

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 571 452**

51 Int. Cl.:

C07C 233/25 (2006.01)

A61K 31/167 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.01.2013** **E 13701305 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.04.2016** **EP 2802557**

54 Título: **Compuesto antagonista de leucotrieno B₄**

30 Prioridad:

10.01.2012 US 201261584975 P

12.01.2012 US 201261585799 P

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

25.05.2016

73 Titular/es:

ELI LILLY AND COMPANY (100.0%)

**Lilly Corporate Center
Indianapolis, IN 46285, US**

72 Inventor/es:

STACK, DOUGLAS RICHARD

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 571 452 T3

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

DESCRIPCIÓN

Compuesto antagonista de leucotrieno B₄

5 El leucotrieno B₄ (LTB₄) es un mediador lipídico proinflamatorio eicosanoide generado por una ruta corriente abajo de las enzimas 5-lipoxigenasa y leucotrieno A₄ hidrolasa. LTB₄ activa múltiples subgrupos de leucocitos lo que conduce al reclutamiento celular, producción de especies de oxígeno reactivo, e inducción de la expresión génica. Las señales de LTB₄ principalmente a través de su receptor acoplado a la proteína G de alta afinidad, BLT₁, y, en un menor grado, su receptor BLT₂ de baja afinidad. El receptor BLT₁ es altamente expresado en subgrupos específicos de leucocitos

10 sanguíneos periféricos en circulación, así como también en células endoteliales que no incluyen leucocitos y células del músculo liso. El LTB₄ está involucrado en la patología vascular de varias afecciones inflamatorias que incluyen aneurisma aórtico abdominal (AAA) y aterosclerosis.

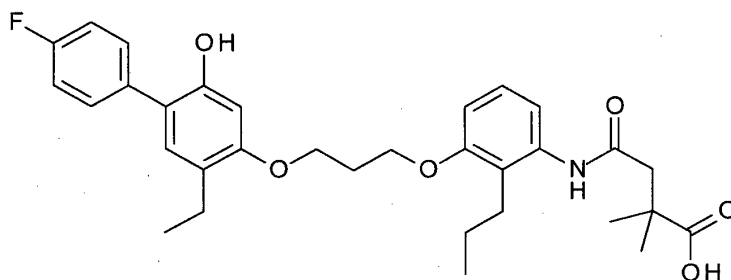
15 Un trastorno degenerativo, AAA está caracterizado por el progreso continuo de la inflamación de la pared aórtica, producción local no controlada de proteasas destructivas, destrucción de proteínas estructurales y agotamiento de las células del músculo liso medial. La fase temprana o aguda comienza con el reclutamiento de células inflamatorias. La lesión se produce cuando el oxígeno reactivo local, los leucotrienos, las quimiocinas y los productos de degradación de matriz actúan en conjunto para activar varios sistemas de proteasa. La matriz extracelular de la aorta abdominal también puede ser debilitada por el exceso de degradación que conduce a una condición conocida como AAA.

20 El papel de la deposición lipídica en la formación de la placa aterosclerótica en la íntima de las arterias está bien establecido. Otro factor principal en la aterogénesis es el reclutamiento de células inflamatorias hacia las