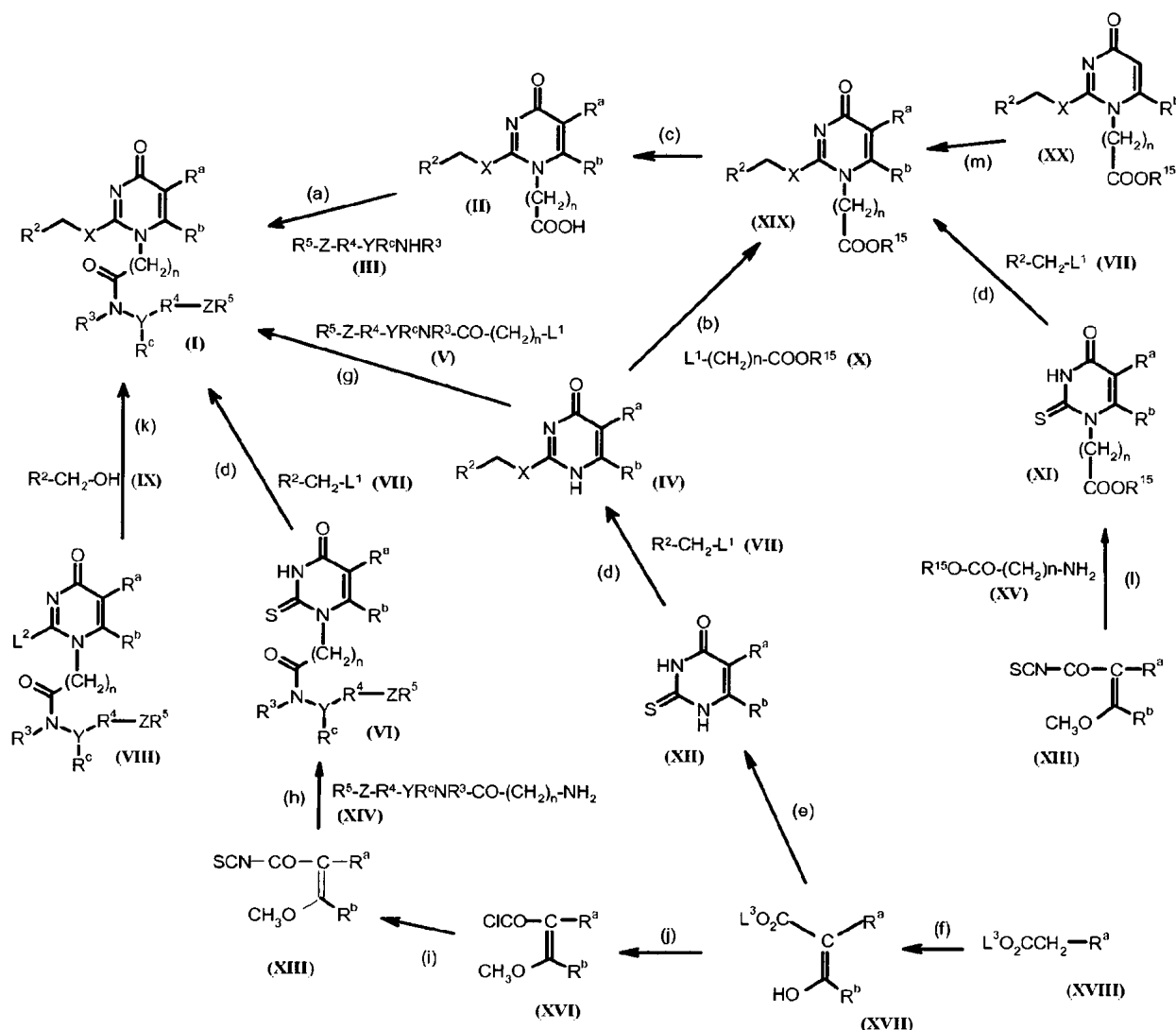
Se han publicado métodos para preparar los compuestos de fórmula (I), (II) y (III) en la bibliografía de patentes. Por ejemplo, pueden encontrarse métodos para preparar la fórmula (I) en los documentos WO 01/60805 y WO03/016287. Se han explicado métodos para preparar los compuestos de fórmula (II) en el documento WO 02/30911. Y puede encontrarse métodos para preparar los compuestos de fórmula (III) en el documento WO 02/30904. Este documento proporciona métodos para preparar los compuestos de fórmula (IV), métodos copiados de las solicitudes provisionales de EE.UU. 60/829.328 y 60/829.327.

Algunos ejemplos de síntesis se proporcionan a continuación. Para diferenciar entre los varios grupos genéricos de compuestos en los ejemplos en el presente documento, materiales referentes a la fórmula (I) se marcarán como "Ejemplo de enfoque de síntesis (I)-1" y siguientes, para la fórmula (II) "Ejemplo de enfoque de síntesis (II)-1" y siguientes, para la fórmula (III), "Ejemplo de enfoque de síntesis (III)-1" y siguientes y para la fórmula (IV) "Ejemplo de enfoque de síntesis (IV)-1 y siguientes.

Síntesis de la fórmula (I)

Pueden prepararse compuestos de fórmula (I) por el esquema de procesos I, como se desvela en el documento WO 01/60805:

Esquema 1



en el que:

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

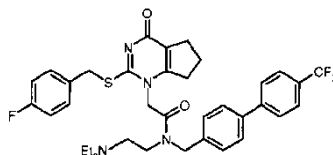
R¹⁵ es un grupo alquilo C(1-6), por ejemplo, etilo o t-butilo y

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

Una reacción a modo de ejemplo para preparar un compuesto de fórmula (I) de interés es la siguiente:

Ejemplo de enfoque de síntesis (I)-1 (a)

1-(N-(2-(Dietilamino)etil)-N-(4-(4-trifluorometilfenil)bencil)aminocarbonil-metil)-2-(4-fluorobencil)tio-5,6-trimetilenpirimidin-4-ona



Se suspendió el Producto intermedio B69 del documento WO 01/60805 (87,1 g, 0,26 moles) en diclorometano (2,9 litro). Se añadieron 1-hidroxibenzotriazol hidratado (35,2 g, 0,26 moles) y clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (99,7 g, 0,52 moles) y la suspensión se agitó durante 45 minutos, momento por el cual se había obtenido la disolución completa. Se añadió el Producto intermedio A30 del documento WO 01/60805 (91,2 g, 0,26 moles) como una disolución en diclorometano (100 ml) durante 5 minutos y la disolución se agitó durante 4 horas. Se añadió mezcla de disolución saturada de cloruro de amonio:agua (1:1, 1 litro) y la disolución se agitó durante 10 minutos. La fase orgánica se separó y se extrajo con mezcla de cloruro de amonio saturado:agua (1:1, 1 litro), los extractos tuvieron pH 6. La fase orgánica se separó y se extrajo con agua (1 litro) que contenía ácido acético (10 ml), extracto pH 5. Se separó la fase de diclorometano y se extrajo con mezcla de disolución saturada de carbonato sódico: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 disolución marrón se secó sobre sulfato de sodio anhidro en presencia de carbón vegetal decolorante (35 g), se filtró y el disolvente se eliminó a vacío dando una espuma marrón oscura. La espuma se disolvió en acetato de *iso*-propilo (100 ml) y el disolvente se eliminó a vacío. El residuo gomoso marrón oscuro se disolvió en acetato de *iso*-propilo hirviendo (500 ml), se enfrió a temperatura ambiente, se sembró y se agitó durante la noche. El sólido de color crema pálido producido se separó por filtración y se lavó con acetato de *iso*-propilo (100 ml). El sólido se succiona en seco en el sinterizado durante 1 hora, a continuación recrystalizó en acetato de *iso*-propilo (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 a vacío dando el compuesto del título, 110 g, rendimiento del 63,5 %. RMN ¹H (CDCl₃, mezcla de rotámetros aprox. 1,9:1) δ 0,99 (6H, t), 2,10 (2H, m), 2,50 (4H, q), 2,58/2,62 (2H, 2 x t), 2,70/2,82 (2H, 2 x t), 2,86 (2H, t), 3,28/3,58 (2H, 2 x t), 4,45/4,52 (2H, 2 x s), 4,68/4,70 (2H, 2 x s), 4,93 (2H, s), 6,95 (2H, m), 7,31 (2H, d), 7,31/7,37 (2H, 2 x m), 7,48/7,52 (2H, d), 7,65 (2H, m), 7,72 (2H, m); EM (APCI) (M+H)⁺ 667; p.f. 125 °C (por DSC – endoterma asimétrica).

Ejemplo de enfoque de síntesis (I)-1 (b)

Bitartrato de 1-(N-(2-(dietilamino)etil)-N-(4-(4-trifluorometilfenil)bencil)aminocarbonil-metil)-2-(4-fluorobencil)tio-5,6-trimetilenpirimidin-4-ona

Se preparó a partir de los productos 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, mezcla de rotámetros aprox. 1:1) 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); EM (APCI⁺) hallada (M+1) = 667; C₃₆H₃₈F₄N₄O₂S requiere 666.

Ejemplo de enfoque de síntesis (I)-1 (c)

Clorhidrato de 1-(N-(2-(dietilamino)etil)-N-(4-(4-trifluorometilfenil)bencil)aminocarbonil-metil)-2-(4-fluorobencil)tio-5,6-trimetilenpirimidin-4-ona

La base libre del Ejemplo (I)-1(a) (3,00 g, 0,0045 moles) se suspendió con agitación en isopropanol (30 ml) y se calentó a 45 °C dando una disolución transparente. A continuación, la disolución se enfrió a temperatura ambiente y se añadió ácido clorhídrico conc. (0,40 ml, 0,045 moles). La suspensión resultante se agitó a continuación 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 isopropanol (10 ml), seguido de heptano (30 ml), antes de secarse a vacío dando el compuesto del título como un sólido 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).

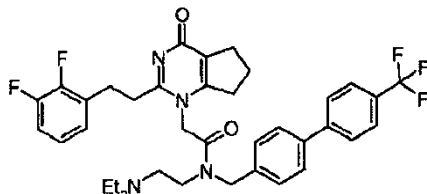
Síntesis de fórmula (II)

Una descripción de cómo preparar los compuestos de fórmula (II) y ejemplos de productos intermedios y productos

finales para los compuestos anteriormente mencionados puede encontrarse en la solicitud internacional publicada WO 02/30911. Un método de última etapa para preparar un compuesto útil en la presente invención es el Ejemplo (II)-1.

5 Ejemplo de enfoque de síntesis (II)-1

Bitartrato de 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



Una disolución 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 mmoles), 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (0,56 g, 1,45 mmoles), 1-hidroxibenzotriazol hidratado (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 mmoles) en diclorometano (10 ml) se agitó a temperatura ambiente durante la noche, a continuación se diluyó con diclorometano (30 ml), se lavó con bicarbonato sódico acuoso y se evaporó. El residuo se purificó por cromatografía (cartucho de sílice de 10 g, acetato de etilo-acetona) dando el compuesto del título como una espuma amarilla (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); EM (APCI+) hallada (M+1) = 667;

³⁷H₃₉F₅N₄O₂ requiere 666.

Se añadió ácido *d*-tartárico (0,09 g, 0,60 mmoles) a una disolución de la base libre (0,40 g, 0,60 mmoles) en metanol (10 ml) con agitación. La disolución resultante se evaporó dando 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); EM (APCI+) hallada (M+1) = 667; C₃₇H₃₉F₅N₄O₂ requiere 666.

Siguiendo este proceso, o alternativamente otros procesos descritos en el documento WO 02/30911, pueden prepararse los otros compuestos anteriormente mencionados que tienen la estructura de fórmula (II).

Síntesis de fórmula (III)

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

45

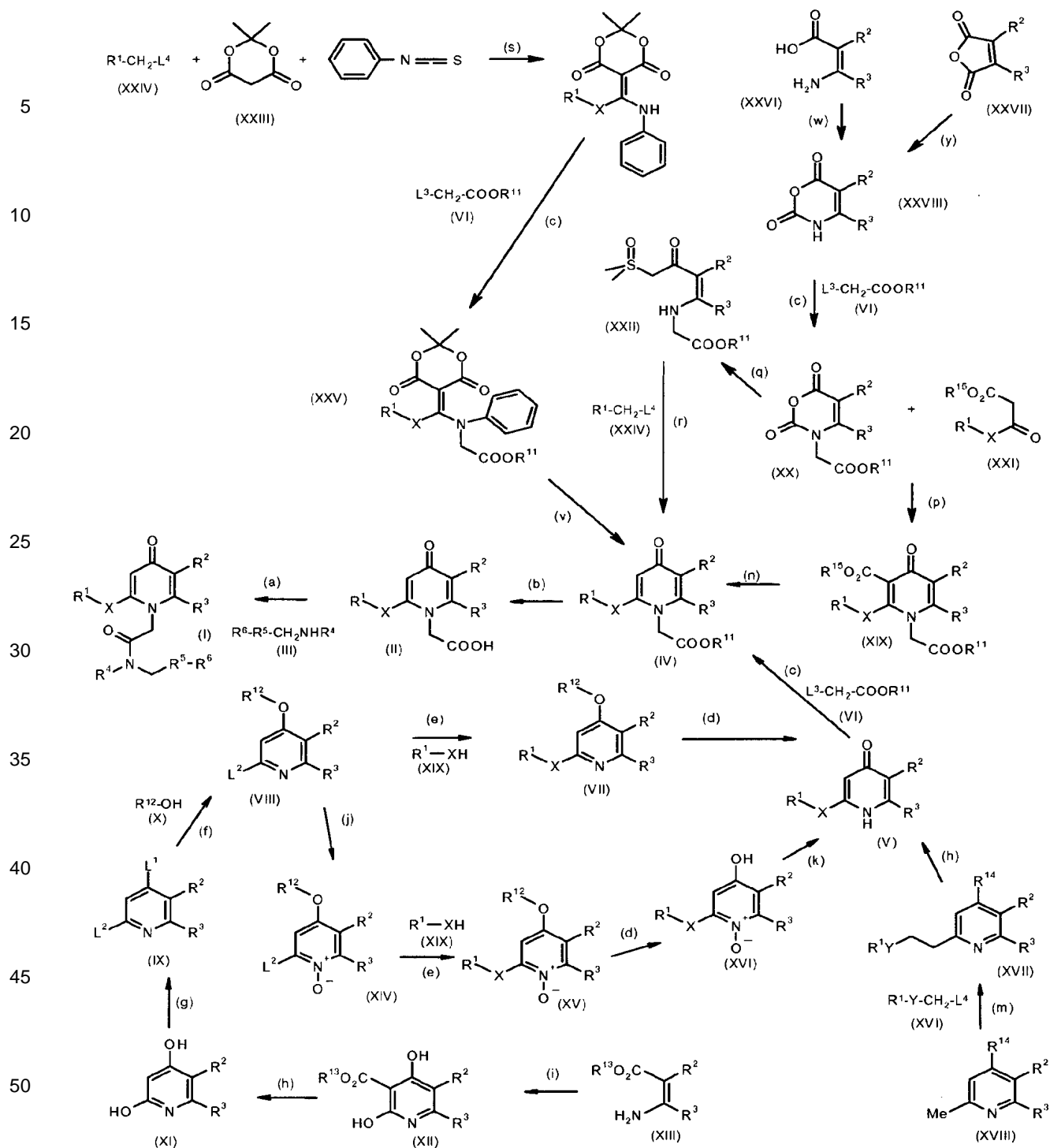
50

55

60

65

Esquema 3



Con referencia a este esquema, el éster (IV) se prepara normalmente por alquilación N-1 de (V) usando (VI), en el que R^{11} es como se define anteriormente en este documento, 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).

Si X es CH_2S , el Producto intermedio clave (IV) puede sintetizarse haciendo reaccionar (XX) con dimetiloxosulfonio metilida, generada mediante el tratamiento de yoduro de trimetilsulfoxonio con hidruro de sodio a baja temperatura, dando un iluro de azufre (XXII), (etapa q). El posterior tratamiento de (XXII) con disulfuro de carbono en presencia de diisopropilamina, seguido de $R^1CH_2-L^4$, en la que L^4 es un grupo saliente, da el Producto intermedio (IV) (etapa r).

Alternativamente, si X es CH_2S , el sustituyente R^1X puede introducirse por desplazamiento de un grupo saliente L^2

(por ejemplo, Cl) (etapa e) tanto sobre una piridina (VIII) como N-óxido de piridina (XIV), dando piridinas 2-sustituidas (VII) y (XV). La transformación de (VII) o (XV) en la 4-piridona (V) se lleva a cabo por desprotección del 4-oxígeno (por ejemplo, usando $(\text{Ph}_3\text{P})_3\text{RhCl}$ cuando en etanol ac. cuando $\text{R}^{12} = \text{alilo}$) (etapa d), seguido, para (XVI), por eliminación del sustituyente de N-óxido, usando hidrógeno en presencia de Pd/C en ácido acético (etapa k). La piridina (VIII) o N-óxido de piridina (XIV) puede prepararse por las etapas (i), (h), (g), (f) y (j), en las que:

- (j) tratamiento de (VIII) con ácido m-cloroperbenzoico en diclorometano;
- (f) tratamiento de (IX) con R^{12}OH (X), en la que R^{12} es alilo, e hidruro de sodio en DMF;
- (g) tratamiento de (XI) con oxocloruro de fósforo;
- (h) tratamiento de (XII) con HCl ac. con calentamiento;
- (i) tratamiento de (XIII) con malonato de di-alquilo inferior y alcóxido de sodio en alcohol (en la que R^{13} es alquilo C(1-6), normalmente $\text{R}^{13} = \text{Et}$); y
- $\text{R}^1\text{-CH}_2\text{SH}$ (XIX) normalmente se prepara a partir del tioacetato, que se forma a partir del bromuro de alquilo correspondiente $\text{R}^1\text{-CH}_2\text{Br}$.

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 condensado, el Producto intermedio (IV) puede sintetizarse a partir de materiales de partida conocidos por las etapas (s), (c) y (v) en las que:

- (s) tratamiento de ácido de Meldrum (XXIII) con hidruro de sodio a baja temperatura, seguido de reacción con fenilisotiocianato y posterior tratamiento con $\text{R}^1\text{CH}_2\text{-L}^4$;
- (c) como se ha tratado antes en este documento;
- (v) tratamiento de (XXV) con ácido trifluoroacético.

Cuando X es alquileno, es preferible usar las etapas (m) y (h) (productos intermedios (XVII), (XVIII)) o etapas (n) y (p) (productos intermedios (XIX), (XX), (XXI)) en las que:

- (h) transformación de una piridina 4-sustituida en una 4-piridona, por ejemplo, por tratamiento de (XVII) $\text{R}^{14}=\text{Cl}$ con HCl ac. y dioxano, o desprotección de $\text{R}^{14} = \text{OR}^{12}$, por ejemplo, usando condiciones de la etapa (d).
- (m) extensión de cadena de una 2-alquilpiridina, por ejemplo, en la que $\text{X} = \text{YCH}_2\text{CH}_2$ por tratamiento de una 2-metilpiridina (XVIII) con $\text{R}^1\text{-Y-CH}_2\text{-L}^4$ (XVI) en la que L^4 es un grupo saliente y una base fuerte, tal como BuLi, en THE

En la vía alternativa, el grupo 3-éster se elimina del Producto intermedio (XIX) $\text{R}^{15} = \text{C}_{(1)\text{-alquilo C(1-6)}$ calentando en éter de difenilo en el que $\text{R}^{15} = \text{tBu}$ (etapa n); el Producto intermedio (XIX) se forma a partir de la 2,6-dioxo-1,3-oxazina (XX) y el éster (XXI) mediante tratamiento con una base tal como NaH en DMF o 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno en diclorometano.

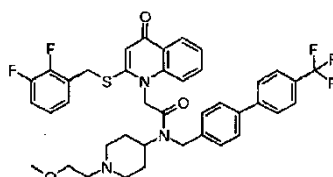
La síntesis de (XX) a partir de materiales de partida conocidos puede lograrse mediante la etapa (w) y (c) o las etapas (y) y (c) en las que:

- (w) tratamiento de (XXVII) con azidotrimetilsilano en TIT;
- (y) tratamiento de (XXVI) con fosgeno;
- (c) como se ha descrito anteriormente en este documento.

Véase el documento WO02/30904 para detalles adicionales y exposición de cómo preparar compuestos de fórmula (III).

Ejemplo de enfoque 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

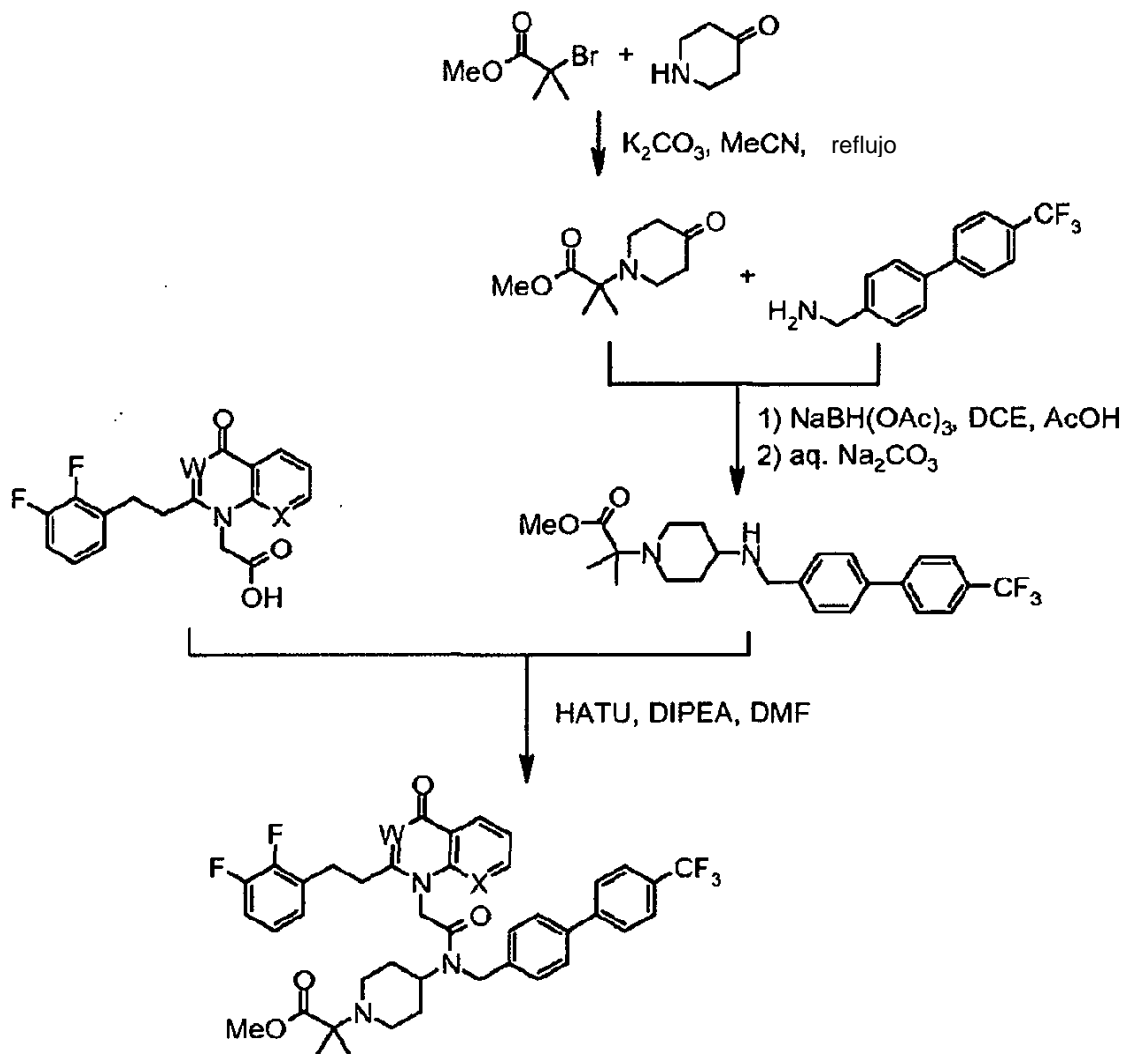


La base libre se preparó a partir de Int. E1 e Int. A42 por el método del Ejemplo 1 en el documento WO 02/30904, excepto que se usó DMF como disolvente en lugar de diclorometano. 1,97 g de este material cristalizaron en acetato de *n*-butilo (10 ml) dando el compuesto del título (1,35 g). RMN ^1H (CD_3OD) 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, 2xs a), 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 (11H, m); EM (APCI+) hallada (M+1) 736; C₄₀H₃₈F₅N₃O₃S requiere 735.

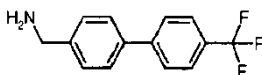
Síntesis de fórmula (IV)

El siguiente diagrama de flujo ilustra un proceso para preparar los compuestos de fórmula (IV).



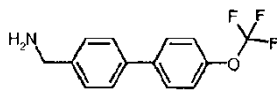
Además, el lector se refiere a la solicitud PCT publicada WO 03/016287 para químicas que pueden ser útiles en la preparación de algunos de los productos intermedios explicados en este diagrama de flujo. Aquellas químicas, hasta el punto de que sean útiles en este caso. Además, se hace referencia a las síntesis explicadas 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 de EE.UU. en tramitación junto con la presente 60/829.328 y 60/829.327, ambas presentadas el 13 de octubre de 2006 indicadas anteriormente. Hasta el punto de que el lector desee preparar los compuestos de fórmula (IV) usando productos intermedios, reactivos, disolventes, tiempos, temperaturas, etc., distintos de aquellos en la vía en la página anterior, estas solicitudes PCT publicadas y solicitudes de EE.UU. en tramitación junto con la presente pueden proporcionar orientación útil.

Producto intermedio (IV)-A1 {[4'-(Trifluorometil)-4-bifenilil]metil}amina



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

Producto intermedio (IV)-A2 Clorhidrato de {[4'-(trifluorometil)oxi]-4-bifenilil}metil}amina



5

Una disolución de 4'-[(trifluorometil)oxi]-4-bifenilcarbonitrilo (se preparó a partir del ácido {4-[(trifluorometil)oxi]fenil}borónico por un método análogo al descrito para el análogo de 4'-trifluorometilo, Producto intermedio D6 del documento WO 02/30911) (66,6 g) en etanol (2000 ml) y ácido clorhídrico concentrado (100 ml) se hidrogenó sobre catalizador de Pearlman (10 g) a 25 psi hasta que se completó la reducción. El catalizador se eliminó por filtración a través de Celite, a continuación el disolvente se eliminó a vacío para obtener el producto deseado.

10

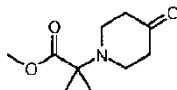
Rt de CL-EM = 2,212 minutos; m/z [M+H]⁺ = 251,0

15

Productos intermedios para preparar la fórmula (IV)

Producto intermedio (IV)-A3

20 2-Metil-2-(4-oxo-1-piperidinil)propanoato de metilo



25

Se calentó una mezcla de 2-bromo-2-metilpropanoato de metilo (80,87 ml, 5 equiv), clorhidrato de 4-piperidona monohidratado (19,6 g, 1 equiv), acetonitrilo (200 ml) y carbonato de potasio (69,1 g, 4 equiv) a reflujo bajo nitrógeno con agitación mecánica durante 17,5 h, a continuación se enfrió en un baño de hielo antes de añadir éter dietílico (100 ml). La filtración a través de Celite seguido de cromatografía ultrarrápida (sílice, 10-50 % de acetato de etilo en hexano) y evaporación de las fracciones de producto dio el producto deseado como un aceite amarillo (14,28 g).

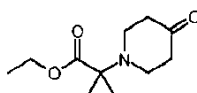
30

RMN ¹H (CDCl₃) δ 1,41 (6H, s), 2,47 (4H, m), 2,88 (4H, m), 3,73 (3H, s).

Producto intermedio (IV)-A4

35

2-Metil-2-(4-oxo-1-piperidinil)propanoato de etilo



40

Se calentó una mezcla de 2-bromo-2-metilpropanoato de etilo (48,3 ml, 5 equiv), clorhidrato de 4-piperidona monohidratado (100 g, 1 equiv), acetonitrilo (1216 ml) y carbonato de potasio (353 g, 4 equiv) a reflujo bajo nitrógeno con agitación mecánica durante 2 h, a continuación se enfrió en un baño de hielo antes de añadir éter dietílico (aprox. 1400 ml). La mezcla se filtró a través de Celite, se evaporó a vacío, a continuación se separó por destilación el exceso de bromoéster (temperatura de la cabeza de destilación 50 °C /10 Torr). La cromatografía ultrarrápida (sílice, 5-30 % de acetato de etilo en hexano) y la evaporación de las fracciones de producto dio el producto en bruto como un aceite amarillo. Para eliminar algún contaminante de bromoéster restante, éste se repartió entre acetato de etilo y ácido clorhídrico acuoso 2 M. La fase orgánica se desechó y la fase acuosa se basificó con carbonato sódico, se saturó con cloruro sódico y se extrajo con acetato de etilo. El secado y evaporación de los extractos orgánicos dio el producto deseado como un aceite amarillo (54,7 g).

45

50

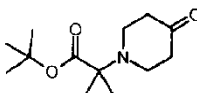
RMN ¹H (CDCl₃) δ 1,27 (3H, t), 1,40 (6H, s), 2,47 (4H, m), 2,90 (4H, m), 4,20 (2H, q).

55

Producto intermedio (IV)-A5

2-Metil-2-(4-oxo-1-piperidinil)propanoato de 1,1-dimetiletilo

60



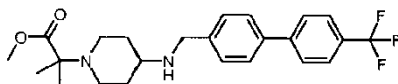
Una mezcla de 2-bromo-2-metilpropanoato de 1,1-dimetiletilo (8,0 g, 1,1 equiv), clorhidrato de 4-piperidona (5,0 g, 1 equiv), acetona (50 ml) y carbonato de potasio (13,0 g, 3 equiv) se calentó a reflujo con agitación durante 24 h, a continuación se filtró y el filtrado se evaporó. El residuo en bruto se usó en la siguiente etapa sin purificación.

65

ES+EM m/z [M+H-tBu]⁺ = 186,1

Producto intermedio (IV)-B1

2-Metil-2-[4-({[4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil}amino)-1-piperidinil]propanoato de metilo



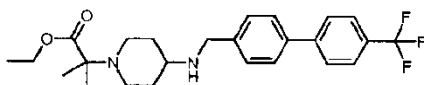
Una mezcla de 2-metil-2-(4-oxo-1-piperidinil)propanoato de metilo (Int. A3) (14,28 g, 1 equiv), {[4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil}amina (Int. A1) (19,6 g, 0,85 equiv), DCE (300 ml), ácido acético (3,8 ml, 0,90 equiv) y triacetoxiborohidruro de sodio (20,7 g, 1,25 equiv) se agitó a temperatura ambiente bajo nitrógeno durante 17,5 h. Se añadió carbonato sódico acuoso (disolución 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 a través de una almohadilla de gel de sílice que se aclaró con 2,5 % de metanol en DCM. Después de la evaporación a vacío, el producto en bruto se cristalizó en éter/hexano, finalmente a la temperatura del baño de hielo, que después de secar dio un sólido blanco (20,9 g).

Rt de CL-EM = 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=8,03 Hz), 7,67 (2H, d, J=8,28 Hz), 7,80 (2H, d, J=8,53 Hz), 7,88 (2H, d, 8,03 Hz)

Productos intermedios (IV)-B2

2-Metil-2-[4-({[4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil} amino)-1-piperidinil]propanoato de etilo



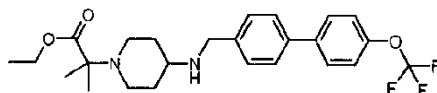
Se agitó una mezcla de 2-metil-2-(4-oxo-1-piperidinil)propanoato de etilo (Int. A4) (25,6 g, 1,2 equiv), {[4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil}amina (Int. A1) (31,1 g, 1,0 equiv), DCE (400 ml) y ácido acético (6,3 ml, 1,1 equiv) a temperatura ambiente bajo nitrógeno. Se añadió triacetoxiborohidruro de sodio (33,5 g, 1,5 equiv) y la agitación continuó durante 19 horas. Se añadió carbonato sódico acuoso (disolución 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 gel de sílice, se secaron sobre sulfato de sodio y se evaporaron a vacío. El producto deseado se obtuvo como un sólido blanco (44,2 g), que se usó sin más purificación.

Rt de CL-EM = 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=8,06 Hz)

Producto intermedio (IV)-B3

2-Metil-2-[4-({[4'-((trifluorometil)oxi)-4-bifenilil]metil}amino)-1-piperidinil]propanoato de etilo

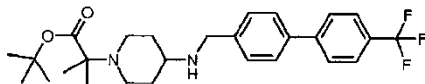


Se agitó una mezcla de 2-metil-2-(4-oxo-1-piperidinil)propanoato de etilo (Int. A4) (1,09 g, 1,2 equiv), clorhidrato de ([4'-((trifluorometil)oxi)-4-bifenilil]metil}amina (Int. A2) (1,28 g, 1,0 equiv), DCE (21 ml) y ácido acético (0,27 ml, 1,1 equiv) a temperatura ambiente bajo nitrógeno. Se añadió triacetoxiborohidruro de sodio (1,42 g, 1,5 equiv) y la agitación continuó durante 3 horas. Se añadió carbonato sódico acuoso (disolución 2 M, exceso) y se agitó durante 45 min, a continuación la mezcla se repartió 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 a vacío. El producto deseado se obtuvo como un sólido amarillo claro (2,14 g) que se usó sin más purificación.

Rt de CL-EM = 2,244 minutos; m/z [M+H]⁺ = 465,3

Producto intermedio (IV)-B4

2-Metil-2-[4-({4'-(trifluorometil)-4-bifenilil}metil)amino]-1-piperidinil]propanoato de 1,1-dimetiletilo

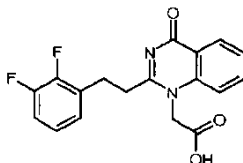


Se combinó una mezcla de 2-metil-2-(4-oxo-1-piperidinil)propanoato de 1,1-dimetiletilo (Int. A6) (370 mg, 1,2 equiv), {[4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil}amina (Int. A1) (397 mg, 1 equiv), triacetoxiborohidruro de sodio (400 mg, 1,5 equiv), DCM (10 ml) y ácido acético (0,076 ml, 1 equiv) y se agitó a temperatura ambiente hasta que la CL-EM confirmó la desaparición del material de partida de amina (aprox. 18 horas). Se añadió carbonato sódico acuoso y a continuación se extrajo con DCM. Los extractos orgánicos se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron dando un sólido (420 mg) que se usó sin más purificación.

Rt de CL-EM = 2,24 minutos; m/z [M+H]⁺ = 477,3

Producto intermedio (IV)-C1

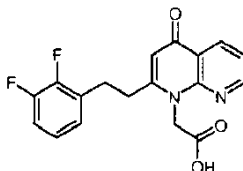
Ácido [2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxo-1(4H)-quinazolinil]acético



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

Producto intermedio (IV)-C2

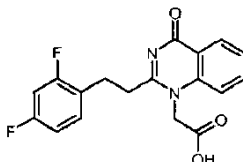
Ácido [2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxo-1,8-naftiridin-1(4H)-il]acético



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

Producto intermedio (IV)-C3

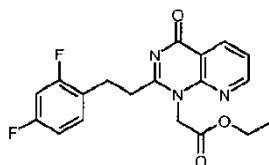
Ácido [2-[2-(2,4-difluorofenil)etil]-4-oxo-1(4H)-quinazolinil]acético



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

Producto intermedio (IV)-C4

[2-[2-(2,4-Difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il]acetato de etilo



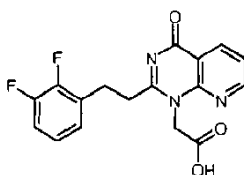
Una mezcla de (2,4-dioxo-3,4-dihidropirido[2,3-*d*]pirimidin-1(2*H*)-il)acetato de etilo (documento WO 02/30911, Producto intermedio B52) (40,8 g, 1,2 equiv) y 3-(2,4-difluorofenil)propanimidamida (preparada por métodos análogos a aquellos descritos para el isómero de 2,3-difluor, Productos intermedios A1 a A3 del documento WO 02/30911) (30,0 g, 1 equiv) se fundió en un baño de aceite a 150 °C durante 25 min, a continuación se enfrió rápidamente hasta temperatura ambiente en un baño de agua. La cromatografía (sílice, el producto en bruto se cargó en DCM y se eluyó con 50-100 % de acetato de etilo en hexano) dio el producto deseado (43,56 g).

Rt de CL-EM = 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).

Productos intermedios (IV)-C5

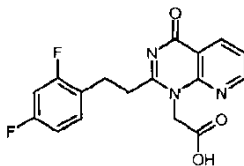
Ácido [2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-*d*]pirimidin-1(4*H*)-il]acético



La preparación de este compuesto se describió en el documento WO 02/30911 como el Producto intermedio C35.

Producto intermedio (IV)-C5

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

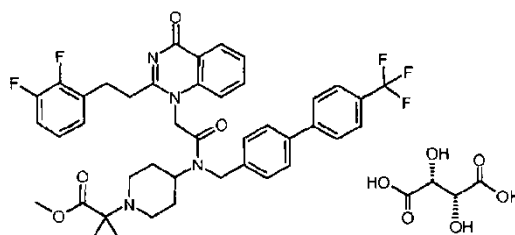


Se disolvió [2-[2-(2,4-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-*d*]pirimidin-1(4*H*)-il]acetato de etilo (Int. C1) (32,76 g, 1 equiv) en etanol (350 ml) y agua (70 ml), se enfrió en hielo, a continuación se añadió hidróxido de litio acuoso (disolución 2 M, 43,42 ml, 0,99 equiv). La agitación continuó durante 2 h a temperatura ambiente. La disolución se concentró a vacío y el residuo se redisolvió en agua (700 ml) y bicarbonato sódico acuoso saturado (50 ml), a continuación se lavó con acetato de etilo (200 ml). La fase acuosa se acidificó hasta 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 a vacío (50 °C, 16 h) para obtener el producto deseado (23,2 g).

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

2-[4-({[2-[2-(2,3-Difluorofenil)etil]-4-oxo-1(4*H*)-quinazolinil]acetil}[[4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil]amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato de metilo-2,3-dihidroxiбутаноdiato (sal)



Una mezcla de ácido [2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxo-1(4*H*)-quinazolinil]acético (Int. C1) (100 mg, 1 equiv), 2-metil-2-[4-({[4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil]amino)-1-piperidinil]propanoato de metilo (Int. B1) (130 mg, 1,03 equiv), DIPEA (0,1 ml, 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 inversa (Método

preparativo A) dio 2-[4-([2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxo-1(4H)-quinazolinil]acetil){[4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil]amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato de metilo (128 mg).

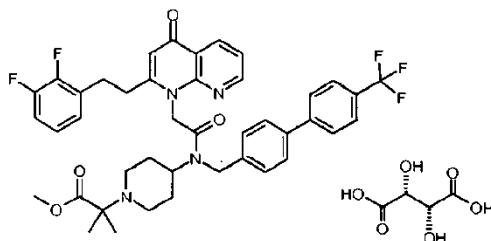
Rt de CL-EM = 2,686 minutos; m/z [M+H]⁺ = 761,3

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 m a), 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 añadiendo ácido L-tartárico (1,675 g, 1,0 equiv) en una porción y se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente. La disolución se concentró a vacío dando un polvo blanquecino que se secó en una estufa de vacío a temperatura ambiente.

Ejemplo de enfoque de síntesis (IV)-2

2-[4-([2-[2-(2,3-Difluorofenil)etil]-4-oxo-1,8-naftiridin-1(4H)-il]acetil){[4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil]amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato de metilo-2,3-dihidroxitbutanoato (sal)



Una mezcla de ácido [2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxo-1,8-naftiridin-1(4H)-il]acético (Int. C2) (100 mg, 1 equiv), carbonildiimidazol (50 mg, 1,05 equiv) y dimetilacetamida (4 ml) se agitó a 60 °C durante 30 min, a continuación se añadió 2-metil-2-[4-([4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil]amino)-1-piperidinil]propanoato de metilo (Int. B1) (132 mg, 1,05 equiv) y la temperatura se elevó a 80 °C durante 2 h. Se añadió otra porción de carbonildiimidazol (0,5 equiv) y la agitación continuó a 80 °C durante 15 h. Después de enfriarse la mezcla en bruto se aplicó a HPLC de fase inversa (Método preparativo A) para obtener 2-[4-([2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxo-1,8-naftiridin-1(4H)-il]acetil){[4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil]amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato de metilo (99 mg).

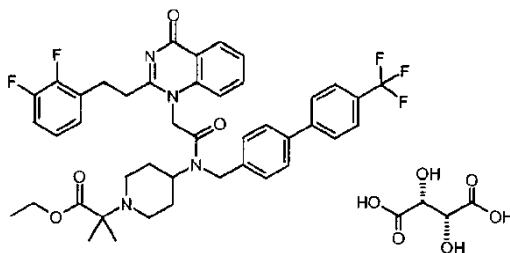
Rt de CL-EM = 2,845 minutos; m/z [M+H]⁺ = 761,3

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 m a), 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).

Ésta se convirtió en la sal de bitartrato por un método análogo al descrito para el Ejemplo de enfoque de síntesis (I).

Ejemplo de enfoque de síntesis (IV)-3

2-[4-([2-[2-(2,3-Difluorofenil)etil]-4-oxo-1(4H)-quinazolinil]acetil){[4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil]amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato de etilo-2,3-dihidroxitbutanoato (sal)



Se agitó una mezcla de ácido [2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxo-1(4H)-quinazolinil]acético (Int. C1) (115 mg, 1 equiv), 2-metil-2-[4-([4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil]amino)-1-piperidinil]propanoato de etilo (Int. B2) (150 mg, 1 equiv), HATU (151 mg, 1,2 equiv), DMF (2,7 ml) y DIPEA (0,17 ml, 3 equiv) a temperatura ambiente durante 5 h. La mezcla de reacción se repartió entre acetato de etilo/metanol y bicarbonato sódico acuoso, a continuación la fase orgánica se lavó con salmuera y se secó. La cromatografía ultrarrápida (sílice, 3-4 % de metanol en DCM) dio 2-[4-([2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il]acetil){[4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil]amino)-1-piperidinil]-2-

metilpropanoato de etilo como un sólido blanco (190 mg).

Rt de CL-EM = 2,55 minutos; m/z [M+H]⁺ = 775,3

5 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 (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).

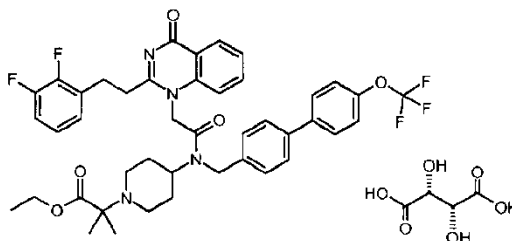
Ésta se convirtió en la sal de bitartrato por un método análogo al descrito en el Ejemplo de enfoque de síntesis (I).

10

Ejemplo de enfoque de síntesis (IV)-4

2-{4-[[2-[2-(2,3-Difluorofenil)etil]-4-oxo-1(4H)-quinazolinil]acetil]({4'-[(trifluorometil)oxi]-4-bifenilil]metil)amino]-1-piperidinil}-2-metilpropanoato de etilo-2,3-dihidroxiutanodioato (sal)

15



20

25

Se agitó una mezcla de ácido [2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxo-1(4H)-quinazolinil]acético (Int. C1) (124 mg, 1,2 equiv), 2-metil-2-[4-[(4'-[(trifluorometil)oxi]-4-bifenilil]metil)amino]-1-piperidinil]propanoato de etilo (Int. B3) (139 mg, 1 equiv), DMF (1,2 ml) y DIPEA (0,16 ml, 3 equiv) a temperatura ambiente durante 30 min, a continuación se añadió HATU (176 mg, 1,5 equiv) y la agitación continuó durante 4 h. La HPLC de fase inversa (Método preparativo B) dio 2-{4-[[2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxo-1(4H)-quinazolinil]acetil]({4'-[(trifluorometil)oxi]-4-bifenilil]metil)amino]-1-piperidinil}-2-metilpropanoato de etilo como sólido blanco (174 mg).

30

Rt de CL-EM = 2,77 minutos; m/z [M+H]⁺ = 791,3

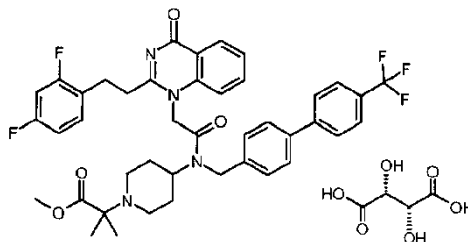
35 Picos característicos de RMN ¹H (CDCl₃): δ 1,21-1,42 (9H, m), 1,58-2,08 (4H, m), 2,20-2,48 (2H, m), 2,71-5,1 (13H, m a), 6,79-6,87 (1H, d), 6,92-7,11 (3H, m), 7,30-7,46 (5H, m), 7,48-7,63 (5H, m), 8,26-8,40 (1H, m)

Ésta se convirtió en la sal de bitartrato por un método análogo al descrito en el Ejemplo de enfoque de síntesis (I).

40 Ejemplo de enfoque de síntesis (IV)-5

2-[4-[[2-[2-(2,4-Difluorofenil)etil]-4-oxo-1(4H)-quinazolinil]acetil]({4'-[(trifluorometil)oxi]-4-bifenilil]metil)amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato de metilo-2,3-dihidroxiutanodioato (sal)

45



50

55 Se agitó una mezcla de ácido [2-[2-(2,4-difluorofenil)etil]-4-oxo-1(4H)-quinazolinil]acético (Int. C3) (100 mg, 1 equiv), 2-metil-2-[4-[(4'-[(trifluorometil)oxi]-4-bifenilil]metil)amino)-1-piperidinil]propanoato de metilo (Int. B1) (130 mg, 1,03 equiv), DIPEA (0,1 ml, 2 equiv), acetonitrilo (2 ml) y HATU (130 mg, 1,4 equiv) a temperatura ambiente durante 1 h, a continuación se evaporó y se redisolvió en acetonitrilo. La purificación por HPLC de fase inversa (Método preparativo B) dio 2-[4-[[2-[2-(2,4-difluorofenil)etil]-4-oxo-1(4H)-quinazolinil]acetil]({4'-[(trifluorometil)oxi]-4-bifenilil]metil)amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato de metilo (126 mg).

60

Rt de CL-EM = 2,698 minutos; m/z [M+H]⁺ = 761,3

65 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), 3,19-3,24 (1H, m), 3,70-3,73 (3H, m), 4,00/4,51 (1H, 2x m a), 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),

8,23-8,29 (1H, m).

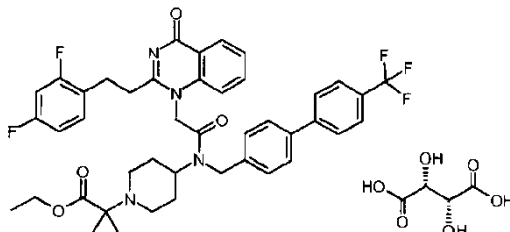
Ésta se convirtió en la sal de bitartrato por un método análogo al descrito en el Ejemplo de enfoque de síntesis (I).

5 Ejemplo de enfoque de síntesis (IV)-6

2-[4-({[2-[2-(2,4-Difluorofenil)etil]-4-oxo-1(4H)-quinazolín]acetil}{[4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil}amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato de etilo-2,3-dihidroxiбутаноdiato (sal)

10

15



20

25

Se agitó una mezcla de ácido [2-[2-(2,4-difluorofenil)etil]-4-oxo-1(4H)-quinazolín]acético (Int. C3) (120 mg, 1 equiv), 2-metil-2-[4-({[4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil}amino)-1-piperidinil]propanoato de etilo (Int. B2) (204 mg, 1,3 equiv), DMF (1,4 ml) y DIPEA (0,183 ml, 3 equiv) a temperatura ambiente, a continuación se añadió HATU (206 mg, 1,5 equiv) con agitación vigorosa y la agitación continuó durante 1,5 h. Se añadió otra porción del Producto intermedio D5 (12 mg, 0,1 equiv), a continuación la agitación continuó durante 2 días. La HPLC de fase inversa (Método preparativo B) dio 2-[4-({[2-[2-(2,4-difluorofenil)etil]-4-oxo-1(4H)-quinazolín]acetil}{[4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil}amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato de etilo como un sólido blanco (173 mg).

Rt de CL-EM = 2,751 minutos; m/z [M+H]⁺ = 775,3

30

Picos característicos de RMN ¹H (CDCl₃) δ (mezcla de rotámeros): 1,22-1,47 (9H, m), 1,63-2,10 (4H, m), 2,16-5,11 (15H, m a), 6,75-6,88 (2H, m), 7,14-7,80 (12H, m), 8,26-8,40 (1H, m).

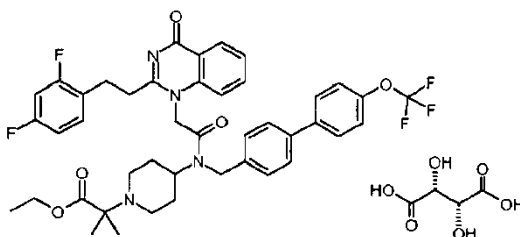
Ésta se convirtió en la sal de bitartrato por un método análogo al descrito en el Ejemplo de enfoque de síntesis (I).

35 Ejemplo de enfoque de síntesis (IV)-7

2-{4-({[2-[2-(2,4-Difluorofenil)etil]-4-oxo-1(4H)-quinazolín]acetil}{[4'-(trifluorometil)oxi]-4-bifenilil}metil}amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato de etilo-2,3-dihidroxiбутаноdiato (sal)

40

45



50

55

Se agitó una mezcla de ácido [2-[2-(2,4-difluorofenil)etil]-4-oxo-1(4H)-quinazolín]acético (Int. C3) (114 mg, 1,1 equiv), 2-metil-2-[4-({[4'-(trifluorometil)oxi]-4-bifenilil}metil}amino)-1-piperidinil]propanoato de etilo (Int. B3) (139 mg, 1 equiv), DMF (1,2 ml) y DIPEA (0,16 ml, 3 equiv) a temperatura ambiente, a continuación se añadió HATU (176 mg, 1,5 equiv) con agitación vigorosa y la agitación continuó durante 30 min. Se añadió otra porción del Producto intermedio D5 (21 mg, 0,2 equiv), seguido 1 h después de adicionalmente HATU (23 mg, 0,2 equiv), a continuación la agitación continuó durante 18 h. La HPLC de fase inversa (Método preparativo B) dio 2-{4-({[2-[2-(2,4-difluorofenil)etil]-4-oxo-1(4H)-quinazolín]acetil}{[4'-(trifluorometil)oxi]-4-bifenilil}metil}amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato de etilo como un sólido blanco (149 mg).

Rt de CL-EM = 2,793 minutos; m/z [M+H]⁺ = 791,3

60

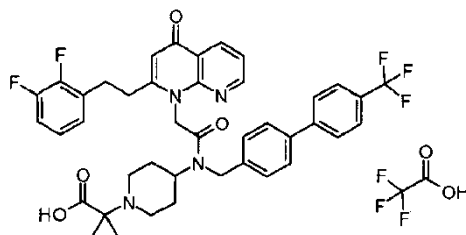
Picos característicos de RMN ¹H (CDCl₃): δ 1,20-1,45 (9H, m), 1,58-2,12 (4H, m), 2,14-2,48 (2H, m), 2,620-5,11 (11H, m), 6,59-6,72 (1H, m), 6,73-6,90 (2H, m), 7,16-7,64 (11H, m), 8,25-8,40 (1H, m).

Ésta se convirtió en la sal de bitartrato por un método análogo al descrito en el Ejemplo de enfoque de síntesis (II).

65 Ejemplo de enfoque 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-

bifenilil]metil}amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoico



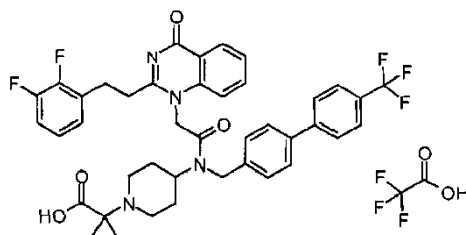
Se agita una mezcla de 2-metil-2-[4-((4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil}amino)-1-piperidinil]propanoato de 1,1-dimetiletilo (Int. B4) (1 equiv), ácido [2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxo-1,8-naftiridin-1(4H)-il]acético (Int. C2) (1,2 equiv), DIPEA (3 equiv) y DMF (1,0 ml) a temperatura ambiente durante 5 min. Se añadió HATU (1,5 equiv) en 1 porción y se agitó 5 min adicionales. La mezcla de reacción en bruto se concentró, se filtró a través de un tapón de sílice eluido con acetona y se evaporó para obtener 2-[4-((2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxo-1,8-naftiridin-1(4H)-il]acetil)({4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil}amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato de 1,1-dimetiletilo en bruto.

El propanoato, sin aislamiento, se disuelve en una mezcla 1:1 de TFA y DCM y se agitó a TA durante 4 h. La evaporación y HPLC preparativa (Método A) dieron el compuesto del título.

Pueden prepararse otras sales mediante medios convencionales. La base libre también puede prepararse mediante medios convencionales.

Ejemplo de enfoque de síntesis (IV)-9

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

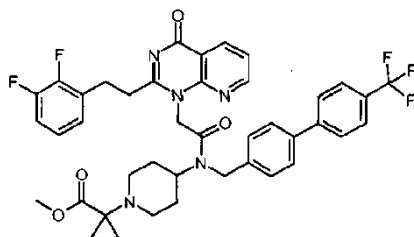


Se agita una mezcla de 2-metil-2-[4-((4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil}amino)-1-piperidinil]propanoato de 1,1-dimetiletilo (Int. B4) (1 equiv), ácido [2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxo-1(4H)-quinazolinil]acético (Int. C1) (1,2 equiv), DIPEA (3 equiv) y DMF (1,0 ml) a temperatura ambiente durante 5 min. Se añadió HATU (1,5 equiv) en 1 porción y se agitó 5 min adicionales. La mezcla de reacción en bruto se concentró, se filtró a través de un tapón de sílice eluido con acetona y se evaporó para obtener 2-[4-((2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxo-1(4H)-quinazolinil]acetil)({4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil}amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato de 1,1-dimetiletilo en bruto.

El propanoato, sin aislamiento, se disuelve en una mezcla 1:1 de TFA y DCM y se agitó a TA durante 4 h. La evaporación y HPLC preparativa (Método A) dieron el compuesto del título.

Ejemplo de enfoque de síntesis (IV)-10

2-[4-((2-[2-(2,3-Difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il]-acetil)({4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil}amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato de metilo



Se agitó mecánicamente una mezcla de ácido [2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il]acético (Int. D1) (20,7 g, 1,3 equiv), 2-metil-2-[4-((4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil}amino)-1-piperidinil]propanoato de metilo (Int. B1) (20,0 g, 1,3 equiv), DIPEA (24,0 ml, 3 equiv) y DMF (184 ml), a continuación se añadió HATU (27,1 g, 1,5

equiv) en una porción y la agitación continuó durante 2 h. La mezcla de reacción se repartió entre éter dietílico/THF (1:1) y carbonato sódico (1 M, exceso). La fase orgánica se lavó con agua y salmuera, se secó y se evaporó. Se realizó cromatografía secuencialmente en tres columnas de sílice (en primer lugar 3:1 de EtOAc/hexanos; en segundo lugar 2 % de MeOH en DCM; en tercer lugar 1:1 de EtOAc/hexanos al 100 % de EtOAc). Las fracciones de producto se evaporaron para obtener el producto deseado como un sólido rosa amorfo (27,5 g).

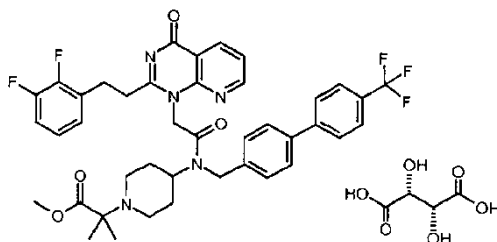
Rt de CL-EM = 2,702 minutos; m/z [M+H]⁺ = 762,3

Cristalización: Se calentó una mezcla de 2-[4-({[2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-*d*]pirimidin-1(4*H*)-il]acetil}{[4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil}amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato de metilo (8,0 g) y etanol (200 ml) hasta que se disolvió completamente. La disolución se agitó magnéticamente durante 24 h a temperatura ambiente, a continuación se filtró y se recogieron 7,5 g de sólido. Estos cristales solvatados se colocaron en una estufa de vacío a 60 °C con una purga de nitrógeno para mantener el vacío a aproximadamente 630 Torr durante 24 h para proporcionar el compuesto del título cristalino sin solvatar (7,15 g), p.f. 150 °C.

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 m a), 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). Véase la Figura 1 más adelante.

Ejemplo de enfoque de síntesis (IV)-11

2-[4-({[2-[2-(2,3-Difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-*d*]pirimidin-1(4*H*)-il]-acetil}{[4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil}amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato de metilo-2,3-dihidroxiбутанодиоато (sal)



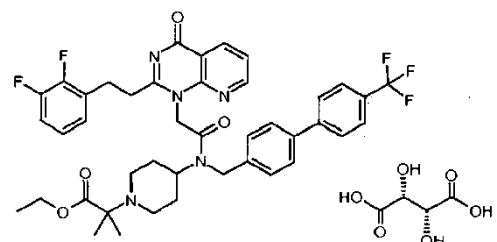
Se suspendió 2-[4-({[2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-*d*]pirimidin-1(4*H*)-il]-acetil}{[4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil}amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato de metilo (8,5 g, 1 equiv) en metanol (100 ml) y se calentó a 50 °C hasta que el sólido se disolvió. Se añadió ácido L-tartárico (1,675 g, 1,0 equiv) en una porción y se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente. La disolución se concentró a vacío dando un polvo blanquecino que se secó en una estufa de vacío a temperatura ambiente.

Rt de CL-EM = 2,697 minutos; m/z [M+H]⁺ = 762,3

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 m a), 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 enfoque de síntesis (IV)-12

2-[4-({[2-[2-(2,3-Difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-*d*]pirimidin-1(4*H*)-il]-acetil}{[4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil}amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato de etilo-2,3-dihidroxiбутанодиоато (sal)



Se agitó una mezcla de ácido [2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-*d*]pirimidin-1(4*H*)-il]acético (Int. D1) (116 mg, 1 equiv), 2-metil-2-[4-({[4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]-metil}amino)-1-piperidinil]propanoato de etilo (Int. B2) (150 mg, 1 equiv), HATU (151 mg, 1,2 equiv), DMF (2,72 ml) y DIPEA (0,17 ml, 3 equiv) a temperatura ambiente durante 3,25 h. La mezcla de reacción se repartió entre acetato de etilo/ metanol y bicarbonato sódico acuoso, la fase orgánica se

lavó con salmuera, se secó y se trató con carbón vegetal activado (250 mg). La cromatografía ultrarrápida (sílice, 3-4 % de metanol en DCM) dio 2-[4-({[2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-*d*]pirimidin-1(4*H*)-il]acetil}]{4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil} amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato de etilo como un sólido blanco (178 mg).

5 Rt de CL-EM = 2,58 minutos; m/z $[M+H]^+$ = 776,3

RMN 1H ($CDCl_3$) 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)

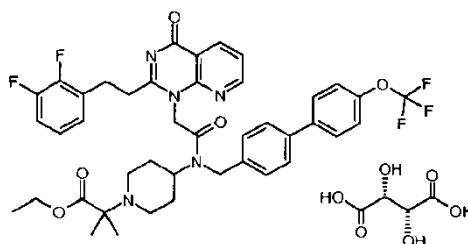
10

Ésta se convirtió en la sal de bitartrato por un método análogo al descrito por el Ejemplo de enfoque de síntesis (II).

Ejemplo de enfoque de síntesis (IV)-13

15 2-[4-({[2-[2-(2,3-Difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-*d*]pirimidin-1(4*H*)-il]acetil}]{4'-(trifluorometil)oxi]-4-bifenilil]metil}amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato de etilo-2,3-dihidroxiutanodioato (sal)

20



25

Se agitó una mezcla de ácido [2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-*d*]pirimidin-1(4*H*)-il]acético (Int. D1) (114 mg, 1,1 equiv), 2-metil-2-[4-({[4'-(trifluorometil)oxi]-4-bifenilil]metil}amino)-1-piperidinil]propanoato de etilo (Int. B4) (139 mg, 1 equiv), DMF (1,2 ml) y DIPEA (0,16 ml, 3 equiv) a temperatura ambiente durante 30 min, a continuación se añadió HATU (176 mg, 1,5 equiv) y la agitación continuó durante 3 h. La HPLC de fase inversa (Método preparativo B) dio 2-[4-({[2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxo-1(4*H*)-quinazolilil]acetil}]{4'-(trifluorometil)oxi]-4-bifenilil]metil}amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato de etilo como un sólido blanco (166 mg).

35 Rt de CL-EM = 2,87 minutos; m/z $[M+H]^+$ = 792,3

RMN 1H ($CDCl_3$) 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).

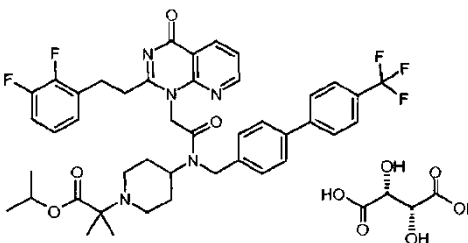
40

Ésta se convirtió en la sal de bitartrato por un método análogo al descrito por el Ejemplo de enfoque de síntesis (II).

Ejemplo de enfoque de síntesis (IV)-14

45 2-[4-({[2-[2-(2,3-Difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-*d*]pirimidin-1(4*H*)-il]acetil}]{4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil}amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato de 1-metiletilo-2,3-dihidroxiutanodioato (sal)

50



55

Se agitó una mezcla de 2-metil-2-[4-({[4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil}amino)-1-piperidinil]propanoato de 1-metiletilo (Int. B3) (420 mg, 1 equiv), ácido [2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-*d*]pirimidin-1(4*H*)-il]acético (Int. D1) (300 mg, 1 equiv), HATU (396 mg, 1,2 equiv), DIPEA (0,22 ml, 1,5 equiv) y DMF (3,0 ml) a temperatura ambiente durante 30 min. La mezcla de reacción en bruto se aplicó directamente a HPLC de fase inversa (Método preparativo A) para obtener 2-[4-({[2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-*d*]pirimidin-1(4*H*)-il]acetil}]{4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil}amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato de 1-metiletilo (171 mg).

65 Rt de CL-EM = 2,837 minutos; m/z $[M+H]^+$ = 790,3

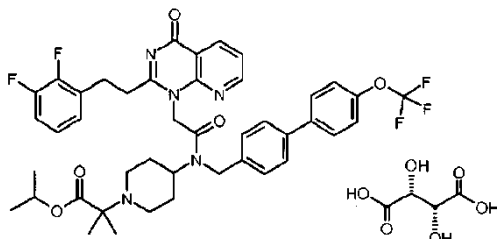
RMN ¹H (CD₃OD) δ 1,16-1,37 (12H, m), 1,62-2,01 (4H, m), 2,27-2,55 (2H, m), 2,95-3,12 (3H, m), 3,12-3,29 (3H, m), 4,06/4,40 (1H, 2x m a), 4,71 (1H, s), 4,89 (1H, s), 4,92-5,07 (1H, m), 5,43/5,76 (2H, 2x s), 7,00-7,21 (3H, m), 7,29-7,38 (1H, m), 7,49-7,65 (3H, m), 7,65-7,87 (5H, m), 8,48-8,58 (1H, m), 8,81-8,90 (1H, m).

5 Ésta se convirtió en la sal de bitartrato por un método análogo al descrito por el Ejemplo de enfoque de síntesis (II).

Ejemplo de enfoque de síntesis (IV)-15

10 2-[4-[[[2-[2-(2,3-Difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-*d*]pirimidin-1(4*H*)-il]acetil]({4'-(trifluorometil)oxi}-4-bifenilil]metil)amino]-1-piperidinil]-2-metilpropanoato de 1-metiletilo-2,3-dihidroxi-*butano*odioato (sal)

15



20

25 Se agitó una mezcla de 2-metil-2-[4-[[[2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-*d*]pirimidin-1(4*H*)-il]acetil]({4'-(trifluorometil)oxi}-4-bifenilil]metil)amino]-1-piperidinil]propanoato de 1-metiletilo (Int. B5) (80 mg, 1 equiv), ácido [2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-*d*]pirimidin-1(4*H*)-il]acético (Int. D1) (67 mg, 1 equiv), HATU (400 mg, 5 equiv), DIPEA (0,22 ml, 1,5 equiv) y DMF (2,0 ml) a temperatura ambiente durante 30 min. La mezcla de reacción en bruto se aplicó directamente a HPLC de fase inversa (Método preparativo A) para obtener 2-[4-[[[2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-*d*]pirimidin-1(4*H*)-il]acetil]({4'-(trifluorometil)oxi}-4-bifenilil]metil)amino]-1-piperidinil]-2-metilpropanoato de 1-metiletilo (25 mg).

30

Rt de CL-EM = 2,952 minutos; m/z [M+H]⁺ = 806,4

35

RMN ¹H (DMSO-*d*6) δ 1,09-1,25 (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 m a), 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)

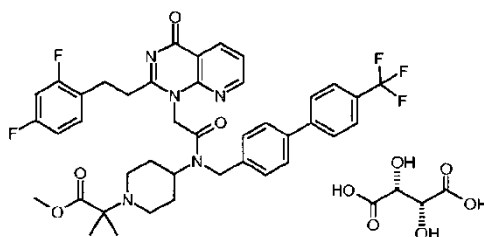
40

Ésta se convirtió en la sal de bitartrato por un método análogo al descrito por el Ejemplo de enfoque de síntesis (II).

Ejemplo de enfoque de síntesis (IV)-16

40 2-[4-[[[2-[2-(2,4-Difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-*d*]pirimidin-1(4*H*)-il]acetil]({4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil)amino]-1-piperidinil]-2-metilpropanoato de metilo- 2,3-dihidroxi-*butano*odioato (sal)

45



50

55 Se agitó una mezcla de ácido [2-[2-(2,4-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,4-*d*]pirimidin-1(4*H*)-il]acético (Int. D2) (100 mg, 1 equiv), 2-metil-2-[4-[[[2-[2-(2,4-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-*d*]pirimidin-1(4*H*)-il]acetil]({4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil)amino]-1-piperidinil]propanoato de metilo (Int. B1) (130 mg, 1,03 equiv), DIPEA (0,16 ml, 3 equiv), acetonitrilo (2 ml) y HATU (130 mg, 1,2 equiv) a temperatura ambiente durante 1 h, a continuación se evaporó y se redisolvió en acetonitrilo. La purificación por HPLC de fase inversa (Método preparativo B) dio 2-[4-[[[2-[2-(2,4-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-*d*]pirimidin-1(4*H*)-il]acetil]({4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil)amino]-1-piperidinil]-2-metilpropanoato de metilo (145 mg).

60

Rt de CL-EM = 2,716 minutos; m/z [M+H]⁺ = 762,3

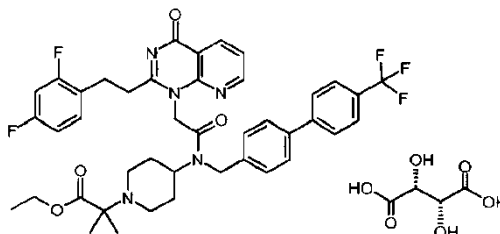
65

RMN ¹H (CDCl₃) δ 1,27 (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 m a), 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).

Ésta se convirtió en la sal de bitartrato por un método análogo al descrito por el Ejemplo de enfoque de síntesis (II).

Ejemplo de enfoque de síntesis (IV)-17

2-[4-({[2-[2-(2,4-Difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il]acetil}){4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil}amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato de etilo- 2,3-dihidroxiutanodioato (sal)



Se agitó una mezcla de ácido [2-[2-(2,4-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,4-d]pirimidin-1(4H)-il]acético (Int. D2) (120 mg, 1 equiv), 2-metil-2-[4-({[4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]-metil}amino)-1-piperidinil]propanoato de etilo (Int. B2) (198 mg, 1,3 equiv), DMF (1,4 ml) y DIPEA (0,178 ml, 3 equiv) a temperatura ambiente durante 1,5 h, a continuación se añadió HATU (200 mg, 1,5 equiv) con agitación vigorosa y la agitación continuó durante 1,5 h. Se añadió otra porción del Producto intermedio D2 (12 mg, 0,1 equiv), a continuación la agitación continuó durante 2 días. La HPLC de fase inversa (Método preparativo B) dio 2-[4-({[2-[2-(2,4-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il]acetil}){4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil}amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato de etilo como un sólido blanco (170 mg).

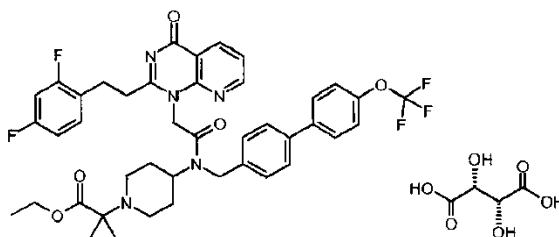
Rt de CL-EM = 2,827 minutos; m/z [M+H]⁺ = 776,3

Picos característicos de RMN ¹H (CDCl₃): 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).

Ésta se convirtió en la sal de bitartrato por un método análogo al descrito por el Ejemplo de enfoque de síntesis (II).

Ejemplo de enfoque de síntesis (IV)-18

2-[4-({[2-[2-(2,4-Difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il]acetil}){4'-(trifluorometil)oxi]-4-bifenilil]metil}amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato de etilo-2,3-dihidroxiutanodioato (sal)



Se agitó una mezcla de 2-metil-2-[4-({[4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil}amino)-1-piperidinil]propanoato de 1,1-dimetiletilo (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) a temperatura ambiente durante 5 min. Se añadió HATU (180 mg, 1,5 equiv) en 1 porción y se agitó 5 min adicionales. La mezcla de reacción en bruto se concentró, se filtró a través de un tapón de sílice eluido con acetona y se evaporó para obtener 2-[4-({[2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il]acetil}){4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil}amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato de 1,1-dimetiletilo en bruto.

Rt de CL-EM = 2,823 minutos; m/z [M+H]⁺ = 804,4

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

Rt de CL-EM = 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 s a), 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).

Pueden prepararse otras sales mediante medios convencionales. La base libre también puede prepararse mediante medios convencionales.

5 En la presente invención se desvelan compuestos útiles como inhibidores de Lp-PLA₂ útiles en los métodos como en el presente documento:

10 1-(N-(2-(dietilamino)etil)-N-(4-(4-trifluorometilfenil)bencil)-aminocarbonilmetil)-2-(4-fluorobencil)tio-5,6-trimetilenpirimidin-4-ona, también denominada "SB480848" o el nombre USAN "darapladib" que es un compuesto basado en pirimidinona y un inhibidor reversible de Lp-PLA₂ y se usa en los ejemplos en el presente documento,

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

15 *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; y

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

20 Sales farmacéuticamente aceptables de 1-(N-(2-(dietilamino)etil)-N-(4-(4-trifluorometilfenil)bencil)-aminocarbonilmetil)-2-(4-fluorobencil)tio-5,6-trimetilene pirimidin-4-ona, AKA SB480848, y usadas en los ejemplos en el presente documento; *N*-(2-(dietilamino)etil)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4,5,6,7-tetrahidrociclopentapirimidin-1-il]-*N*-(4'-trifluorometil-bifenil-4-ilmetil)acetamida; *N*-(1-(2-metoxietil)piperidin-4-il)-2-(2,3-difluorobenciltio)-4-oxo-4*H*-quinolin-1-il]-*N*-(4'-trifluorometilbifenil-4-ilmetil)acetamida; y

25 2-[4-({[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-*d*]pirimidin-1(4*H*)-il]-acetil}[4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil)amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato de metilo también son útiles como inhibidores de Lp-PLA₂ para su uso en los métodos como se desvelan en el presente documento.

Inhibidores de ácidos nucleicos de Lp-PLA₂

30 También se desvelan agentes que inhiben Lp-PLA₂ que son ácidos nucleicos. Los inhibidores de ácidos nucleicos de Lp-PLA₂ son, por ejemplo, pero no están limitados a, moléculas que inducen interferencia por ARN, por ejemplo, pero no se limitan a, ARNip, ARNbc, ARNtp, ARNhp y versiones modificadas de los mismos, en los que la molécula de interferencia por ARN silencia la expresión génica de Lp-PLA₂. También se desvela un inhibidor de ácidos nucleicos de Lp-PLA₂ que es un ácido oligonucleico antisentido, o un análogo de ácido nucleico, por ejemplo, pero no se limita a, ADN, ARN, ácido nucleico peptídico (PNA), PNA pseudo-complementario (pc-PNA), o ácido nucleico bloqueado (LNA) y similares. Alternativamente, en la presente divulgación, el ácido nucleico es ADN o ARN, y análogos de ácidos nucleicos, por ejemplo, PNA, pcPNA y LNA. Un ácido nucleico puede ser mono o bicatenario, y puede seleccionarse 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, proteínas que codifican secuencias de ácidos nucleicos que actúan de represores transcripcionales, moléculas antisentido, ribozimas, secuencias de ácidos nucleicos inhibidores pequeños, por ejemplo, pero no se limitan a iARN, iARNhp, ARNip, micro-iARN (miARN), oligonucleótidos antisentido, etc.

45 En la presente divulgación, el ARN monocatenario (ARNmc), una forma de ARN endógenamente hallada en células eucariotas, puede usarse para formar una molécula de iARN. Moléculas de ARNmc celular incluyen ARN mensajeros (y los ARN pre-mensajeros progenitores), ARN nucleares pequeños, ARN nucleolares pequeños, ARN de transferencia y ARN ribosómicos. El ARN bicatenario (ARNbc) induce una respuesta inmunitaria dependiente del tamaño de forma que el ARNbc mayor de 30 pb active la respuesta de interferón, mientras que los ARNbc más cortos se alimentan en la maquinaria de interferencia de ARN endógeno de la célula en la dirección 3' de la enzima de Dicer.

50 Puede reducirse Lp-PLA₂ por la inhibición de la expresión del polipéptido Lp-PLA₂ o por métodos de "silenciamiento génico" comúnmente conocidos por expertos habituales en la materia.

55 La interferencia por ARN (iARN) proporciona un poderoso enfoque para inhibir la expresión de polipéptidos diana seleccionados. La iARN usa dúplex de ARN interferente pequeño (ARNip) que dirige el ARN mensajero que codifica el polipéptido diana para la degradación selectiva. El silenciamiento post-transcripcional dependiente de ARNip de la expresión génica implica cortar la molécula de ARN mensajero diana en un sitio guiado por el ARNip.

60 La interferencia por ARN (iARN) es un proceso evolutivamente conservado por el cual la expresión o introducción de ARN de una secuencia que es idéntica o altamente similar a un gen diana produce la degradación específica de secuencia o silenciamiento génico post-transcripcional específico (PTGS) de ARN mensajero (ARNm) transcrito de ese gen dirigido (véase Coburn, G. y Cullen, B. (2002) J. of Virology 76(18):9225), inhibiendo así la expresión del gen diana. Como se ha desvelado en el presente documento, el ARN puede ser ARN bicatenario (ARNbc). Éste proceso se ha descrito en plantas, invertebrados y células de mamífero. En la naturaleza, la iARN se inicia por la endonucleasa específica de ARNbc Dicer, que promueve la escisión progresiva de ARNbc largo en fragmentos bicatenarios llamados ARNip. Los ARNip se incorporan en un complejo de proteína (llamado "complejo de

silenciamiento inducido por ARN", o "RISC") que reconoce y escinde ARNm diana. La iARN también puede iniciarse introduciendo moléculas de ácidos nucleicos, por ejemplo, ARNip sintético o agentes interferentes de ARN, para inhibir o silenciar la expresión de genes diana. Como se usa en el presente documento, la "inhibición de la expresión de genes diana" incluye cualquier disminución en la expresión o actividad de proteína o nivel del gen diana o proteína codificada por el gen diana en comparación con una situación en la que no se ha inducido interferencia por ARN. La disminución puede ser de al menos el 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o el 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 elegido como diana por un agente interferente de ARN.

"ARN interferente corto" (ARNip), también denominado en el presente documento "ARN interferente pequeño", se define como un agente que funciona inhibiendo la expresión de un gen diana, por ejemplo, por iARN. Un ARNip puede sintetizarse químicamente, puede producirse por transcripción *in vitro*, o puede producirse dentro de una célula huésped. Como se ha desvelado en el presente documento, el ARNip es una molécula de ARN bicatenario (ARNbc) de aproximadamente 15 a aproximadamente 40 nucleótidos de longitud, preferentemente aproximadamente 15 a aproximadamente 28 nucleótidos, más preferentemente aproximadamente 19 a aproximadamente 25 nucleótidos de longitud, y más preferentemente aproximadamente 19, 20, 21, 22 o 23 nucleótidos de longitud, y puede contener un nucleótido protuberante en 3' y/o 5' sobre cada hebra que tiene una longitud de aproximadamente 0, 1, 2, 3, 4 o 5 nucleótidos. La longitud del nucleótido protuberante es independiente entre las dos hebras, es decir, la longitud del nucleótido protuberante sobre una hebra no depende de la longitud del nucleótido protuberante sobre la segunda hebra. Preferentemente, el ARNip puede promover la interferencia por ARN mediante la degradación o silenciamiento génico post-transcripcional específico (PTGS) del ARN mensajero (ARNm) diana.

Los ARNip también incluyen ARN de horquilla pequeña (también llamados tallo-bucle) (ARNhp). Como se ha desvelado en el presente documento, estos ARNhp están compuestos de una hebra no codificante corta (por ejemplo, aproximadamente 19 a aproximadamente 25 nucleótidos), seguido de un bucle de nucleótidos de aproximadamente 5 a aproximadamente 9 nucleótidos, y la hebra codificante análoga. Alternativamente, la hebra codificante puede preceder a la estructura de bucle de nucleótido y la hebra no codificante puede seguir. Estos ARNhp pueden estar contenidos en plásmidos, retrovirus y lentivirus y expresarse a partir de, por ejemplo, el promotor *poi III U6*, u otro promotor (véase, por ejemplo, Stewart, et al. (2003) *ARN Apr*;9(4):493-501).

El gen diana o secuencia del agente interferente 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 secuencia genómica, o un fragmento de la misma. Como se usa en este contexto, el término "homólogo" se define como que es sustancialmente idéntico, suficientemente complementario, o similar al ARNm diana, o un fragmento del mismo, para efectuar la interferencia por ARN de la diana. Además de moléculas de ARN nativas, ARN adecuados para inhibir o interferir con la expresión de una secuencia diana incluyen derivados y análogos de ARN. Preferentemente, el ARNip es idéntico a su diana.

El ARNip preferentemente se dirige solo a una secuencia. Cada uno de los agentes interferentes de ARN, tales como ARNip, puede cribarse para posibles efectos inespecíficos por, por ejemplo, perfilado de expresión. Tales métodos son conocidos para un experto en la materia y se describen, por ejemplo, en Jackson et al, *Nature Biotechnology* 6:635-637, 2003. Además del perfilado de expresión, también pueden cribarse las posibles secuencias diana para secuencias similares en las bases de datos de secuencias para identificar posibles secuencias que pueden tener efectos inespecíficos. Por ejemplo, según Jackson et al. (Id.) 15, o quizás tan solo 11, nucleótidos contiguos de identidad de secuencias son suficientes para dirigir el silenciamiento de transcritos no elegidos como diana. Por tanto, inicialmente puede cribarse el ARNip propuesto para evitar el posible silenciamiento inespecífico usando el análisis de identidad de secuencias por cualquier método de comparación de secuencias conocido, tal como BLAST.

Las moléculas de ARNip no necesitan limitarse a aquellas moléculas que contienen solo ARN, sino que, por ejemplo, engloban adicionalmente nucleótidos químicamente modificados y no nucleótidos, y también incluyen moléculas en las que una molécula de azúcar de ribosa está sustituida con otra molécula de azúcar o una molécula que realiza una función similar. Además, puede usarse un enlace no natural entre residuos de nucleótidos, tal como un enlace fosforotioato. Por ejemplo, puede usarse el ARNip que contiene estructuras de D-arabinofuranosilo en lugar de los D-ribonucleósidos que existen de forma natural hallados en ARN en moléculas de iARN según la presente invención (patente de EE.UU. nº 5.177.196). Otros ejemplos incluyen moléculas de ARN que contienen el enlace O entre el azúcar y la base heterocíclica del nucleósido, que confiere resistencia a nucleasa y apretada unión de la hebra complementaria a las moléculas de oligonucleótidos similares a los oligonucleótidos que contienen 2'-O-metilribosa, arabinosa y particularmente D-arabinosa (patente de EE.UU. nº 5.177.196).

La hebra de ARN puede derivatizarse con un grupo funcional reactivo de un grupo indicador, tal como un fluoróforo. Derivados particularmente útiles se modifican en un extremo o extremos de una hebra de ARN, normalmente el extremo 3' de la hebra codificante. Por ejemplo, el 2'-hidroxilo en el extremo 3' puede derivatizarse fácilmente y selectivamente con una variedad de grupos.

Otros derivados de ARN útiles incorporan nucleótidos que tienen restos de hidrato de carbono modificados, tales como residuos 2'-O-alkilados o derivados de 2'-O-metilribosilo y derivados de 2'-O-fluororribosilo. Las bases de ARN también pueden modificarse. Puede usarse cualquier base modificada útil para inhibir o interferir con la expresión de una secuencia diana. Por ejemplo, pueden incorporarse bases halogenadas, tales como 5-bromouracilo y 5-yodouracilo. Las bases también pueden alquilarse, por ejemplo, puede incorporarse 7-metilguanosina en lugar de un residuo de guanosina. También pueden incorporarse bases no naturales que dan inhibición satisfactoria.

Las modificaciones de ARNip más preferidas incluyen 2'-desoxi-2'-fluorouridina o nucleótidos de ácido nucleico bloqueado (LNA) y dúplex de ARN que contienen o bien fosfodiéster o bien números variables de enlaces fosforotioato. Tales modificaciones son conocidas para un experto en la materia 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 pueden introducirse usando químicas establecidas para la tecnología de oligonucleótidos antisentido. Preferentemente, las modificaciones implican modificación mínima de 2'-O-metilo, excluyendo preferentemente tal modificación. Las modificaciones también excluyen preferentemente modificaciones de los grupos 5'-hidroxilo libres del ARNip.

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

Otros ARNip útiles para dirigir la expresión de Lp-PLA₂ puede diseñarse y probarse fácilmente. Por consiguiente, ARNip útiles para los métodos descritos en el presente documento incluyen moléculas de ARNip de aproximadamente 15 a aproximadamente 40 o aproximadamente 15 a aproximadamente 28 nucleótidos de longitud, que son homólogas a un gen LpPLA₂. Preferentemente, las moléculas de ARNip que se dirigen a Lp-PLA₂ tienen una longitud de aproximadamente 19 a aproximadamente 25 nucleótidos. Más preferentemente, las moléculas de ARNip que se dirigen a Lp-PLA₂ tienen una longitud de aproximadamente 19, 20, 21 o 22 nucleótidos. Las moléculas de ARNip que se dirigen a Lp-PLA₂ también pueden comprender un grupo 3'-hidroxilo. Las moléculas de ARNip que se dirigen a Lp-PLA₂ pueden ser monocatenarias o bicatenarias; tales moléculas pueden ser de extremos romos o comprender extremos de nucleótidos protuberantes (por ejemplo, 5', 3'). En realizaciones específicas, la molécula de ARN es bicatenaria y o bien de extremos romos o bien comprende extremos de nucleótidos protuberantes.

En la presente divulgación, al menos una hebra de la molécula de ARN que se dirige a Lp-PLA₂ tiene nucleótidos protuberantes en 3' de aproximadamente 0 a aproximadamente 6 nucleótidos (por ejemplo, nucleótidos de pirimidina, nucleótidos de purina) de longitud, de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 nucleótidos, de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 nucleótidos y de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 nucleótidos de longitud. En la presente divulgación, la molécula de ARN que se dirige a Lp-PLA₂ puede ser bicatenaria – una hebra tiene nucleótidos protuberantes en 3' y la otra hebra puede ser de extremos romos o tiene nucleótidos protuberantes. Cuando la molécula de ARN que se dirige a Lp-PLA₂ es bicatenaria y ambas hebras comprenden nucleótidos protuberantes, la longitud de los nucleótidos protuberantes puede ser igual o diferente para cada hebra. El ARN puede comprender aproximadamente 19, 20, 21 o 22 nucleótidos que están apareados y que tienen nucleótidos protuberantes de aproximadamente 1 a aproximadamente 3, particularmente aproximadamente 2, nucleótidos sobre ambos extremos 3' del ARN. En la presente divulgación, los nucleótidos protuberantes en 3' pueden estabilizarse contra la degradación. Preferentemente, el ARN se estabiliza incluyendo nucleótidos de purina, tales como nucleótidos de adenosina o guanosina. Alternativamente, la sustitución de nucleótidos de pirimidina con análogos modificados, por ejemplo, sustitución de los nucleótidos protuberantes en 3' de 2 nucleótidos de uridina con 2'-desoxitimidina se tolera y no afecta la eficiencia de la iARN. La ausencia de un 2'-hidroxilo potencia significativamente la resistencia a nucleasa de los nucleótidos protuberantes en el medio de cultivo de tejido.

El ARNm de Lp-PLA₂ ha sido satisfactoriamente elegido como diana usando ARNip y tal ARNip o vectores para prepararlos están comercialmente disponibles, por ejemplo, de Invitrogen. La evaluación de la expresión y/o inactivación de la proteína Lp-PLA₂ usando tal ARNip de LpPLA₂ puede determinarse usando kits comercialmente disponibles, por ejemplo, pero no se limitan a, ensayo de PLAC de diaDexus. Otros pueden prepararse fácilmente por aquellos expertos en la materia basándose en la secuencia conocida del ARNm diana. Para evitar duda, la secuencia de un ADNc de LpPLA₂ humano se proporciona en, por ejemplo, los n° de acceso de GenBank: U20157 (SEC ID N°: 1) o NM_005084 (SEC ID N°: 2). La secuencia en U20157 es la siguiente (SEC ID N°: 1):

ES 2 548 878 T3

```

1 gctggtcgga ggctcgcagt gctgtggcg agaagcagtc gggtttggag
  cgcttgggtc
5      61 gcgttggtgc gcggtggaac gcgcccaggg accccagttc ccgcgagcag
ctccgcgccc
      121 cgctgagag actaagctga aactgctgt cagctccca gatggtgcca
cccaaattgc
      181 atgtgctttt ctgcctctgc ggctgcctgg ctgtggttta tccttttgac
tggcaataca
10     241 taaatcctgt tgcccatatg aaatcatcag catgggtcaa caaaatacaa
gtactgatgg
      301 ctgctgcaag ctttggccaa actaaaatcc cccggggaaa tgggccttat
tccgttgggt
      361 gtacagactt aatgtttgat cactaata agggcacctt cttgcgttta
15     tattatccat
      421 cccaagataa tgatgcctt gacaccctt ggatcccaa taaagaatat
ttttggggtc
      481 ttagcaaatt tttggaaca cactggctta tgggcaacat tttgaggtta
ctctttgggt
20     541 caatgacaac tctgcaaac tggaaatccc ctctgaggcc tggtgaaaaa
tatccacttg
      601 ttgttttttc tcatggtctt gggcattca ggacactta ttctgtatt
ggcattgacc
      661 tggcatctca tgggtttata gttgctgctg tagaacacag agatagatct
25     gcatctgcaa
      721 cttactattt caaggaccaa tctgctgcag aaatagggga caagtcttgg
ctctacctta
      781 gaacctgaa acaagaggag gagacacata tacgaaatga gcaggtagcg
caaagagcaa
30
      841 aagaatgttc ccaagctctc agtctgattc ttgacattga tcatggaag
ccagtgaaga
      901 atgcattaga tttaaagttt gatatggaac aactgaagga ctctattgat
agggaaaaaa
35     961 tagcagtaat tggacattct tttggtggag caacggttat tcagactctt
agtgaagatc
      1021 agagattcag atgtggtatt gcctggatg catggatggt tccactgggt
gatgaagtat
40     1081 alccagaaat tctcagccc cctcttttlla tcaactclga atatttccaa
tatcctgcta
      1141 atatcataaa aatgaaaaaa tgctactcac ctgataaaga aagaagatg
attacaatca
      1201 ggggttcagt ccaccagaat tttgctgact tcacttttgc aactggcaaa
45     ataattggac
      1261 acatgctcaa attaaagggg gacatagatt caaatgtagc tattgatctt
agcaacaag
      1321 cttcattagc attcttacia aagcatttag gacttcataa agattttgat
cagtgggact
50     1381 gcttgattga aggagatgat gagaatctta ttccagggac caacattaac
acaaccaatc
      1441 aacacatcat gttacagaac tcttcaggaa tagagaaata caattaggat
taaaataggt
      1501 ttttt
55

```

Se eligen secuencias de ARNip para maximizar la captación de la hebra antisentido (guía) del ARNip en RISC y así maximizar la capacidad de RISC para dirigir el ARNm de Lp-PLA₂ humano para la degradación. Esto puede llevarse a cabo escaneando secuencias que tienen la menor energía libre de unión en el extremo 5' de la hebra no codificante. La menor energía libre conduce a un potenciamiento del desenrollamiento del extremo 5' de la hebra no codificante del dúplex de ARNip, asegurando así que la hebra no codificante será captada por RISC y dirigirá la escisión específica de secuencia del ARNm de Lp-PLA₂ humano.

Preferentemente, el ARNip o ARNip modificado se administra en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Agentes de vehículo adicionales, tales como liposomas, pueden añadirse al vehículo farmacéuticamente aceptable.

Como se ha desvelado en el presente documento, el ARNip se administra administrando un vector que codifica ARN

de horquilla pequeña (ARNhp) en un vehículo farmacéuticamente aceptable a las células en un órgano de un individuo. El ARNhp se convierte por las células después de la transcripción en ARNip capaces de dirigir, por ejemplo, Lp-PLA₂. Como se ha desvelado en el presente documento, el vector puede ser un vector regulable, tal como vector inducible por tetraciclina.

Como se ha desvelado en el presente documento, los agentes interferentes de ARN usados en los métodos descritos en el presente documento se recogen activamente por células *in vivo* tras la inyección intravenosa, por ejemplo, inyección hidrodinámica, sin el uso de un vector, ilustrando la eficaz administración *in vivo* de los agentes interferentes de ARN, por ejemplo, los ARNip usados en los métodos desvelados en el presente documento.

También pueden emplearse otras estrategias para la administración de los agentes interferentes de ARN, por ejemplo, el ARNip o ARNhp como se usa en los métodos desvelados en el presente documento, tales como, por ejemplo, administración por un vector, por ejemplo, un plásmido o vector viral, por ejemplo, un vector lentiviral. Tales vectores pueden usarse como se describe, por ejemplo, en Xiao-Feng Qin et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 100: 183-188. Otros métodos de administración incluyen la administración de los agentes interferentes de ARN, por ejemplo, los ARNip o ARNh de la invención, usando un péptido básico conjugando o mezclando el agente interferente de ARN con un péptido básico, por ejemplo, un fragmento de un péptido TAT, mezclando con lípidos catiónicos o formulando en partículas.

Como se ha indicado, el ARNbc, tal como ARNip o ARNhp, puede administrarse usando un vector inducible, tal como un vector inducible por tetraciclina. Pueden usarse métodos descritos, por ejemplo, en Wang et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 100: 5103-5106, usando vectores pTet-On (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA). Como se desvela en el presente documento, un vector puede ser un vector plasmídico, un vector viral, o cualquier otro vehículo adecuado adaptado para la inserción y secuencia extraña y para la introducción en células eucariotas. El vector puede ser un vector de expresión que puede dirigir la transcripción de la secuencia de ADN de las moléculas agonistas o antagonistas de ácidos nucleicos en ARN. Pueden seleccionarse vectores de expresión virales de un grupo que comprende, por ejemplo, retrovirus, lentivirus, virus de Epstein-Barr, virus del papiloma bovino, vectores basados en adenovirus y adeno-asociados o virus híbridos de cualquiera de los anteriores. En la presente divulgación, el vector puede ser episómico. El uso de un vector episómico adecuado proporciona un medio de mantenimiento de la molécula de ácido nucleico antagonista en el sujeto en ADN extracromosómico de alto número de copias eliminándose, así los posibles efectos de integración cromosómica.

Las moléculas de interferencia por ARN e inhibidores de ácidos nucleicos útiles en los métodos como se han desvelado en el presente documento pueden producirse usando cualquier técnica conocida tal como síntesis química directa, mediante procesamiento de ARN bicatenarios más largos por exposición a la proteína Dicer recombinante o lisados de embrión de *Drosophila*, mediante un sistema *in vitro* derivado de células S2, usando ARN polimerasa de fago, ARN polimerasa dependiente de ARN y vectores basados en ADN. El uso de lisados celulares o procesamiento *in vitro* puede implicar adicionalmente el posterior aislamiento del ARNip corto, por ejemplo, aproximadamente 21-23 nucleótidos, del lisado, etc. La síntesis química normalmente avanza haciendo dos oligómeros de ARN monocatenario seguido de la hibridación de los dos oligómeros monocatenarios en un ARN bicatenario. Otros ejemplos incluyen los métodos desvelados en los documentos WO 99/32619 y WO 01/68836 que enseñan la síntesis química y enzimática de ARNip. Además, están disponibles numerosos servicios comerciales para el diseño y fabricación de ARNip específico (véase, por ejemplo, QIAGEN Inc., Valencia, CA y AMBION Inc., Austin, TX)

En el presente documento también se desvela un agente que es proteína o polipéptido o agente de iARN que inhibe la expresión de Lp-PLA y/o actividad de la proteína Lp-PLA₂. Pueden modificarse células (por ejemplo, por recombinación homóloga) para proporcionar elevada expresión de un agente tal, por ejemplo reemplazando, por completo o en parte, el promotor que existe de forma natural con todo o parte de un promotor heterólogo de manera que las células expresen el agente inhibidor natural de Lp-PLA₂, por ejemplo, la proteína o inhibidor de miARN de Lp-PLA₂ a mayores niveles. Un promotor heterólogo se inserta de tal manera que esté operativamente enlazado al ácido nucleico deseado que codifica el agente. Véase, por ejemplo, la publicación internacional PCT n° WO 94/12650 por Transkaryotic Therapies, Inc., publicación internacional PCT n° WO 92/20808 por Cell Genesys, Inc., y publicación internacional PCT n° WO 91/09955 por Applied Research Systems. Las células también pueden manipularse 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 pueden sustituirse por recombinación homóloga. Se describen técnicas de activación de genes en la patente de EE.UU. n° 5.272.071 a Chappel; patente de EE.UU. n° 5.578.461 a Sherwin et al.; documentos PCT/US92/09627 (WO93/09222) por Selden et al.; y PCT/US90/06436 (WO91/06667) por Skoultchi et al. El agente puede prepararse cultivando células huésped transformadas bajo condiciones de cultivo adecuadas para expresar el miARN. El agente expresado resultante puede entonces purificarse a partir de tal cultivo (es decir, 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 inhibidor de ácido nucleico 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-toyopearlTM o Cibacrom blue 3GA Sepharose; una o más etapas que implican cromatografía de interacción hidrófoba usando resinas tales como éter fenílico, éter butílico o éter propílico;

cromatografía de inmunoafinidad, o cromatografía de afinidad por ADNc complementario.

En la presente divulgación, los inhibidores de ácido nucleico de Lp-PLA₂ pueden obtenerse sintéticamente, por ejemplo, sintetizando químicamente un ácido nucleico por cualquier método de síntesis conocido para el experto. Los inhibidores de ácidos nucleicos sintetizados de Lp-PLA₂ pueden entonces purificarse por cualquier método conocido en la técnica. Métodos para la síntesis química de ácidos nucleicos incluyen, pero no se limitan a, síntesis química *in vitro* usando química de fosfotriéster, fosfato o fosforamido y técnicas en fase sólida, o mediante productos intermedios de desoxinucleósido H-fosfonato (véase la patente de EE.UU. nº 5.705.629 a Bhongle).

En algunas circunstancias, por ejemplo, cuando se desee elevada estabilidad de nucleasas, pueden preferirse los ácidos nucleicos que tienen análogos de ácidos nucleicos y/o enlaces internucleosídicos modificados. También puede sintetizarse ácidos nucleicos que contienen enlaces internucleosídicos modificados usando reactivos y métodos que son muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, métodos de síntesis de ácidos nucleicos que contienen enlaces internucleosídicos fosfonato, fosforotioato, fosforoditioato, fosforamido, metoxietilfosforamido, formacetal, tioformacetal, diisopropilsililo, acetamido, carbamato, dimetilen-sulfuro (-CH₂-S-CH₂), dimetilen-sulfóxido (-CH₂-SO-CH₂), dimetilen-sulfona (-CH₂-SO₂-CH₂), 2'-O-alquilo y 2'-desoxi-2'-fluoro-fosforotioato son muy conocidos en la técnica (véase Uhlmann et al., 1990, Chem. Rev. 90:543-90:543-584; Schneider et al., 1990, Tetrahedron Lett. 31:335 y referencias citadas en su interior). Las patentes de EE.UU. nº 5.614.617 y 5.223.618 a Cook, et al., 5.714.606 a Acevedo, et al., 5.378.825 a Cook, et al., 5.672.697 y 5.466.786 a Buhr, et al., 5.777.092 a Cook, et al., 5.602.240 a De Mesmacker, et al., 5.610.289 a Cook, et al. y 5.858.988 a Wang, también describen análogos de ácidos nucleicos para estabilidad de nucleasas y captación celular potenciadas.

Pueden obtenerse moléculas de ARNip sintético, que incluyen moléculas de ARNhp, usando varias técnicas conocidas para aquellos expertos en la materia. Por ejemplo, la molécula de ARNip puede sintetizarse químicamente o producirse recombinantemente usando métodos conocidos en la técnica, tales como usando fosforamiditos de ribonucleósido apropiadamente protegidos y un sintetizador de ADN/ARN convencional (véanse, por ejemplo, Elbashir, S.M. et al. (2001) Nature 411:494-498; Elbashir, S.M., W. Lendeckel y 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, están disponibles varios proveedores de la síntesis de ARN comercial que incluyen, pero no se limitan a, Proligo (Hamburgo, Alemania), Dharmacon Research (Lafayette, CO, EE.UU.), Pierce Chemical (parte de Perbio Science, Rockford, IL, EE.UU.), Glen Research (Sterling, VA, EE.UU.), ChemGenes (Ashland, MA, EE.UU.) y Cruachem (Glasgow, RU). Como tales, las moléculas de ARNip no son excesivamente difíciles de sintetizar y se proporcionan fácilmente en una calidad adecuada para iARN. Además, pueden expresarse ARNbc como estructuras de tallo-bucle codificadas por vectores plasmídicos, retrovirus y lentivirus (Paddison, P.J. et al. (2002) Genes Dev. 16:948-958; McManus, M.T. et al. (2002) RNA 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 generalmente tienen un promotor *poiii* en la dirección 5' del ARNbc y pueden expresar hebras de ARN sentido y antisentido por separado y/o como estructuras de horquilla. Dentro de las células, Dicer procesa el ARN de horquilla corta (ARNhp) en ARNip eficaz.

La región elegida como diana de la molécula de ARNip de la presente divulgación puede seleccionarse de una secuencia génica diana, por ejemplo, una secuencia codificante de Lp-PLA₂, empezando a partir de aproximadamente 25 a 50 nucleótidos, de aproximadamente 50 a 75 nucleótidos, o de aproximadamente 75 a 100 nucleótidos en la dirección 3' del codón de iniciación. Las secuencias de nucleótidos pueden contener UTR de 5' o 3' y regiones cerca del codón de iniciación. Un método de diseñar una molécula de ARNip de la presente divulgación implica identificar el motivo de secuencia de 23 nucleótidos AA(N19)TT (en la que N puede ser cualquier nucleótido), y seleccionar aciertos con al menos el 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 % o el 75 % de contenido de G/C. La porción "TT" de la secuencia es opcional. Alternativamente, si no se encuentra tal secuencia, la búsqueda puede extenderse usando el motivo NA(N21), en el que N puede ser cualquier nucleótido. En ésta situación, el extremo 3' del ARNip sentido puede convertirse en TT para permitir la generación de un dúplex simétrico con respecto a la composición de secuencia de los nucleótidos protuberantes de 3' sentido y antisentido. La molécula de ARNip antisentido puede entonces sintetizarse como el complemento a las posiciones de nucleótido 1 a 21 del motivo de secuencia de 23 nucleótidos. El uso de nucleótidos protuberantes TI' en 3' simétricos puede ser ventajoso para garantizar que las partículas de ribonucleoproteína interferente pequeña (RNPIP) se formen con relaciones aproximadamente iguales de RNPIP que escinde ARN diana sentido y antisentido (Elbashir et al. (2001) arriba y Elbashir et al. 2001 arriba). También puede usarse análisis de bases de datos de secuencias, que incluyen, pero no se limitan a, NCBI, BLAST, Derwent y GenSeq, además de software de oligosíntesis comercialmente disponible tal como Oligoengine[®], para seleccionar secuencias de ARNip contra bibliotecas EST para garantizar que solo se elige como diana un gen.

Administración de agentes interferentes de ARN: Métodos de administración de agentes interferentes de ARN, por ejemplo, un ARNip, o vectores que contienen un agente interferente de ARN, a las células diana (por ejemplo,

células del cerebro u otras células diana deseadas, para células en los sistemas nervioso central y periférico), pueden incluir, por ejemplo (i) inyección de una composición que contiene el agente interferente de ARN, por ejemplo, un ARNip, o (ii) poner directamente en contacto la célula, por ejemplo, una célula del cerebro, con una composición que comprende un agente interferente de ARN, por ejemplo, un ARNip. En una realización, el agente interferente de ARN puede dirigirse a la médula ósea en la que se producen los linfocitos que expresan Lp-PLA₂. En la presente divulgación, agentes interferentes de ARN, por ejemplo, un ARNip, pueden inyectarse directamente en cualquier vaso sanguíneo, tal como vena, arteria, vénula o arteriola, mediante, por ejemplo, inyección hidrodinámica o cateterización. En la presente divulgación, el agente interferente de ARN puede inyectarse o aplicarse tópicamente directamente al sitio de las úlceras de la piel.

La administración puede ser por una única inyección o por dos o más inyecciones. El agente interferente de ARN se administra en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Pueden usarse uno o más agentes interferentes de ARN simultáneamente. Los agentes interferentes de ARN, por ejemplo, el ARNm Lp-PLA₂ que se dirige a ARNip, puede administrarse individualmente, o en combinación con otros agentes interferentes de ARN, por ejemplo, ARNip, tales como, por ejemplo, ARNip dirigido a otros genes celulares. El ARNip de Lp-PLA₂ también puede administrarse en combinación con otros agentes farmacéuticos que se usan para tratar o prevenir enfermedades neurodegenerativas o trastornos.

Como se ha desvelado en el presente documento, células específicas son dirigidas con interferencia por ARN, limitando los posibles efectos secundarios de la interferencia por ARN producida por el direccionamiento no específico de interferencia por ARN. El método puede usar, por ejemplo, un complejo o una molécula de fusión que comprende un resto que se dirige a célula y un resto de unión por interferencia por ARN que se usa para administrar interferencia por ARN eficazmente en células. Por ejemplo, una proteína de fusión de anticuerpo-protamina, cuando se mezcla con un ARNip, se une a ARNip y administra selectivamente el ARNip en células que expresan un antígeno reconocido por el anticuerpo, produciendo el silenciamiento de la expresión génica solo en aquellas células que expresan el antígeno. El ARNip o el resto de unión que induce interferencia por ARN es un dominio de unión de proteína o de ácido nucleico o fragmento de una proteína, y el resto de unión está fusionado con una porción del resto que elige diana. La localización del resto que elige diana puede estar tanto en el extremo carboxilo como el extremo amino de la construcción o en el centro de la proteína de fusión.

También puede emplearse un mecanismo de administración mediado por virus para administrar ARNip a células *in vitro* y *in vivo* como se ha descrito en Xia, H. et al. (2002) Nat Biotechnol 20(10):1006). También pueden emplearse mecanismos de administración de ARNhp mediados por plásmidos o por virus para administrar ARNhp a células *in vitro* e *in vivo* como se describe en Rubinson, D.A., et al. ((2003) Nat. Genet. 33:401-406) y Stewart, S.A., et al. ((2003) ARN 9:493-501).

También pueden introducirse agentes interferentes de ARN, para, por ejemplo, un ARNip, en células mediante la circulación vascular o extravascular, la sangre o el sistema linfático, y el líquido cefalorraquídeo.

La dosis del agente interferente de ARN particular estará en una cantidad necesaria para efectuar interferencia por ARN, por ejemplo, silenciamiento génico post-traducciona (PTGS), del gen diana particular, conduciendo así a la inhibición de la expresión del gen diana o inhibición de actividad o nivel de la proteína codificada por el gen diana.

También se sabe que las moléculas de iARN no tienen que coincidir perfectamente con su secuencia diana. Preferentemente, sin embargo, la parte de 5' y central de la hebra antisentido (guía) del ARNip es perfectamente complementaria a la secuencia de ácidos nucleicos diana.

Por consiguiente, las moléculas de iARN que funcionan como inhibidores de ácidos nucleicos de Lp-PLA₂ en la presente invención son, por ejemplo, pero no se limitan a, moléculas bicatenarias (bc) sin modificar y modificadas de ARN que incluyen ARN temporal corto (ARNtp), ARN interferente pequeño (ARNip), ARN de horquilla corta (ARNhp), microARN (miARN), ARN bicatenario (ARNbc) (véase, por ejemplo Baulcombe, Science 297:2002-2003, 2002). Las moléculas de ARNbc, por ejemplo, ARNip, también pueden contener nucleótidos protuberantes en 3', preferentemente nucleótidos protuberantes 3'UU o 3'TT. Las moléculas de ARNip de la presente divulgación no incluyen moléculas de ARN que comprenden ARNmc superior a aproximadamente 30-40 bases, aproximadamente 40-50 bases, aproximadamente 50 bases o más. En la presente divulgación, las moléculas de ARNip de la presente divulgación son bicatenarias para más de aproximadamente el 25 %, más de aproximadamente el 50 %, más de aproximadamente el 60 %, más de aproximadamente el 70 %, más de aproximadamente el 80 %, más de aproximadamente el 90 % de su longitud. En algunos aspectos de la presente divulgación, un inhibidor de ácidos nucleicos de Lp-PLA₂ es cualquier agente que se una e inhiba la expresión de ARNm de Lp-PLA₂, en el que se inhibe la expresión de ARNm de Lp-PLA₂ o un producto de transcripción de ácido nucleico codificado por SEC ID N°: 1 ó 2.

En otro aspecto de la divulgación, agentes que inhiben Lp-PLA₂ son construcciones de ácidos nucleicos catalíticas, tales como, por ejemplo ribozimas, que pueden escindir transcritos de ARN y prevenir así la producción de proteína natural. Las ribozimas se dirigen a y se hibridan con una secuencia particular en virtud de dos regiones de secuencia complementarias a la diana que flanquea el sitio catalítico de ribozima. Después de la unión, la ribozima escinde la

diana en un modo específico de sitio. El diseño y las pruebas de ribozimas que reconocen y escinden específicamente secuencias de los productos génicos descritas en el presente documento, por ejemplo, para escisión de Lp-PLA₂ u homólogos o variantes de los mismos, pueden lograrse por técnicas muy conocidas para aquellos expertos en la materia (por ejemplo, Lieber y Strauss, (1995) Mol Cell Biol 15:540,551).

- 5 *Inhibidores de proteínas y péptidos de Lp-PLA₂*
- 10 Como se ha desvelado en el presente documento, los agentes que inhiben Lp-PLA₂ son proteínas y/o inhibidores de péptidos o fragmentos de inhibidores de Lp-PLA₂, por ejemplo, pero no se limitan a, proteínas mutadas; proteínas terapéuticas y proteínas recombinantes. Inhibidores de proteínas y péptidos también pueden incluir, por ejemplo, proteínas mutadas, proteínas genéticamente modificadas, péptidos, péptidos sintéticos, proteínas recombinantes, proteínas quiméricas, anticuerpos, proteínas humanizadas, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, proteínas modificadas y fragmentos de los mismos.
- 15 También se desvelan agentes que inhiben Lp-PLA₂ que son variantes negativas dominantes de Lp-PLA₂, por ejemplo, una variante no funcional de Lp-PLA₂.

Anticuerpos

- 20 Como se ha desvelado en el presente documento, inhibidores de genes y/o productos génicos útiles en los métodos de la presente divulgación incluyen, por ejemplo, anticuerpos, que incluyen anticuerpos monoclonales, quiméricos humanizados y recombinantes y fragmentos de unión al antígeno de los mismos. En la presente divulgación pueden usarse anticuerpos neutralizantes como inhibidores de la enzima Lp-PLA₂. Los anticuerpos son fácilmente producidos en animales tales como conejos o ratones por inmunización con el antígeno. Los ratones inmunizados son particularmente útiles para proporcionar fuentes de linfocitos B para la fabricación de hibridomas, que a su vez se cultivan para producir grandes cantidades de anticuerpos monoclonales.

- 30 En la presente divulgación, el inhibidor para los productos génicos identificados en el presente documento puede ser una molécula de anticuerpo o el resto de unión a epítipo de una molécula de anticuerpo y similares. Los anticuerpos proporcionan alta avidéz de unión y especificidad única para un amplio intervalo de antígenos diana y haptenos. Anticuerpos monoclonales útiles en la práctica de la presente divulgación incluyen anticuerpo completo y fragmentos del mismo y se generan según técnicas convencionales, tales como síntesis de hibridomas, técnicas de ADN recombinante y síntesis de proteínas.

- 35 Anticuerpos monoclonales útiles y fragmentos pueden derivarse de cualquier especie (incluyendo seres humanos) o pueden formarse como proteínas quiméricas que emplean secuencias de más de una especie. También se usan anticuerpos monoclonales humanos o anticuerpo murino "humanizado" según la presente divulgación. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal murino puede "humanizarse" recombinando genéticamente la secuencia de nucleótidos que codifica la región Fv murina (es decir, que contiene los sitios de unión al antígeno) o las regiones determinantes de la complementariedad de los mismos con la secuencia de nucleótidos que codifica una región de dominio constante humano y una región Fc. Los restos que eligen diana humanizados son reconocidos por reducir la inmunorreactividad del anticuerpo o polipéptido en el receptor huésped, permitiendo un aumento en la semivida y una reducción de las reacciones inmunitarias posiblemente adversas de un modo similar al desvelado en la solicitud de patente europea nº 0.411.893 A2. Los anticuerpos monoclonales murinos deben emplearse preferentemente en forma humanizada. La actividad de unión al antígeno se determina por las secuencias y conformación de los aminoácidos de las seis regiones determinantes de la complementariedad (CDR) que se localizan (tres cada una) sobre las cadenas ligeras y pesadas de la porción variable (Fv) del anticuerpo. La molécula Fv monocatenaria (scFv) 25-1cDa, compuesta de una región variable (VL) de la cadena ligera y una región variable (VH) de la cadena pesada unidas mediante una secuencia espaciadora de péptidos corta, es el fragmento de anticuerpo más pequeño desarrollado hasta la fecha. Se han desarrollado técnicas para mostrar moléculas de scFv sobre la superficie de fago filamentoso que contienen el gen para scFv. Moléculas de scFv con un amplio intervalo de especificidades antigénicas pueden estar presentes en un único conjunto grande de biblioteca de fagos de scFv. Algunos ejemplos de anticuerpos monoclonales de alta afinidad y derivados quiméricos de los mismos, útiles en los métodos de la presente divulgación, se describen en la solicitud de patente europea EP 186,833; solicitud de patente PCT WO 50 92/16553; y patente de EE.UU. nº 6.090.923.

- 60 Los anticuerpos quiméricos son moléculas de inmunoglobina caracterizadas por dos o más segmentos o porciones derivadas de diferentes especies de animales. Generalmente, la región variable del anticuerpo quimérico se deriva de un anticuerpo de mamífero no humano, tal como anticuerpo monoclonal murino, y la región constante de inmunoglobina se deriva de una molécula de inmunoglobina humana. Preferentemente, ambas regiones y la combinación tienen baja inmunogenicidad como se ha determinado rutinariamente.

- 65 Una limitación de moléculas scFv es su interacción monovalente con antígeno diana. Uno de los métodos más fáciles para mejorar la unión de un scFv a su antígeno diana es aumentar su afinidad funcional mediante la creación de un multímero. La asociación de moléculas de scFv idénticas para formar diacuerpos, triacuerpos y tetracuerpos puede comprender varios módulos de Fv idénticos. Estos reactivos son, por tanto, multivalentes, pero

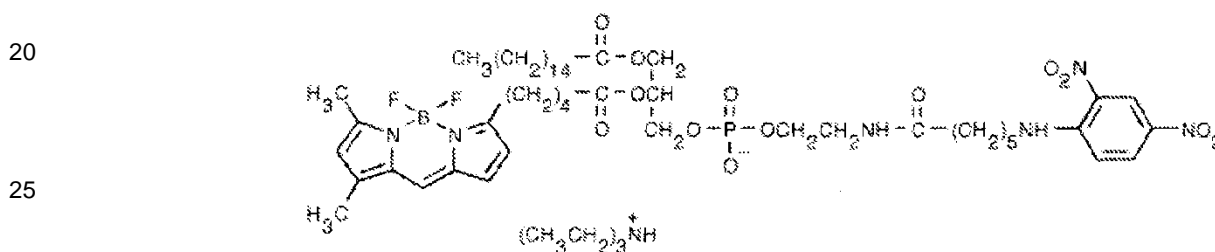
monoespecíficos. La asociación de dos moléculas de scFv diferentes, cada una de las cuales comprende un dominio VH y VL derivado de Ig parentales diferentes, formará un diacuerpo biespecífico completamente funcional. Una aplicación única de scFv biespecíficos es unir dos sitios simultáneamente sobre la misma molécula diana mediante dos epítopes de superficie (adyacentes). Estos reactivos consiguen una ventaja de avidez significativa con respecto a fragmentos scFv o Fab individuales. Se han manipulado varias estructuras basadas en scFv multivalentes, que incluyen, por ejemplo, minianticuerpos, minianticuerpos diméricos, minicuerpos, (scFv)₂, diacuerpos y triacuerpos. Estas moléculas abarcan un intervalo de valencia (dos a cuatro sitios de unión), tamaño (50 a 120 kDa), flexibilidad y facilidad de producción. Los fragmentos Fv monocatenarios de anticuerpos (scFv) son predominantemente monoméricos cuando los dominios VH y VL se unen por conectores polipeptídicos de al menos 12 residuos. El scFv monomérico es termodinámicamente estable con conectores de 12 y 25 aminoácidos de longitud bajo todas las condiciones. Las moléculas de diacuerpo y triacuerpo no covalentes son fáciles de manipular y se producen por acortamiento del conector peptídico que conecta las cadenas pesadas variables y ligeras variables de una molécula de scFv individual. Los dímeros de scFv se unen por hélices anfipáticas que ofrecen un alto grado de flexibilidad y la estructura de minianticuerpo puede modificarse para crear un minianticuerpo biespecífico dimérico (DiBi) que contiene dos minianticuerpos (cuatro moléculas de scFv) conectados mediante una hélice doble. Los dímeros de scFv fusionados con genes o unidos por disulfuro proporcionan un grado de flexibilidad intermedio y se generan por técnicas de clonación directa añadiendo una secuencia de Gly4Cys del extremo C. Los minicuerpos scFv-CH3 comprenden dos moléculas de scFv unidas a un dominio CH3 de IgG tanto directamente (minicuerpo LD) como mediante una región bisagra muy flexible (minicuerpo Flex). Con un peso molecular de aproximadamente 80 kDa, estas construcciones divalentes pueden unirse significativamente a antígenos. El minicuerpo Flex presenta una localización tumoral sorprendente en ratones. Pueden formarse multímeros bi- y tri-específicos por asociación de diferentes moléculas de scFv. En aumento en la afinidad funcional puede alcanzarse cuando Fab o fragmentos de anticuerpos Fv monocatenarios (scFv) se complejan en dímeros, trímeros o agregados más grandes. La ventaja más importante de los scFv multivalentes con respecto a los scFv monovalentes y fragmentos Fab es el aumento en la afinidad de unión funcional (avidez) por antígenos diana. La alta avidez requiere que los multímeros de scFv puedan unirse simultáneamente para separar antígenos diana. El aumento en la afinidad funcional por diacuerpos scFv en comparación con monómeros scFv es significativa y se observa principalmente en constantes de disociación reducidas, que resultaron de unión múltiple a dos o más antígenos diana y volver a enlazar cuando se disocia un Fv. Cuando tales moléculas scFv se asocian en multímeros, pueden diseñarse con o bien alta avidez por un único antígeno diana o bien con múltiples especificidades por diferentes antígenos diana. La unión múltiple a antígenos depende del correcto alineamiento y orientación en los módulos de Fv. Para avidez completa en la diana de scFv multivalente, los sitios de unión al antígeno deben indicar hacia la misma dirección. Si no es estéricamente posible la unión múltiple, entonces es probable que aumentos evidentes en la afinidad funcional sean debidos al efecto del elevado volver a enlazar, que depende de las velocidades de difusión y la concentración de antígeno. Los anticuerpos conjugados con restos que mejoran sus propiedades también se contemplan para la presente invención. Por ejemplo, pueden usarse conjugados de anticuerpo con PEG que aumentan su semivida *in vivo* para la presente divulgación. Se preparan bibliotecas inmunitarias sometiendo los genes que codifican fragmentos de anticuerpos variables de los linfocitos B de animales sin tratamiento previo o inmunizados o pacientes a amplificación por PCR. Se usan combinaciones de oligonucleótidos que son específicas para genes de inmunoglobulina o para las familias de genes de inmunoglobulina. Pueden usarse genes de la línea germinal de inmunoglobulina para preparar repertorios de anticuerpos semisintéticos, estando la región determinante de la complementariedad de los fragmentos variables amplificada por PCR usando cebadores degenerados. Estas bibliotecas de un solo recipiente tienen la ventaja de que los fragmentos de anticuerpos contra un gran número de antígenos pueden aislarse de una única biblioteca. La técnica de expresión en fagos puede usarse para aumentar la afinidad de fragmentos de anticuerpos, preparándose nuevas bibliotecas a partir de los fragmentos ya existentes de anticuerpos por mutagénesis aleatoria, basada en codones o dirigida al sitio, por barajado de las cadenas de dominios individuales con aquellos de fragmentos de repertorios sin tratamiento previo o usando cepas mutadoras bacterianas.

Alternativamente, puede usarse un ratón SCID-hu, por ejemplo, el modelo desarrollado por Genpharm, para producir anticuerpos, o fragmentos de los mismos. En la presente divulgación, se contempla un nuevo tipo de molécula de unión de alta avidez, llamada peptacuerpo, creada empleando el efecto de interacción multivalente. Se fusionó un ligando peptídico corto mediante una región bisagra semi-rígida con el dominio de ensamblaje de bobina en espiral de la proteína oligomérica de cartilago de la matriz, produciendo una molécula de unión multivalente pentámera. Preferentemente, ligandos y/o inhibidores quiméricos pueden ser dirigidos a dianas específicas de tejido o de tumor usando anticuerpos biespecíficos, por ejemplo, producidos por enlace químico de un anticuerpo (Ab) anti-ligando y un Ab dirigido hacia una diana específica. Para evitar las limitaciones de conjugados químicos, pueden usarse conjugados moleculares de anticuerpos para la producción de Ab monocatenarios biespecíficos recombinantes que se dirigen a ligandos y/o inhibidores quimérico en moléculas de la superficie celular. Alternativamente, pueden administrarse dos o más agentes activos y o inhibidores unidos a restos que eligen diana, en los que cada conjugado incluye un resto que elige diana, por ejemplo, un anticuerpo diferente. Cada anticuerpo es reactivo con un epítipo de sitio diana diferente (asociado al mismo antígeno del sitio diana o diferente). Los diferentes anticuerpos con los agentes unidos se acumulan aditivamente en el sitio diana deseado. Pueden emplearse restos que eligen diana basados en anticuerpo o no basados en anticuerpo para administrar un ligando o el inhibidor a un sitio diana. Preferentemente, se usa un agente de unión natural para un antígeno sin regular o asociado a enfermedad para este fin.

Bioensayo para identificar inhibidores de Lp-PLA₂:

Cribado para la inhibición de la proteína Lp-PLA₂

- 5 En algunas realizaciones, la presente invención se refiere a inhibidores de Lp-PLA₂ para su uso en el tratamiento de úlceras de la piel. Cuando sea necesario, agentes que inhiben la proteína Lp-PLA₂ se evalúan usando un bioensayo, como se ha desvelado en la patente de EE.UU. 5.981.252. Un ensayo tal es probar el efecto del agente sobre la proteína Lp-PLA₂ recombinante. En un ensayo, por ejemplo, Lp-PLA₂ recombinante se purifica a homogeneidad a partir de células Sf9 infectadas con baculovirus, usando una columna quelante de cinc, cromatografía de afinidad en Blue Sepharose y una columna de intercambio aniónico. Tras la purificación y ultrafiltración, la enzima puede almacenarse a 6 mg/ml a 4 °C. El tampón 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 sobre la hidrólisis de N-((6-(2,4-dinitrofenil)amino)hexanoil)-2-(4,4-difluoro-5,7-dimetil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-3-pentanoil)-1-hexadecanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, sal de trietilamonio (PED6, referencia del catálogo de Molecular Probes D-23739) como sustrato, usando un lector de placas fluorimétrico con placas de microtitulación de 384 pocillos. La reacción se inicia mediante la adición de enzima (aprox. 400 pM final en peso) y sustrato (5 μM final) al inhibidor en un volumen total de 10 microlitros.



30 (PED6)

- 35 Los compuestos como se han desvelado en el presente documento, por ejemplo, como se han desvelado en las secciones tituladas 2. Se probaron ejemplos de síntesis y se encontró que tenían valores de CI₅₀ en el intervalo 0,1 a 10 nM.

Úlceras de la piel

- 40 Una úlcera de la piel es una llaga en la piel. Las úlceras de la piel pueden producirse mediante una variedad de eventos, tales como traumatismo, exposición a calor o frío (quemaduras y congelación), problemas con la circulación de la sangre, rozadura o irritación de la exposición a material corrosivo. Las úlceras de presión, también conocidas como úlceras de decúbito o escaras de decúbito, son úlceras de la piel que se desarrollan sobre áreas del cuerpo en las que el riego sanguíneo se ha reducido debido a presión prolongada; esto puede producirse en personas confinadas a la cama o una silla, o en aquellas que deben llevar un collarín rígido o escayolas. Las úlceras de la piel pueden infectarse, con graves consecuencias para la salud. Otras condiciones de salud que pueden producir úlceras de la piel incluyen úlceras de la boca (aftas), insuficiencia venosa crónica, diabetes, infección y enfermedad vascular periférica. Las úlceras de la piel se mantienen generalmente por una inflamación, una infección y/o afecciones médicas que impiden la curación, y frecuentemente van acompañadas de esfacelación de tejido inflamado.

- 50 Independientemente de sus muchas causas, las úlceras de la piel están marcadas por las siguientes características: (1) pérdida de integridad del área de la piel, (2) infección secundaria del sitio por bacterias, hongos o virus, (3) debilidad generalizada del paciente y (4) curación retardada. Se usan sistemas de clasificación para comunicar la gravedad y profundidad de una úlcera. Es una forma fácil de comunicar cambios para mejor, o peor.

- 55 Las etapas de clasificación 1-6 del Manual Merck oscilan de:

Etapa 1: La piel está roja. El tejido subyacente está blando. La rojez desaparece con una leve presión.

Etapa 2: Hay rojez, hinchazón y endurecimiento de la piel alrededor del área. Algunas veces hay ampollas. Algunas veces hay pérdida de la piel superficial.

- 60 Etapa 3: La piel se vuelve necrótica. Puede haber exposición de la grasa debajo de la piel. La piel puede perderse a través de todas sus capas.

Etapa 4: Hay más pérdida de grasa y más necrosis de la piel hasta el músculo subyacente.

Etapa 5: Pérdida continua de grasa y necrosis del músculo subyacente.

- 65 Etapa 6: La destrucción del hueso empieza con irritación del hueso, erosión de la corteza del hueso que progresa a osteomielitis - infección del hueso. Puede haber sepsis de una extremidad, fractura patológica o infección generalizada del cuerpo, septicemia.

Otra clasificación de úlceras de la piel es la escala de curación de úlceras de presión (PUSH Tool) desarrollada por el Panel Asesor Nacional de Úlceras de Presión (NPUAP) para evaluar la gravedad de úlceras de presión. Se usa como una herramienta fiable rápida para monitorizar el cambio en el estado de las úlceras de presión con el tiempo. Para usarla, la primera etapa es observar y medir la úlcera de presión. Entonces clasificar la úlcera con respecto a (1) área superficial, (2) pus supurante de exudado, y (3) tipo de tejido herido. A la gravedad de la úlcera clasificada se le da una puntuación. Por ejemplo, en el tipo de categoría 3 de tejido herido: puntuación 4 - tejido necrótico (escara): tejido negro, marrón o tostado que se adhiere firmemente al lecho de la herida o bordes de la úlcera y puede ser tanto más firme como más blando que la piel de alrededor; puntuación 3 - esfacelo: tejido amarillo o blanco que se adhiere al lecho de la úlcera en sartas o grumos gruesos, o es mucinoso; puntuación 2 - tejido de granulación: tejido rosa o rojo carnosos con un aspecto granular, húmedo, brillante; puntuación 1 - Tejido epitelial: para úlceras superficiales, nuevo tejido rosa o brillante (piel) que crece desde los bordes o como islas sobre la superficie de la úlcera; y puntuación 0 - cerrado con nuevas superficies: la herida está completamente cubierta con epitelio (piel nueva). Entonces, se registran las sub-puntuaciones para cada una de estas características de úlcera. Finalmente, las sub-puntuaciones se suman para obtener la puntuación total. Cuanto más pequeño sea el total, mejor será la úlcera. Una comparación de puntuaciones totales medidas con el tiempo proporciona una indicación de la mejora o deterioro en la curación de la úlcera de presión. Por tanto, una tendencia gradual hacia puntuación total cada vez más pequeña es una buena indicación de que la úlcera se está curando. PUSH Tool versión 3.0 puede obtenerse en www.npuap.org/push3-0.htm.

La estadificación de NPUAP de úlceras de presión es del siguiente modo:

Etapa 1 - Hay eritema de piel intacta que no blanquea con presión. Puede ser la lesión precursora de la ulceración de la piel.

Etapa 2 - Hay pérdida de piel parcial que implica la epidermis, dermis, o ambas. La úlcera es superficial y se presenta como una abrasión, ampolla, o herida con un centro poco profundo.

Etapa 3 - Ésta es una pérdida de piel de espesor total. Puede implicar daño a o necrosis de tejido subcutáneo que puede extenderse hacia abajo, pero no a través, de la fascia subyacente. La úlcera se presenta como un cráter profundo con o sin socavación de tejidos intactos adyacentes.

Etapa 4 - Aquí hay pérdida de piel de espesor total con amplia destrucción, necrosis de tejido, o daño a músculo, hueso, o estructuras de soporte. Tendones y articulaciones también pueden exponerse o estar implicadas. Puede haber socavación y/o tractos de senos asociados a úlceras en esta etapa.

Una tercera clasificación de úlceras es la clasificación de Wagner para evaluar la gravedad de ulceraciones de pie diabético.

Grado 0 - Piel con cicatrices de úlceras curadas previas, áreas de presión que algunas veces se llama lesión pre-ulcerativa o la presencia de deformidad ósea que aplica presión sobre un punto no protegido.

Grado 1-A - La herida es de naturaleza superficial, con participación de piel de espesor parcial o completo, pero no incluye tendón, cápsula o hueso.

Grado 1-B - Como antes, la herida es de naturaleza superficial, con participación de piel de espesor parcial o completo, pero no incluye tendón, cápsula ni hueso; sin embargo, la herida está infectada. La definición de esta herida implica infección superficial sin participación de estructuras subyacentes. Si la herida muestra signos de purulencia significativa o fluctuación, es obligada una exploración adicional para exponer una clasificación de mayor grado de infección.

Grado 1-C - Como antes pero con compromiso vascular.

Grado 1-D - Como antes pero con isquemia. Debido a que la isquemia es un tipo de compromiso vascular, la distinción entre estos dos grados es frecuentemente difícil de hacer.

Grado 2-A - Penetración a través del tejido subcutáneo exponiendo tendón o ligamento, pero no hueso.

Grado 2-B - Penetración a través de tejidos profundos que incluyen tendón o ligamento e incluso cápsula de articulación, pero no hueso.

Grado 2-C - Como 2B anterior, pero que incluye isquemia

Grado 2-D - Como 2C anterior, pero que incluye infección

Grado 3-A - Una herida que llega al hueso pero no muestra signos de infección local ni infección sistémica.

Grado 3-B - Una herida que llega al hueso y está infectada.

Grado 3-C - Una herida que llega al hueso, está infectada y es isquémica.

Grado 3-D - Una herida que llega al hueso caracterizada por infección activa, tejidos isquémicos y hueso expuesto.

Grado 4 - Gangrena de la parte anterior del pie

Grado 5 - Gangrena del pie entero

La clasificación de la Universidad de Texas de úlcera diabética se muestra a continuación.

	0	I	II	III
A	áreas de presión que a veces se llaman lesión ulcerosa previa	Úlcera superficial no incluyendo tendón, capsula o hueso	Úlcera profunda incluyendo tendón, capsula pero no hueso	Úlcera profunda incluyendo hueso y articulación
B	infección	infección	infección	infección
C	isquemia	isquemia	isquemia	isquemia
D	infección + isquemia	infección + isquemia	infección + isquemia	infección + isquemia

Causas de úlceras de la piel

Las úlceras de la piel pueden resultar directamente o indirectamente de muchas enfermedades, trastornos y traumatismo, y pueden frecuentemente producirse a partir de combinaciones de enfermedades, trastornos y traumatismo. Las causas de las úlceras de la piel pueden ser vascular (venosa, arterial, linfática, vasculitis), neuropática (por ejemplo, diabetes, espina bífida, lepra), metabólica (por ejemplo, diabetes, gota), enfermedad de tejido conjuntivo (por ejemplo, artritis reumatoide, esclerodermia, lupus eritematoso sistémico), enfermedad hematológica (trastornos de los glóbulos rojos (por ejemplo, drepanocitosis); trastornos de los glóbulos blancos (por ejemplo, leucemia); trastornos de plaquetas (por ejemplo, trombocitosis), inmunológica (por ejemplo, enfermedades autoinmunitarias y otros trastornos inflamatorios: artritis reumatoide, esclerodermia, lupus eritematoso sistémico; respuesta inmunitaria aberrante: pioderma gangrenosa), disproteinemias (por ejemplo, crioglobulinemia, amiloidosis), inmunodeficiencia (por ejemplo, VIH, terapia inmunosupresora), neoplásica (por ejemplo, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas, enfermedad metastásica), infecciosa (bacteriana, fúngica, viral), infección parasítica (leishmaniasis cutánea), paniculitis (por ejemplo, necrobiosis lipóidica - una afección, ocasionalmente asociada a diabetes, en la que lesiones atróficas brillantes se desarrollan sobre las piernas), traumática (por ejemplo, úlcera de presión, daño por radiación), iatrogénica (por ejemplo, fármacos/medicación), facticia (por ejemplo, autolesión, "dermatitis artefacta" y enfermedad mental) y enfermedades y trastornos de etiología desconocida (por ejemplo, sarcoidosis - una reticulosis granulomatosa crónica, progresiva, generalizada que implica a casi cualquier órgano o tejido, caracterizada por la presencia en todos los tejidos afectados de tubérculos de células epitelioides sin caseificación) (Grey, J. E., et. al., 2006, BMJ 332: 285-288).

Las úlceras venosas se producen por enfermedad oclusiva vascular o venosa y resultan de circulación sanguínea insuficiente a través de las piernas, haciendo que la sangre se reúna en las venas de las piernas. Entonces, la presión aumenta en las venas y capilares. La elevada presión hace que el fluido se fugue de los vasos sanguíneos en el tejido de alrededor, y se desarrolle hinchazón. Con el tiempo, la hinchazón interfiere con el movimiento del oxígeno y nutrientes de los capilares en los tejidos. Los tejidos son dañados debido a que carecen de oxígeno y nutrientes y debido a que el fluido que se ha fugado aplica presión sobre ellos. Como resultado, pueden formarse úlceras venosas. Las úlceras venosas se desarrollan principalmente en las extremidades inferiores después de que las venas en las piernas hayan sido dañadas. Estas úlceras pueden penetrar profundo en la piel.

Cualquier trastorno que haga que la sangre se reúna en las venas de las piernas puede producir una úlcera venosa. Puede dañarse una vena varicosa o una vena bloqueada por un coágulo de sangre (trombosis venosa profunda), haciendo que la sangre se reúna. Tal daño a las venas de las piernas se llama insuficiencia venosa crónica. Ejemplos incluyen, pero no debe interpretarse que se limitan a, insuficiencia cardíaca congestiva, obesidad, insuficiencia renal, síndrome de anticuerpos anti-fosfolípidos, vasculopatía livedoide, estasia venosa, enfermedad arterial de oclusión de vasos pequeños, crioglobulinemia tipo I o macroglobulinemia de Waldenström, y síndrome de Klippel-Trénaunay-Weber.

Las úlceras venosas son relativamente comunes entre las personas mayores. Las úlceras venosas se infectan fácilmente. Ocasionalmente, si una úlcera venosa persiste durante un largo tiempo, se desarrolla cáncer de piel en el borde. Áreas susceptibles a úlceras venosas son el pie y la pierna y se producen por insuficiencia vascular

subyacente. La piel se rompe o deja de cicatrizar debido a traumatismo repetido. Incluso la presión de la uña puede producir ulceración subungueal. Éstas se observan más frecuentemente en diabéticos que tienen un potencial muy bajo de curación de la lesión.

5 Las vasculitis (plural: vasculitides) es un grupo de enfermedades que se caracterizan por inflamación de la pared de los vasos sanguíneos debido a la migración de leucocitos y daño resultante. Pueden afectarse vasos sanguíneos de todos los tamaños, desde el vaso más largo en el cuerpo (la aorta) hasta los vasos sanguíneos más pequeños en la piel (capilares). El tamaño del vaso sanguíneo afectado varía según el tipo específico de vasculitis. Vasos sanguíneos dañados conducen a tejido isquémico, seguido de necrosis de tejido.

10 Ejemplos de vasculitis que pueden producir úlceras de la piel incluyen granulomatosis de Wegener, poliarteritis nudosa, vasculitis crioglobulinémica (mixta), arteritis de Takayasu y vasculitis leucocitoclástica.

15 Se han observado úlceras crónicas de la piel sin curar en varios cánceres: carcinoma de células basales - úlceras de la pierna (Phillips TJ, et. al. 1991, J Am Acad Dermatol. Jul;25(1 Pt 1):47-9; Conde-Taboada A, et. al. 2006 J Eur Acad Dermatol Venereol. Mar;20(3):359), linfomas - linfoma de linfocitos T angiocéntrico, linfoma de linfocitos T de células grandes anaplásico y micosis fungoide bullosa, cutis leucémico e histiocitosis de células de Langerhans.

20 Infecciones de la piel por diversos patógenos también pueden producir úlceras de la piel. Ejemplos incluyen infección fúngica profunda: infección por *Sporotrichosis*, *Aspergillosis*, *Cryptococcosis*, *Zygomycosis*, *Penicillium marneffe*; virus del herpes simple tipo 2, tuberculosis cutánea y amebiasis cutánea.

25 La leishmaniasis cutánea es úlceras de la piel producidas por la picadura de la mosca de la arena que deposita los parásitos *Leishmania tropica* o *Leishmania major* en el sitio de la picadura. La *Leishmania tropica* se encuentra principalmente en las áreas urbanas mientras que la *Leishmania major* está en áreas desérticas secas.

30 La diabetes mellitus es un trastorno metabólico caracterizado por hiperglucemia (azúcar en sangre alta). La diabetes puede producir muchas complicaciones, de las cuales la lesión nerviosa (neuropatía) (de varios tipos), lesión microvascular y la mala curación frecuentemente contribuyen al desarrollo de úlceras de la piel en las piernas y pie. La planta del pie es especialmente propensa a úlceras de la piel en diabéticos.

35 La elevación crónica del nivel de glucosa en sangre conduce a daño de los vasos sanguíneos. En diabetes, los problemas resultantes se agrupan bajo "enfermedad microvascular" (debida a daño a vasos sanguíneos pequeños) y "enfermedad macrovascular" (debida a daño a las arterias).

La neuropatía diabética, sensación anormal y disminuida, normalmente en una distribución de 'guante y calcetín' que empieza con los pies, pero posiblemente en otros nervios, después frecuentemente los dedos y manos. Cuando se combina con vasos sanguíneos dañados ésta puede conducir a pie diabético.

40 El pie diabético, frecuentemente debido a una combinación de neuropatía y enfermedad arterial, puede producir úlcera de la piel e infección y, en casos graves, necrosis y gangrena. Es la causa más común de amputación en adultos, normalmente de dedos de los pies y o pies, en el mundo desarrollado.

45 La mala curación de heridas, particularmente de los pies, puede conducir a gangrena que puede requerir amputación - la causa más frecuente de amputación no traumática en adultos en el mundo desarrollado. El tratamiento adecuado de la diabetes, además de la elevada énfasis en el control de la tensión arterial y factores de estilo de vida (tales como), puede mejorar el perfil de riesgo de la mayoría de las complicaciones anteriormente mencionadas (Nathan DM, et. al. N Engl J Med 2005;353:2643-53. PMID 16371630)

50 Las úlceras de la piel auto-provocadas pueden producirse en incidencias de enfermedad mental tales como depresión, síndrome de Münchhausen y trastorno facticio (facticioso). Las personas con trastorno facticio experimentan dermatitis artefacta, por la cual las personas se lesionan su propia piel, por cualquier método. Pueden lesionar su piel: rascándosela, co sus uñas o un cuchillo u otro instrumento afilado; quemándola con fuego tal como cigarrillos, cerillas o velas; quemándola con productos químicos cáusticos tales como lejía. Pueden o pueden no ser conscientes de que se causaron el daño a sí mismos, pero normalmente niegan que se hayan ocasionado intencionalmente la lesión.

60 La ulceración de la piel también puede asociarse a ciertos fármacos (úlceras iatrogénicas) tales como ulceración inducida por hidroxurea (la hidroxurea pertenece a un grupo general de fármacos de quimioterapia llamados antimetabolitos), bromoderma (erupción acneiforme o granulomatosa debida a hipersensibilidad a bromuro en medicación anticonvulsiva) y lupus inducido por fármacos. Se usa para tratar leucemia mieloide crónica y trastornos de la sangre tales como anemia de células falciformes),

65 Varios trastornos inflamatorios están asociados a úlceras de la piel. Por ejemplo: enfermedad de Crohn cutánea, necrobiosis lipoídica ulcerativa, pioderma gangrenosa, lupus eritematoso sistémico y morfea ampollosa.

La ulceración de la piel también puede asociarse a lesión externa de tejido (traumatismo) tal como vulvitis de contacto (la vulvitis es la inflamación de los genitales femeninos externos (vulva)), abuso de drogas de inyección que conducen a infección secundaria, loxoscelismo (picadura de una araña reclusa parda), patergia (la inducción de la respuesta inflamatoria después del traumatismo de la piel) como se observa frecuentemente en pioderma gangrenosa y úlceras de presión, por mucho la más médicamente significativo de todas las ulceraciones de la piel relacionadas con el traumatismo. La exposición a alto calor (quemaduras) y frío extremo (congelación) también pueden conducir a ulceración de la piel.

Una úlcera de presión, también conocida como escaras de decúbito o úlceras de decúbito, es un área de la piel que se rompe cuando se permanece en una posición durante mucho tiempo sin cambiar el peso. Esto se produce frecuentemente si se usa una silla de ruedas o se está postrado en la cama, incluso durante un corto periodo de tiempo, por ejemplo, después de cirugía o una lesión. La constante presión contra la piel reduce el riego sanguíneo a esa área, la fricción de una superficie resistente tal como una cama irrita el área con circulación sanguínea reducida, y muere el tejido afectado.

Una úlcera de presión empieza como piel enrojecida, pero progresivamente empeora, formando una ampolla, luego una llaga, y finalmente un cráter. Los sitios más comunes para las úlceras de presión son sobre prominencias óseas, en las que hay menos acolchamiento por músculo y grasa, como el codo, talones, caderas, tobillos, hombros, espalda y la parte posterior de la cabeza.

Los pacientes inmóviles son vulnerables a la formación de escaras por presión cuando que quedan tumbados durante largos periodos de tiempo en la misma posición de decúbito prono. Ejemplos de tales pacientes en riesgo de desarrollar úlceras de la piel incluyen, pero no se limitan a, diabéticos, parapléjicos, cuadripléjicos, los ancianos, individuos con incapacidad de movilidad y/o de coordinación tales como aquellos con defectos neurológicos, por ejemplo, parálisis cerebral y espina bífida, aquellos con enfermedades neuromusculares tales como esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y esclerosis múltiple (EM), aquellos con enfermedad autoinmunitaria tal como esclerodermia, y víctimas de quemaduras.

Tratamiento de enfermedades y trastornos que implican úlceras de la piel

El actual tratamiento de vasculitis se dirige a la inflamación con esteroides (por ejemplo, metilprednisolona, cortisona y ciclofosfamida). También pueden administrarse inmunosupresores tales como ciclofosfamida y azatioprina. Además, se usan inmunosupresores en el tratamiento de enfermedades inflamatorias.

La pentoxifilina es la medicación estándar para úlceras venosas de la piel. En combinación con el tratamiento estándar con medias de compresión, la pentoxifilina oral se usa para mejorar la curación de úlceras venosas de la piel. La pentoxifilina reduce la viscosidad o "pegajosidad" de la sangre, mejorando la circulación de la sangre. La pentoxifilina también reduce la inflamación en el cuerpo, que también puede ayudar a curar úlceras.

El tratamiento de diabetes de tipo 1 usa insulina y para la diabetes de tipo 2 fármaco antidiabético oral o agente hipoglucémico oral. Los fármacos generalmente funcionan reduciendo los niveles de glucosa en sangre.

Las sulfonilureas fueron las primeras medicaciones hipoglucémicas orales ampliamente usadas. Son secretagogos de la insulina, que desencadenan la liberación de insulina por la acción directa sobre el canal KATP de las células beta pancreáticas. Un secretagogo es una sustancia que hace que se secrete otra sustancia. Las sulfonilureas son solo útiles en diabetes de tipo II, y que funcionan estimulando la liberación endógena de insulina. Ejemplos de sulfonilureas incluyen, pero no se limitan a: tolbutamida (Orinase); acetohexamida (Dymelor); tolazamida (Tolinase); clorpropamida (Diabinese); glipizida (Glucotrol); gliburida (Diabeta, Micronase, Glynase); glimepirida (Amaryl); gliclazida (Diamicon).

El análogo de amilina, por ejemplo, pramlintida; inhibidores de dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4) (vildagliptina, sitagliptina); análogos miméticos de incretina GLP, por ejemplo, exendina-4; inhibidores de la alfa-glucosidasa - miglitol (Glyset) y acarbosa (Precose/Glucobay); biguanidas - metformina (Glucophage); meglitinidas - repaglinida (Prandin) y nateglinida (Starlix); ligandos de PPAR α/γ (muraglitazar, tesaglitazar y tiazolidinadionas - rosiglitazona (Avandia), pioglitazona (Actos) y troglitazona (Rezulin)); inhibidores de SGLT (transportador 1 de glucosa dependiente de sodio); e inhibidores de FBPasa (fructosa 1,6-bisfosfatasa) (véase Lebovitz HE. Therapy for Diabetes Mellitus and Related Disorders. 4ª edición. Alexandria: American Diabetes Association, 2004).

Las terapias para carcinoma de células basales incluyen terapia fotodinámica (el tumor se trata con un agente químico fotosensibilizador en una crema (por ejemplo, Metvix) o loción, y se expone a la luz varias horas después. Hasta el 85 % de los carcinomas de células basales superficiales se curan, con excelentes resultados cosméticos, usando crema tópica de imiquimod, crioterapia (congelación) y radioterapia (tratamiento con rayos X).

El tratamiento estándar para la leishmaniasis cutánea es antimonio pentavalente. Otras medicaciones incluyen anfotericina B (Fungizone) (reservado para el fallo del antimonio pentavalente), isetionato de pentamidina (Pentam 300) y paromomicina tópica.

El cuidado y tratamiento de úlceras de presión puede encontrarse en Brillhart B. Rehabil Nurs. 2005; 30(3): 85-91; de Laa EH, et. al., J Clin Nurs. 2005; 14(4): 464 472; y Col L y Nesbitt C. Ostomy Wound Manage. 2004; 50(11): 32-40.

5 Una realización de la invención engloba inhibidores de la actividad y/o la expresión de la proteína LpPLA₂ para su uso en el tratamiento y/o prevención de úlceras de la piel en personas en necesidad de los mismos, que comprende además administrar al sujeto un agente terapéutico adicional seleccionado de terapia antimicrobiana, terapia antiparasítica, terapia antiobesidad, terapia para la diabetes, terapia para enfermedad cardiovascular, terapia para insuficiencia renal, terapia para vasculitis, terapia para insuficiencia venosa, terapia para insuficiencia arterial, terapia para el cáncer, terapia inmunosupresora, terapia para inmunodeficiencia, terapia con esteroides y psicoterapia.

10 Una realización de la invención engloba inhibidores de la actividad y/o la expresión de la proteína Lp-PLA₂ para su uso en el tratamiento y/o prevención de úlceras de presión en personas que están postradas en la cama o silla de ruedas.

15 Una realización de la invención engloba inhibidores de la actividad y/o la expresión de la proteína Lp-PLA₂ para su uso en el tratamiento y/o prevención de úlceras de la piel en personas que están quemadas o congeladas.

Tratamientos de úlceras de la piel

20 El tratamiento de úlceras de la piel incluye, pero no se limita a, medicaciones tales como fármacos antibacterianos, antifúngicos, antiparasíticos y antivirales, agente trombolítico o agentes destructores de coágulos tales como activador tisular del plasminógeno (tPA), el uso de vendas de compresión, sustitutos de piel de bioingeniería (por ejemplo, aloinjertos epidérmicos cultivados - Apligraf), estimulaciones eléctricas, sistemas de administración de fármacos avanzados tales como sistema de administración transdérmica basada en iontoforesis, administración localizada de materiales que promueven la reparación de tejido, tal como factor de crecimiento derivado de plaquetas y autólogo, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (G-M CSF) y mesoglicano, terapia para heridas de presión negativa y ultrasonidos.

25 Una realización de la invención proporciona inhibidores de la actividad y/o la expresión de la proteína Lp-PLA₂ para su uso en un método para tratar úlceras de la piel en un sujeto que tiene una úlcera de la piel, comprendiendo dicho método además administrar al sujeto tratamiento de heridas que incluye, pero no se limita a, medicación antipatógena, agentes trombolíticos, el uso de vendas de compresión, sustitutos de piel de bioingeniería, estimulaciones eléctricas, sistemas de administración de fármacos avanzados, administración localizada de terapia promotora de la reparación de tejido, terapia para heridas de presión negativa y ultrasonidos.

Factores de riesgo para desarrollar úlceras de la piel

30 Una realización de la invención proporciona composiciones para su uso en la prevención de úlcera de la piel en personas en riesgo de desarrollar úlceras de la piel. El hacer un criterio referente a quién está en riesgo de desarrollar úlceras de la piel requiere identificar los factores de riesgo que pueden contribuir a la ulceración de la piel.

35 Como las úlceras de la piel pueden producirse por un gran número de enfermedades, trastornos y traumatismos, y las combinaciones de los mismos, hay varios factores que aumentan el riesgo de desarrollar úlceras de la piel. Estos factores incluyen, pero no se limitan a, tener un episodio previo de úlcera de la piel asociada a una enfermedad o trastorno o traumatismo como se ha desvelado arriba, ser ancianos, incapacidad para mover ciertas partes del cuerpo sin ayuda, tal como estar postrado en la cama o en una silla de ruedas después de lesión medular o cerebral o si se tiene una enfermedad neuromuscular (como esclerosis múltiple), malnutrición (especialmente proteína insuficiente), ausencia de actividad física, uso excesivo de alcohol, tener una afección crónica, tal como diabetes, que previene que áreas del cuerpo reciban la circulación sanguínea apropiada como se ha desvelado arriba; incontinencia urinaria o incontinencia intestinal (humedad próxima a la piel durante largos periodos de tiempo puede producir irritación de la piel que puede conducir a rotura de la piel), piel frágil, retraso mental de afecciones tales como enfermedad de Alzheimer (el paciente puede no ser capaz de prevenir apropiadamente o tratar úlceras de presión), fumador, haber sido diagnosticado con diabetes, hipertensión arterial y/o altos niveles de homocisteína, tener sobrepeso (pesar más del 30 por ciento más del peso ideal), una historia familiar de venas varicosas, especialmente si también se tiene circulación sanguínea inversa en una vena safena, que corre hacia arriba del muslo interior, haber sido diagnosticado con un trastorno de la coagulación de la sangre tal como estado hipercoagulable o trombofilia en la que la sangre tiende a coagularse demasiado, tener una ocupación que requiere estar de pie muchas horas, tener anemia drepanocítica, estar tomando medicación que contiene bromuro tal como bromuro de potasio para terapia anticonvulsiva e insuficiencia renal.

40 Una guía completa para la predicción y prevención de úlceras de presión puede encontrarse en Clinical Practice Guideline Number 3, 1992, AHCPR Pub. No. 92-0047 por la Agency for Health Policy and Research (AHCPR).

45 Aunque tener un factor de riesgo no significa que un sujeto desarrollará úlcera de la piel y así se tratará con un

agente que inhibe la actividad y/o la expresión de la proteína Lp-PLA₂, tener una combinación de factores de riesgo aumentará verdaderamente la probabilidad de que ese sujeto pueda con el tiempo desarrollar al menos una úlcera de la piel en la vida de ese sujeto. Los sujetos con combinaciones de dos o más o tres o más factores de riesgo deben ser considerados por su médico como candidato para el tratamiento y/o la prevención por los métodos desvelados en el presente documento. Por ejemplo, un sujeto que es anciano, diabético y tiene capacidad mental reducida, o un sujeto que es obeso e inmóvil, son cada uno candidatos para el tratamiento como se ha desvelado en el presente documento.

Hay, sin embargo, algunos factores de riesgo que, por sí mismos, son muy buenos indicadores de que las úlceras de la piel se producirán lo más probablemente en el sujeto que tiene ese factor de riesgo respectivo. Éstos se consideran factores de "riesgo alto". Éstos incluyen diabetes, vasculitis, lepra, estar postrados en la cama o en una silla de ruedas, quemadura o congelación, recibir quimioterapia basada en hidroxurea y antecedentes personales de úlceras de la piel relacionadas con enfermedad/ trastorno. Por mucho, los factores de riesgo más significativos son diabetes, vasculitis (enfermedades autoinmunitarias), aterosclerosis, estar postrados en la cama y estar en una silla de ruedas en la que hay una presión constante sobre una parte de la piel. Sujetos con estos factores deben ser considerados por su médico como candidato para el tratamiento y/o la prevención por los presentes métodos desvelados en el presente documento.

Formulaciones de composiciones

Los compuestos, por ejemplo, agentes que inhiben Lp-PLA₂ como se ha desvelado en el presente documento, pueden usarse como un medicamento o usarse para formular una composición farmacéutica con una o más de las utilidades desveladas en el presente documento. Pueden administrarse *in vitro* a células en cultivo, *in vivo* a células en el cuerpo, o *ex vivo* a células fuera de un individuo que pueden después ser devueltas al cuerpo del mismo individuo u otro. Tales células pueden estar desagregadas o proporcionarse como un tejido sólido.

Los compuestos, por ejemplo, agentes que inhiben Lp-PLA₂ como se ha desvelado en el presente documento, pueden usarse para producir un medicamento u otras composiciones farmacéuticas. Se conoce en la técnica el uso de agentes que inhiben Lp-PLA₂ que comprenden además un vehículo farmacéuticamente aceptable y composiciones que comprenden además componentes útiles para administrar la composición a un individuo. La adición de tales vehículos y otros componentes a los agentes como se desvela en el presente documento está perfectamente dentro del nivel de experiencia en esta materia.

Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse como una formulación adaptada para el paso a través de la barrera hematoencefálica o contacto directo con el endotelio. Las composiciones de la invención pueden administrarse como una formulación adaptada para administración sistémica. Las composiciones de la invención pueden administrarse como una formulación adaptada para la administración a órganos específicos, por ejemplo, pero no se limitan a, el hígado, bazo, la médula ósea y la piel.

Alternativamente, las composiciones farmacéuticas pueden añadirse al medio de cultivo de células *ex vivo*. Además del compuesto activo, tales composiciones pueden contener vehículos farmacéuticamente aceptables y otros componentes conocidos por facilitar la administración y/o potenciar la captación (por ejemplo, solución salina, sulfóxido de dimetilo, lípido, polímero, sistemas que se dirigen específicamente a células basadas por afinidad). La composición puede incorporarse en un gel, esponja u otra matriz permeable (por ejemplo, formada como pellas o un disco) y colocarse en proximidad al endotelio para liberación local sostenida. La composición puede administrarse en una dosis única o en múltiples dosis que se administran en momentos diferentes.

Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse por cualquier vía conocida. A modo de ejemplo, la composición puede administrarse por una vía mucosa, pulmonar, tópica, u otra localizada o sistémica (por ejemplo, enteral y parenteral). Las expresiones "administración parenteral" y "administrado parenteralmente", como se usan en el presente documento, significan modos de administración distintos de administración enteral y tópica, normalmente mediante inyección, e incluyen, sin limitación, inyección intravenosa, intramuscular, intrarterial, intratecal, intraventricular, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intrarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, intracerebroespinal e intraesternal, infusión y otras técnicas de inyección o infusión, sin limitación. Las expresiones "administración sistémica", "administrado sistémicamente", "administración periférica" y "administrado periféricamente", como se usan en el presente documento, significan la administración de los agentes como se ha desvelado en el presente documento de forma que entre en el sistema del animal, y, así, esté sometido a metabolismo y otros procesos similares, por ejemplo, administración subcutánea.

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

La expresión "vehículo 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, disolvente o material de encapsulamiento, que participa en llevar o transportar los agentes objeto de un órgano, o porción del cuerpo, a otro órgano, o porción del cuerpo. Cada vehículo debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros componentes de formulación, por ejemplo, el vehículo no disminuye el impacto del agente sobre el tratamiento. En otras palabras, un vehículo es farmacéuticamente inerte.

Elecciones adecuadas en cantidades y momentos precisos de dosis, formulación y vías de administración pueden prepararse con los objetivos de lograr una respuesta favorable en el sujeto con una lesión de la piel o un riesgo de la misma (es decir, eficacia), y evitar la excesiva toxicidad u otro daño de la misma (es decir, seguridad). Por tanto, "eficaz" se refiere a tales elecciones que implican la manipulación rutinaria de condiciones para lograr un efecto deseado.

Un bolo de formulación administrado a un individuo durante un corto tiempo una vez al día es un programa de dosificación conveniente. Alternativamente, la dosis diaria eficaz puede dividirse en múltiples dosis para los fines de administración, por ejemplo, dos a doce dosis al día. Los niveles de dosificación de los principios activos en una composición farmacéutica también pueden variarse de manera que se logre una concentración transitoria o sostenida del compuesto o derivado del mismo en un individuo y para producir la respuesta terapéutica o protección deseada. Pero también está dentro de la experiencia de la materia empezar 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 que inhiben Lp-PLA₂ administrado depende de factores conocidos para un experto en la materia tales como bioactividad y biodisponibilidad del compuesto (por ejemplo, semivida en el cuerpo, estabilidad y metabolismo); propiedades químicas del compuesto (por ejemplo, peso molecular, hidrofobia y solubilidad); vía y programación de la administración, y similares. También se entenderá que el nivel específico de dosis que va a lograrse para cualquier individuo particular puede depender de una variedad de factores, que incluyen edad, sexo, salud, historia médica, peso, combinación con uno o varios de otros fármacos, y gravedad de la enfermedad.

En algunas realizaciones, los agentes que inhiben Lp-PLA₂ como se ha desvelado en el presente documento, pueden combinarse con otro agente, por ejemplo, agente terapéutico para la prevención y/o tratamiento de úlceras de la piel o agentes terapéuticos usados para tratar enfermedades y trastornos que están asociados a úlceras de la piel. Por ejemplo, los agentes incluyen el uso de pentoxifilina (úlceras venosas de la piel) y sulfonilureas (diabetes).

Así, puede ponerse en práctica el tratamiento de combinación con uno o más agentes que inhiben Lp-PLA₂ con uno o varios de otros procedimientos médicos.

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 <http://www.genengnews.com/news/bnitem.aspx?name=6724568>) y fenofibrato (véase <http://www.genengnews.com/news/nitem.aspx?name=14817756&taxid=19>).

La cantidad que se administra a un sujeto es preferentemente una cantidad que no induce efectos tóxicos que sobrepasen las ventajas que resultan de su administración. Otros objetos son para reducir en número, disminuir en gravedad y/o aliviar de otra forma el sufrimiento de los síntomas de la enfermedad en el individuo en comparación con tratamientos de referencia reconocidos.

La producción de compuestos según los presentes reglamentos se regulará para las buenas prácticas de laboratorio (GLP) y buenas prácticas de fabricación (GMP) por las agencias gubernamentales (por ejemplo, U.S. Food and Drug Administration). Ésta requiere el mantenimiento de registros preciso y completo, además de la monitorización de QA/QC. La supervisión de los protocolos de los pacientes por agencias y paneles institucionales también está prevista para garantizar que se obtenga el consentimiento informado; se estudien la seguridad, bioactividad, dosificación apropiada y eficacia de productos en las fases; los resultados sean estadísticamente significativos; y se sigan pautas éticas. Se requiere supervisión similar de protocolos usando modelos animales, además del uso de productos químicos tóxicos, y el cumplimiento de reglamentos.

Pueden variar las dosificaciones, formulaciones, volúmenes de dosificación, pautas y métodos para analizar los resultados que pretenden inhibir la expresión y/o actividad de Lp-PLA₂. Así, las dosificaciones eficaces mínimas y máximas varían dependiendo del método de administración. Puede producirse supresión de los síntomas o gravedad de las lesiones de la piel dentro de un intervalo de dosificación específico, que, sin embargo, varía dependiendo del organismo que recibe la dosificación, la vía de administración, si se administran agentes que inhiben Lp-PLA₂ conjuntamente con otras moléculas co-estimulantes, y la pauta específica de la administración de inhibidor de Lp-PLA₂. Por ejemplo, en general, la administración tópica o nasal requiere una dosificación más pequeña que la administración oral, enteral, rectal o vaginal.

Para formulaciones orales o enterales para su uso con la presente invención, los comprimidos pueden formularse según procedimientos convencionales empleando vehículos sólidos muy conocidos en la técnica. Pueden

prepararse cápsulas empleadas para formulaciones orales que van a usarse con los métodos de la presente invención a partir de material farmacéuticamente aceptable, tal como gelatina o derivados de celulosa. También se contemplan sistemas de administración oral de liberación sostenida y/o recubrimientos entéricos para formas de dosificación administradas por vía oral, tales como aquellos descritos en la patente de EE.UU. n° 4.704.295, "Enteric Film-Coating Compositions", concedida el 3 de noviembre de 1987; la patente de EE.UU. n° 4.556.552, "Enteric Film-Coating Compositions", concedida el 3 de diciembre de 1985; la patente de EE.UU. n° 4.309.404, "Sustained Release Pharmaceutical Compositions", concedida el 5 de enero de 1982; y la patente de EE.UU. n° 4.309.406, "Sustained Release Pharmaceutical Compositions", concedida el 5 de enero de 1982.

Ejemplos de vehículos sólidos incluyen almidón, azúcar, bentonita, sílice y otros vehículos comúnmente usados. Ejemplos no limitantes adicionales de vehículos y diluyentes que pueden usarse en las formulaciones de la presente invención incluyen solución salina, jarabe, dextrosa y agua.

Formulación con recubrimiento entérico

Con respecto a las formulaciones para administrar entidades químicas pequeñas para inhibidores de Lp-PLA₂ de las preferencias de fórmulas (I) - (IV) como se ha desvelado en el presente documento, una realización particularmente útil es una formulación de comprimido que comprende el inhibidor de Lp-PLA con un revestimiento de polímero entérico. Un ejemplo de una preparación tal puede encontrarse en el documento WO2005/021002. El material activo en el núcleo puede estar presente en una forma micronizada o solubilizada. Además de los materiales activos, el núcleo puede contener aditivos convencionales para la materia de los comprimidos. Aditivos apropiados en un comprimido tal puede comprender diluyentes tales como lactosa anhidra, lactosa monohidratada, carbonato cálcico, carbonato de magnesio, fosfato de dicalcio o mezclas de los mismos; aglutinantes tales como celulosa microcristalina, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, polivinilpirrolidona, almidón pregelatinizado o goma arábiga o mezclas de los mismos; disgregantes tales como celulosa microcristalina (que cumple tanto funciones de aglutinante como de disgregante), polivinilpirrolidona reticulada, glicolato sódico de almidón, croscarmelosa sódica o mezclas de los mismos; lubricantes, tales como estearato de magnesio o ácido esteárico, deslizantes o adyuvantes de flujo, tales como sílice coloidal, talco o almidón, y estabilizadores tales como sílice amorfa desecante, agentes colorantes, aromas etc. Preferentemente, el comprimido comprende lactosa como diluyente. Cuando un aglutinante está presente, es preferentemente hidroxipropilmetilcelulosa. Preferentemente, el comprimido comprende estearato de magnesio como lubricante. Preferentemente, el comprimido comprende croscarmelosa sódica como disgregante. Preferentemente, el comprimido comprende celulosa microcristalina.

El diluyente puede estar presente en un intervalo del 10 - 80 % en peso del núcleo. El lubricante puede estar presente en un intervalo del 0,25 - 2 % en peso del núcleo. El disgregante puede estar presente en un intervalo del 1 - 10 % en peso del núcleo. La celulosa microcristalina, si está presente, puede estar presente en un intervalo del 10 - 80 % en peso del núcleo.

El principio activo comprende preferentemente entre el 10 y el 50 % del peso del núcleo, más preferentemente entre el 15 y el 35 % del peso del núcleo (calculado como equivalente de base libre). El núcleo puede contener cualquier nivel de dosificación terapéuticamente adecuado del principio activo, pero preferentemente contiene hasta 150 mg como base libre del principio activo. Particularmente preferentemente, el núcleo contiene 20, 30, 40, 50, 60, 80 o 100 mg como base libre del principio activo. El principio activo puede estar presente como la base libre, o como cualquier sal farmacéuticamente aceptable. Si el principio activo está presente como una sal, el peso se ajusta de forma que el comprimido contenga la cantidad deseada de principio activo, calculada como la base libre de la sal. Preferentemente, el principio activo está presente como una sal de clorhidrato.

El núcleo puede prepararse a partir de una mezcla compactada de sus componentes. Los componentes pueden ser directamente comprimidos, o pueden granularse antes de la compresión. Tales gránulos pueden formarse por un proceso de granulación convencional como se conoce en la técnica. En una realización alternativa, los gránulos pueden ser individualmente recubiertos con un revestimiento entérico, y luego encerrarse en un revestimiento de cápsula estándar.

El núcleo está rodeado por un revestimiento que comprende un polímero entérico. Ejemplos de polímeros entéricos son acetato-ftalato de celulosa, acetato-succinato de celulosa, ftalato de metilcelulosa, ftalato de etilhidroxixelulosa, poli(acetato de vinilo-ftalato), poli(butirato de vinilo-acetato), copolímero de acetato de vinilo-anhídrido maleico, copolímero de estireno-mono-éster maleico, copolímero de acrilato de metilo-ácido metacrílico o copolímero de metacrilato-ácido metacrílico-acrilato de octilo. Éstos pueden usarse tanto solos como en combinación, o junto con otros polímeros distintos de aquellos mencionados anteriormente. El revestimiento también puede incluir sustancias insolubles que ni se descomponen ni se solubilizan en cuerpos vivos, tales como derivados de alquilcelulosa tales como etilcelulosa, 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. El revestimiento también puede incluir almidón y/o dextrina.

Materiales de recubrimiento entérico preferidos son los polímeros entéricos de Eudragit® comercialmente

disponibles tales como Eudragit® L, Eudragit® S y Eudragit® NE usados solos o con un plastificante. Tales recubrimientos normalmente se aplican usando un medio líquido, y la naturaleza del plastificante depende de si el medio es acuoso o no acuoso. Plastificantes para su uso con medio acuoso incluyen propilenglicol, citrato de trietilo, citrato de acetiltriethyl o Citroflex® o Citroflex® A2. Plastificantes no acuosos incluyen estos, y también ftalato de dietilo y de dibutilo y sebacato de dibutilo. Un plastificante preferido es citrato de trietilo. La cantidad de plastificante incluida será evidente para aquellos expertos en la materia.

El revestimiento también puede incluir un agente anti-adhesividad tal como talco, sílice o monoestearato de glicerilo. Preferentemente, el agente anti-adhesividad es monoestearato de glicerilo. Normalmente, el revestimiento puede incluir aproximadamente el 5 - 25 % en peso de plastificante y hasta aproximadamente el 50 % en peso de agente anti-adhesividad, preferentemente el 1-10 % en peso de agente anti-adhesividad.

Si se desea, puede incluirse un tensioactivo para ayudar en la formación de una suspensión acuosa del polímero. Se conocen muchos ejemplos de posibles tensioactivos para el experto en la materia. Ejemplos preferidos de tensioactivos son polisorbato 80, polisorbato 20 o laurilsulfato de sodio. Si está presente, un tensioactivo puede formar el 0,1 - 10 % del revestimiento, preferentemente el 0,2 - 5 %, y particularmente preferentemente el 0,5 - 2 %

En una realización, hay un recubrimiento de sellado incluido entre el núcleo y el recubrimiento entérico. Un recubrimiento de sellado es un material de recubrimiento que puede usarse para proteger el revestimiento entérico del posible ataque químico por cualquier componente alcalino en el núcleo. El recubrimiento entérico también puede proporcionar una superficie más suave, permitiendo así la unión más fácil del revestimiento entérico. Un experto en la materia estaría informado de recubrimientos adecuados. Preferentemente, el recubrimiento de sellado está hecho de un recubrimiento de Opadry, y particularmente preferentemente es Opadry White OY-S-28876.

En una realización, el principio farmacéuticamente activo es 1-(N-(2-(dietilamino)etil)-N-(4-(4-trifluorometilfenil)bencil)aminocarbonilmetil)-2-(4-fluorobencil)tio-5,6-trimetilpirimidin-4-ona, o una sal de la misma.

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

En ese ejemplo, lactosa monohidratada, celulosa microcristalina, el principio activo, la hidroxipropilmetilcelulosa y la mitad de la croscarmelosa sódica se tamizaron en un mezcladora de alto cizallamiento Fielder de 10 litros (podría usarse cualquier mezcladora de alto cizallamiento adecuada) y se mezclaron durante 5 minutos a 300 rpm con las cuchillas apagadas. A continuación, la mezcla se granuló mediante la adición de aproximadamente 750 ml de agua mientras se continuaba mezclando. Los gránulos se secaron en un secadora de lecho fluidizado Glatt 3/5, se tamizaron por Comil en un mezcladora de contenedor Pharmatec de 5 litros y a continuación se mezclaron con cualquier lactosa anhidra dada en la fórmula más el resto de la croscarmelosa sódica durante 5 minutos a 20 rpm. Se tamizó estearato de magnesio en la mezcladora y el proceso de mezcla continuó durante otro 1 minuto a 10 rpm. La mezcla lubricada se comprimió usando una prensa para comprimidos giratoria Riva Piccola provista de punzones convexos normales redondos de 9,5 mm (podría usarse cualquier prensa para comprimidos adecuada). El recubrimiento de sellado, y posteriormente el recubrimiento entérico, se aplican pulverizando una suspensión acuosa de los componentes de recubrimiento en una recubridora Manesty 10 usando parámetros para el proceso de recubrimiento como se recomienda por los fabricantes de los polímeros de recubrimiento (de nuevo, podría usarse cualquier recubridora adecuada).

Pueden prepararse otras preparaciones de recubrimiento entérico de este tipo por un experto en la materia, usando estos materiales o sus equivalentes.

Administración tópica

La presente invención puede usarse en la administración tópica para úlceras de la piel. Tales composiciones incluyen disoluciones, suspensiones, lociones, geles, cremas, pomadas, emulsiones, parches dérmicos, etc. Todas estas formas de dosificación, junto con los métodos para su preparación, son muy conocidos en la técnica farmacéutica y cosmética. HARRY'S COSMETICOLOGY (Chemical Publishing, 7th ed. 1982); REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Publishing Co., 18th ed. 1990). Normalmente, tales formulaciones tópicas contienen el principio activo en un intervalo de concentración de 0,001 a 10 mg/ml, en mezcla con vehículos adecuados. Otros componentes deseables incluyen conservantes, co-disolventes, agentes formadores de viscosidad, vehículos, etc. El propio vehículo, o un componente disuelto en el vehículo, puede tener propiedades paliativas o terapéuticas por sí mismo, que incluyen humectantes, limpiadoras, promotoras de la cicatrización o antiinflamatorias. Los inhibidores de Lp-PLA₂ del método de la presente solicitud pueden combinarse con cantidades terapéuticamente eficaces de antiinflamatorios tales como corticosteroides, fungicidas, antibióticos, hidratantes o compuestos promotores de la cicatrización tales como factor de crecimiento derivado de plaquetas y autólogo, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (CSF G-M) y mesoglicano.

Los potenciadores de la penetración pueden ser, por ejemplo, agentes tensioactivos; ciertos disolventes orgánicos,

tales como sulfóxido de dimetilo y otros sulfóxidos, dimetil-acetamida y pirrolidona; ciertas amidas de aminas heterocíclicas, glicoles (por ejemplo, propilenglicol); carbonato de propileno; ácido oleico; alquilaminas y derivados; diversos agentes tensioactivos catiónicos, aniónicos, no iónicos y anfóteros; y similares.

5 Bases de pomada adecuadas contienen, por ejemplo, vaselina, parafina, polietileno, triglicérido hidrogenado natural o sintético, polietilenglicol, macrogoles, carboceras, celulosa y sus derivados, óxido de sílice de alta dispersión, bentonita, almidones, amilopectina y sus derivados, alginato, tragacanto, ácido poliacrílico, poli(alcoholes vinílicos) y/o poliorilvinilpirrolidona. Emulsionantes adecuados son, por ejemplo, alcohol cetilestearílico, alcohol de éster cetílico, laurilsulfato de sodio, cetilsulfato de sodio, estearilsulfato de sodio, éster de sorbitano, polisorbato y éter de alcohol de polioxietilenglicérido. Ejemplos de agentes estabilizantes adecuados son etanol, isopropanol, ácido sórbico, parabeno (ácido 4-hidroxibenzoico), éster de parabeno (éster del ácido 4-hidroxibenzoico), metilparabeno, propilparabeno, hexaclorofeno, bromuro de benzalconio, cloruro de cetilpiridinio y ácido ascórbico. Facilitadores adecuados (también se incluyen potenciadores de la penetración, aceleradores de la absorción y similares) son, por ejemplo, miristato de isopropilo, sulfóxido de dimetilo, 2-pirrolidona, 1-dodecilazacicloheptan-2-ona, 1,2-propilenglicol, ácido oleico, laurilsulfato de sodio, urea, ácido salicílico, hialuronidasa, alcohol oleico y etilenglicol.

La pauta de dosificación para los principios activos utilizados en la invención depende de la enfermedad o afección que va a tratarse, y se determina por el peso corporal y edad del paciente, y la afección individual del paciente, además de la técnica aplicable y del estado de la mejor técnica.

La administración tópica de una cantidad farmacológicamente eficaz puede utilizar sistemas de administración transdérmica muy conocidos en la técnica. La preparación de sistemas de administración transdérmica se describen en las patentes de EE.UU. N° 4626539, 4.405.616, 4.416.886, 4655766, y Stanley Scheindlin, Molecular Interventions 4:308-312, (2004).

También pueden utilizarse sistemas de administración por iontoforesis con sistemas de administración transdérmica por un experto en la materia. Un ejemplo de tal aplicación se encuentra en Kazuhiro A, et. al., "Iontophoresis of insulin using a device with microneedles". Int J Pharm Fed World Cong. 2002:62:27.

30 Eficacia del tratamiento:

El término "tratamiento", con respecto al tratamiento de úlceras de la piel, se refiere al control y erradicación de infección en la llaga de forma que la llaga se limpie (ausencia de pus). También se refiere a la curación gradual de la llaga como se estima por el encogimiento en el tamaño de la llaga y la abertura que eventualmente se cierra por completo. También incluye reducción en la inflamación localizada, dolor, dolor al palpar y rojez en el área que rodea la úlcera. Tratamiento también significa que la úlcera no se está agrandando con el tiempo.

También se consideran tratamiento los métodos profilácticos (por ejemplo, prevención o reducción de la incidencia de reaparición).

La eficacia del tratamiento puede monitorizarse usando una cualquiera de las escalas estándar descritas en el presente documento, u otro estándar clínicamente aceptado para la medición de la gravedad de úlceras de la piel. Así, pueden usarse cada una de las escalas de clasificación del Manual Merck (Etapas 1-6), PUSH Tool y de clasificación de NPUAP, y/o de clasificación de Wagner. El tratamiento se considera generalmente "eficaz" si se logra una mejora de al menos una etapa o nivel de clasificación tras el tratamiento con un inhibidor de Lp-PLA₂. Alternativamente, o además, una reducción en el tamaño (área y/o profundidad) de una lesión de la piel de al menos el 25 % tras el tratamiento se considera tratamiento "eficaz".

La eficacia de la prevención se monitoriza evaluando la piel del sujeto en riesgo de desarrollar una lesión de la piel tras el comienzo del tratamiento con un inhibidor de Lp-PLA₂. La ausencia de lesiones de la piel en un individuo en riesgo se considera un signo de prevención "eficaz". Similarmente, si un individuo tiene una historia de lesiones de la piel, la ausencia de nuevas lesiones, o incluso una reducción, por ejemplo, del 50 % o más, en la frecuencia o gravedad de cualquier nueva lesión, con respecto a tal frecuencia o gravedad antes del tratamiento, es indicativa de prevención "eficaz" de úlceras de la piel por los métodos descritos en el presente documento.

Debe entenderse que la presente invención no se limita a la metodología, protocolos y reactivos particulares, etc., descritos en el presente documento y como tal puede variar. La terminología usada en el presente documento es con el fin de describir realizaciones particulares solo, y no pretende limitar el alcance de la presente invención, que se define únicamente por las reivindicaciones.

Aparte de en los ejemplos de operación, o donde se indique de otro modo, todos los números que expresan cantidades de componentes o condiciones de reacción usadas en el presente documento deben entenderse como modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". El término "aproximadamente", cuando se usa a propósito de los porcentajes, puede significar ± 1 %.

65 EJEMPLOS

Los ejemplos presentados en el presente documento se refieren a los métodos y composiciones para la prevención y/o tratamiento de úlceras de la piel, por ejemplo, pero no se limitan a, úlceras diabéticas de la piel por inhibición de Lp-PLA₂. Los siguientes ejemplos no pretenden limitar el alcance de las reivindicaciones a la invención, sino que más bien están previstos para ser a modo de ejemplo de ciertas realizaciones. Cualquier variación que se produzca para el experto, que entra dentro del alcance de las reivindicaciones, pretende entrar dentro del alcance de la presente invención.

Modelo animal: Se desarrolló un modelo de cerdo hipercolesterolémico diabético/diabético (DM/HC) que imita la diabetes tipo humana y la aterosclerosis tipo humana. Cerdos de granja que pesaban 25-30 kg y de -4 meses de edad se hicieron diabéticos con una única inyección intravenosa de 125 mg/kg de estreptozotocina (Sicor Pharmaceuticals, Irvine, CA). Después de estabilizarse durante 1-2 semanas, los animales con niveles elevados de glucosa en plasma (>150 mg/dl) se alimentaron con dieta aterogénica (alta en grasa) como se muestra en la Tabla 1 (Animal Specialties, Quakertown, PA) para lograr un nivel de colesterol de aproximadamente 250-800 mg/dl. El mantenimiento del nivel de colesterol se determinó por el método como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 1. Dieta para la dieta del 2,0 % de colesterol, los componentes son:

Componente	Peso/Peso %
Purina* comida productor porcino	47.5 %
Manteca de cerdo	25.0%
Caseina	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, Checkerboard Square, St. Louis, Missouri, 63164, USA. Estos alimentos fueron preparados por Animal Specialties and Provisions, LLC, Quakertown, PA USA.	

Para la dieta del 0,5 % de colesterol, los componentes son similares con la excepción de 0,5 % de colesterol y 20 % de manteca. Los animales fueron cerdos Yorkshire que fueron machos castrados a la edad de 3-5 y se obtuvieron de Archer Farms, Darlington, MD. Estos piensos se prepararon por Animal Specialties and Provisions, LLC, Quakertown, PA, EE.UU.

En los días 1-2, los animales se alimentaron con pienso normal, seguido por en los días 3-14 los animales se alimentaron con una dieta del 0,5 % de colesterol, 2 % de manteca, y en el día 14 se midieron los niveles de colesterol y la dieta se ajustó por consiguiente para aumentar al 2 % de colesterol, 10 % de manteca si colesterol es <300 mg/dl. Tras la inducción de DM/HC, se midió el colesterol hasta que los niveles de colesterol fueron estables entre 300 y 800 mg/dl, y tras la estabilización del colesterol, se midió el colesterol mensualmente. Si los niveles de colesterol fueron inestables tras la fase de estabilización inicial, la dieta del animal se devolvió al programa de medición de dos semanas inicial. Se determinaron los niveles de colesterol mensuales, que incluyen niveles de colesterol total, LDL, HDL, VLDL y triglicéridos. El ajuste de la dieta del animal para un nivel de colesterol estable se determinó según las ideas generales mostradas en la Tabla 2.

Tabla 2. Colesterol y ajuste de la dieta.

	Nivel colesterol	Ajuste de la dieta	Siguiente medición	Nivel colesterol	Ajuste de la dieta	Siguiente medición de colesterol
5	<250 mg/dl	Cambiar a dieta 25% manteca de cerdo.	2 semanas.	<300 mg/dl	Continuar dieta 25% manteca de cerdo.	2 semanas
10				300-800 mg/dl	Cambiar a dieta 75% manteca de cerdo (25% manteca de cerdo): 25% normal	2 semanas
15				>800 mg/dl	Cambiar a dieta 100% 10% manteca de cerdo	2 semanas
20				>1000 mg/dl	Cambiar a dieta de mezcla del 10% 50:50 de manteca de cerdo	2 semanas
				>1500 mg/dl	Cambiar a dieta normal	2 semanas*
25						
30	300-800 mg/dl	Sin cambios. Dieta 10% manteca de cerdo.	2 semanas	<300 mg/dl	Cambiar a dieta 25% manteca de cerdo.	2 semanas
				300-800 mg/dl	Sin cambios	Calendario normal
35				>800 mg/dl	Cambiar a mezcla 50:50 con 10% manteca de cerdo	2 semanas
40				>1000 mg/dl	Cambiar a mezcla 25:75 con 10% manteca de cerdo	2 semanas
				>1500 mg/dl	Comida normal	2 semanas
45						
50	800-1000 mg/dl	Cambiar a dieta 50:50 mezcla de 10% manteca de cerdo y comida normal.	2 semanas	< 300 mg/dl	Cambio a dieta 25:75 mezcla con 10% manteca de cerdo.	2 semanas
55				300-800 mg/dl	Sin cambios es dieta (50:50) 10% manteca de cerdo	2 semanas
				>800 mg/dl	Cambiar a 25:75 mezcla (10% manteca de cerdo)	2 semanas
60				>1000 mg/dl	Cambiar a 25:75 mezcla (10% manteca de cerdo)	2 semanas
				>1500 mg/dl	Comida normal	2 semanas*
65						

	Nivel colesterol	Ajuste de la dieta	Siguiente medición	Nivel colesterol	Ajuste de la dieta	Siguiente medición de colesterol
5						
10	>1000 mg/dl	Dieta 25:75 mezcla de 10% manteca de cerdo y comida normal.	2 semanas	< 300 mg/dl	Cambiar a dieta mezcla 50:50 de 10% manteca de cerdo y comida normal.	2 semanas
15				300-800 mg/dl	Sin cambios en dieta 25:75 mezcla de 10% manteca de cerdo y comida normal.	2 semanas
20				>800 mg/dl	Sin cambios en dieta	2 semanas
				>1000 mg/dl	Comida normal	2 semanas*
25				>1500 mg/dl	Comida normal	2 semanas*
30	>1500 mg/dl	Dieta comida normal.	2 semanas	< 300 mg/dl	Cambiar a dieta 100% de 10% manteca de cerdo.	2 semanas
35				300-800 mg/dl	Cambiar a dieta mezcla 50:50 de 10% manteca de cerdo y comida normal.	2 semanas
40				>800 mg/dl	Comida normal	2 semanas*
				>1000 mg/dl	Comida normal	2 semanas*
				>1500 mg/dl	Comida normal	2 semanas*

Un mes después de la estabilización del colesterol a 250-800 mg/dl, los animales se aleatorizaron en dos grupos experimentales, grupo DM/HC (hiperglucemia y hipercolesterolemia) sin tratamiento y grupo de tratamiento (10 mg/kg/día de SB-480848, también denominada 1-(N-(2-(dietilamino)etil)-N-(4-(4-trifluorometilfenil)bencil)-aminocarbonilmetil)-2-(4-fluorobencil)tio-5,6-trimetilpirimidin-4-ona). Los animales se dispusieron entonces en dos salas separadas con animales de control en una sala y animales tratados en la otra sala con el fin de garantizar que no se encontrara fármaco en los animales de control. Los animales se inspeccionaron visualmente dos veces al día, estando las inspecciones visuales separadas entre 8-10 horas, para absceso de la piel, especialmente en la pata y pie. Para considerar un absceso, el tamaño mínimo del absceso fue 1 mm con rojez en el área de alrededor. Cuando se detectaron abscesos, se aplicó tratamiento. El tratamiento comprende evaluar el tamaño y profundidad del absceso, drenar y limpiar el absceso de tejido muerto y células, lavar con betadine, secar y vendar con apósito estéril, y pauta oral de antibióticos. El tratamiento se aplicó diariamente hasta que la infección en la llaga se despejó (ausencia de pus) y la llaga se curó por encogimiento en el tamaño y la abertura se cerró completamente. Se llevaron a cabo cultivos del absceso para determinar el patógeno responsable de la infección. Los animales siguieron en el estudio durante los 6 meses posteriores y se sacrificaron al final de los 6 meses, y se recogieron los tejidos inmediatamente. El protocolo animal ha sido autorizado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Pensilvania.

Se evaluaron dos grupos diabéticos/hipercolesterolémicos: 1. Grupo DM/HC y 2. animales DM/HC que recibieron inhibidores de Lp-PLA₂. Los experimentos incluyeron: el grupo de control (grupo DM/HC - 21 cerdos) y el grupo experimental (animales DM/HC que recibieron inhibidores de Lp-PLA₂ - 22 cerdos). Además, se mantuvieron niveles de colesterol en sangre entre 300 y 800 mg/dl en animales experimentales, habiendo sido determinado que este intervalo proporcionaba un mejor modelo de prueba. Se monitorizaron niveles de colesterol en sangre en todos los animales cada dos meses, como se muestra en la Tabla 4, y se hicieron ajustes al contenido de grasa del pienso en consecuencia, como se muestra en la Tabla 2. El porcentaje de colesterol y de manteca estuvieron en el intervalo

del 0,5-2 % y 10-25 %, respectivamente, y todos los animales recibieron pienso que contenía concentración de colesterol y de manteca dentro de ese intervalo. La línea de tiempo del absceso de la pata identificado y tratado en los animales DM/HC durante el periodo experimental de 6 meses se muestra en la Figura 1. El resumen de la aparición de abscesos de la pata se encuentra en la Tabla 4.

El número de animales, seleccionado para justificar el requisito mínimo para validez estadística, fueron 2 grupos de animales por experimento del siguiente modo: 1. Grupo de control (n=21); Diabéticos y hiperlipidémicos; 2. Grupo experimental (n=22) Diabéticos, hiperlipidémicos que recibieron 10 mg/kg de inhibidor de Lp-PLA₂, como se muestra en la Tabla 3.

Cerdos de granja domésticos, cerdos Yorkshire, que oscilan en peso entre 25-35 kg, se compraron de una granja local y se dispusieron en alojamiento interior bajo el cuidado de un veterinario. Se castraron 3-5 días antes de la fecha de inicio del estudio. Los cerdos de prueba se hicieron diabéticos infundiéndoles una dosis de estreptozocina (125 mg/kg) IV en un periodo de 30 min. Si los animales no se volvieron diabéticos se administró una segunda dosis de (50 mg/kg). Para evitar la posible aparición de hipoglucemia inicial, se añadieron 20 g de polvo de glucosa al pienso para los 2 primeros. Se midió la glucosa en sangre usando un glucosímetro cada día antes de alimentar durante los primeros 14 días y luego una vez a la semana.

Los animales de prueba se alojaron por separado de animales de control para evitar la transferencia entre animales de fármaco debido a colcofagia. Todos los animales se alimentaron con una dieta aterogénica dos veces al día con acceso libre a agua. La dieta hecha a medida contuvo 0,5 y 2 % de colesterol y 10 y 25 % de manteca, cuyos componentes se muestran en la Tabla 1.

Tabla 3. Programa de animales y procedimientos (divididos en 2 grupos):

	Número de Animal	Línea de tiempo
Grupo 1: DM/HC	N=21	7 meses
Grupo 2: DM/HC	N=22	7 meses
recibiendo inhibidores LP-PLA ₂		
Total	N=43	7 meses

Tabla 4. Resumen de la aparición de abscesos

	Presente Absceso	Absceso recurrente	Absceso crónico
Grupo de control	6/21 (29%)	2/21 (10%)	1/21 (5%)
Grupo tratado	2/22 (9%)	0/22 (0%)	0/22 (0%)

La dosificación diaria empezó en el día 29, momento en el que a cada animal de prueba se le administró una dosis diaria de 10 mg/kg de SB-480848 (administrada como equivalente de bolo en alimento para perro).

Los cultivos del absceso mostraron que *Staphylococcus* eran los patógenos predominantes que causaban la infección. Este patógeno también es la bacteria más común aislada en infecciones diabéticas humanas.

El modelo de cerdo DM/HC era un modelo ideal para estudiar el efecto de un inhibidor de Lp-PLA₂ sobre el desarrollo de abscesos, formación, tratamiento y prevención en la piel. Esto es debido a que estos cerdos comparten fenotípicamente muchas similitudes con pacientes diabéticos humanos de alto riesgo, tales como la tendencia a desarrollar úlceras de pie diabético o absceso.

De los 22 cerdos DM/HC tratados con el inhibidor de Lp-PLA₂, solo dos cerdos, cerdos n° 948 y n° 963, tuvieron abscesos visibles sobre su pie. Cada cerdo tuvo un único absceso. Estos cerdos desarrollaron abscesos antes del inicio del tratamiento con el inhibidor de Lp-PLA₂ (Figura 1). Los abscesos se trataron y se curaron dentro del tiempo promedio de 1-2 semanas. No se desarrolló absceso adicional después del inicio de la dosis única diaria de tratamiento de inhibidor. Para los 20 cerdos restantes tratados con el inhibidor de Lp-PLA₂, ninguno desarrolló ningún absceso durante el periodo de tratamiento de 6 meses.

De los 21 cerdos DM/HC no tratados con el inhibidor de Lp-PLA₂ (grupo de control), 6 cerdos desarrollaron abscesos: cerdos n° 975, n° 1024, n° 949, n° 947, n° 1007 y n° 15. Todos estos cerdos desarrollaron abscesos, teniendo dos cerdos desarrollo de abscesos recurrente (se desarrolló un nuevo absceso después de la curación del absceso anterior) y teniendo un cerdo una ulceración crónica que duró durante > 2 meses (abscesos que dejaron de curarse a pesar del cuidado agresivo de la herida).

Aunque no se desea ceñirse a teoría alguna, se propone que la inhibición de la enzima Lp-PLA₂ redujo la inflamación sistémica, produciendo un riesgo reducido de infección de la piel.

5 Conjuntamente, los datos indican que inhibir la enzima Lp-PLA₂ puede ser eficaz en prevenir la formación de abscesos, eficaz en prevenir la formación de abscesos recurrentes, y también eficaz en prevenir el desarrollo de abscesos crónicos en pacientes diabéticos.

10 Además, durante el periodo de estudio, se observó que los animales que se administraron con el inhibidor de Lp-PLA₂ fueron más sensibles a estímulos externos, demostraron elevada actividad en la jaula y tendieron a responder más despiertos a la alimentación y manipulación en comparación con los animales de control. Por tanto, a pesar de niveles de glucosa y colesterol en suero similares, los animales tratados con el inhibidor de Lp-PLA₂ demostraron un aumento en el peso en comparación con los animales de control (62,5 kg frente a 50,9 kg para animales de control) desde un nivel inicial de 26,9 kg y 30,3 kg de peso, respectivamente. El peso en los animales administrados con el inhibidor de Lp-PLA₂ es una reflexión directa de su bienestar general, en tanto que animales más enfermos (es decir, los animales de control) no comen. Se observó que la inhibición de la inflamación por la inhibición de Lp-PLA₂ produce mayor bienestar y salud en el marco de la inflamación sistémica.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Reivindicaciones

- 5 1. Una composición farmacéutica que comprende un agente seleccionado de 1-(N-(2-(dietilamino)etil)-N-(4-(4-trifluorometilfenil)bencil)-aminocarbonilmetil)-2-(4-fluorobencil)tio-5,6-trimetilpirimidin-4-ona, N-(2-(dietilamino)etil)-2-[2-(2-(2,3-difluorofenil)etil)-4-oxo-4,5,6,7-tetrahidro-ciclopentapirimidin-1-il]-N-(4'-trifluorometil-bifenil-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 o 2-[4-({[2-[2-(2,3-difluorofenil)etil]-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-1(4H)-il]acetil}{[4'-(trifluorometil)-4-bifenilil]metil}amino)-1-piperidinil]-2-metilpropanoato de metilo, o una sal farmacéuticamente aceptable o éster de dicho agente, para su uso en un método para tratar y/o prevenir úlceras de la piel en un sujeto, que comprende determinar si dicho sujeto tiene o está en riesgo de tener una úlcera de la piel, y administrar la composición farmacéutica al sujeto que tiene una úlcera de la piel o en riesgo de desarrollar una úlcera de la piel.
- 15 2. La composición farmacéutica para su uso en el método para tratar y/o prevenir úlceras de la piel en un sujeto según la reivindicación 1, en la que el sujeto es un mamífero.
3. La composición farmacéutica para su uso en el método para tratar y/o prevenir úlceras de la piel en un sujeto según la reivindicación 2, en la que el mamífero es un ser humano.
- 20 4. La composición farmacéutica para su uso en el método para tratar y/o prevenir úlceras de la piel en un sujeto según la reivindicación 1, en la que los factores de riesgo están seleccionados de un grupo que consiste en: tener un episodio previo de úlcera de la piel; tener diabetes; estar postrado en silla de ruedas o confinado en la cama; y padecer vasculitis.
- 25 5. La composición farmacéutica para su uso en el método para tratar y/o prevenir úlceras de la piel en un sujeto según la reivindicación 1, que comprende además administrar al sujeto un agente terapéutico adicional.
- 30 6. La composición farmacéutica para su uso en el método para tratar y/o prevenir úlceras de la piel en un sujeto según la reivindicación 5, en la que dicho agente terapéutico adicional está seleccionado del grupo que consiste en terapia antimicrobiana, terapia antiparasítica, terapia antiobesidad, terapia para diabetes, terapia para enfermedad cardiovascular, terapia para insuficiencia renal, terapia para vasculitis, terapia para insuficiencia venosa, terapia para insuficiencia arterial, terapia para el cáncer, terapia inmunosupresora, terapia de inmunodeficiencia, terapia con esteroides y terapia para quemaduras.
- 35 7. La composición farmacéutica para su uso en el método para tratar y/o prevenir úlceras de la piel en un sujeto según la reivindicación 1, que comprende además administrar al sujeto el tratamiento de cuidado de heridas estándar.
- 40 8. La composición farmacéutica para su uso en el método para tratar y/o prevenir úlceras de la piel en un sujeto según la reivindicación 1, que comprende además administrar al sujeto sustitutos de piel de bioingeniería.
- 45 9. La composición farmacéutica para su uso en el método para tratar y/o prevenir úlceras de la piel en un sujeto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en la que el agente es 1-(N-(2-(dietilamino)etil)-N-(4-(4-trifluorometilfenil)bencil)-aminocarbonilmetil)-2-(4-fluorobencil)tio-5,6-trimetilpirimidin-4-ona, o una sal o éster farmacéuticamente aceptable de dicho agente.

50

55

60

65

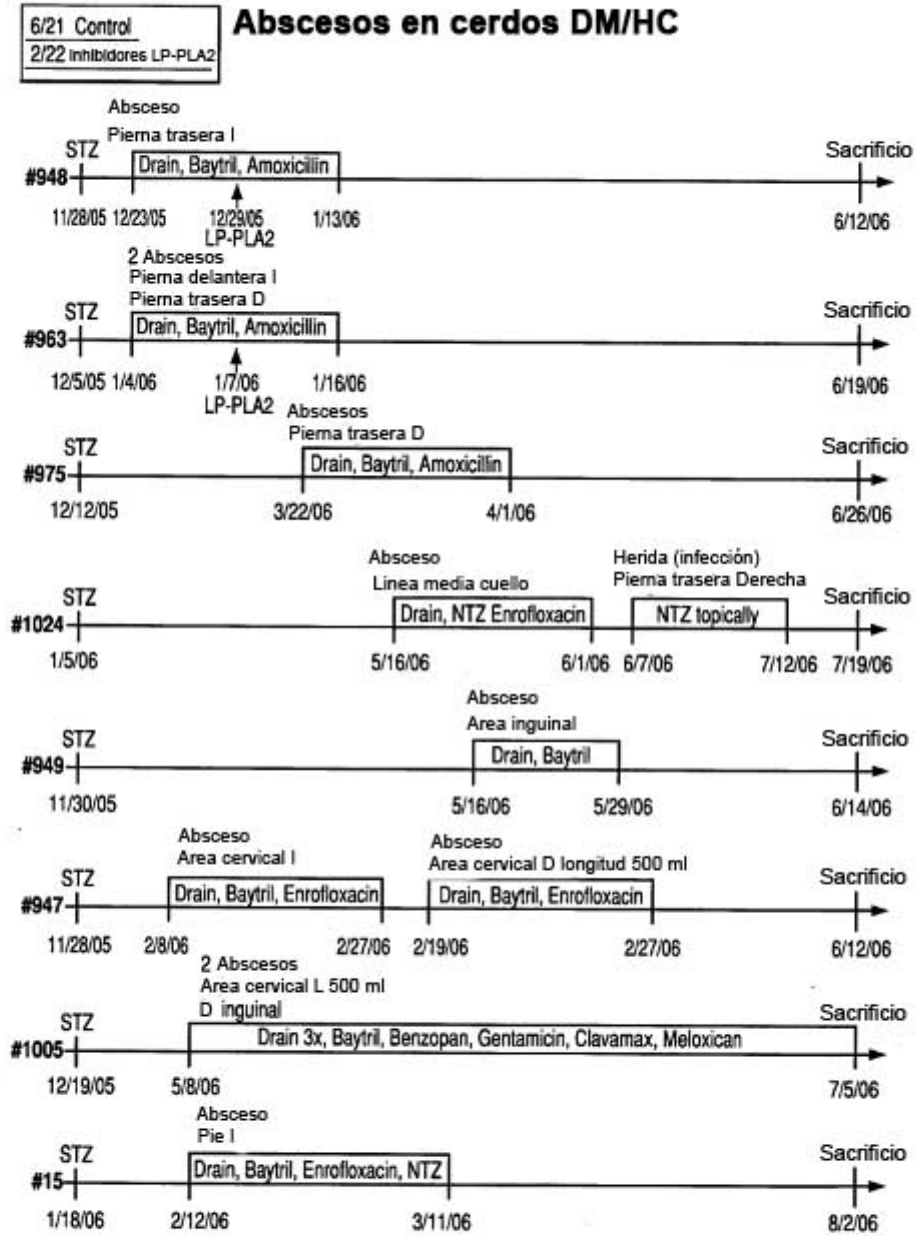


FIG. 1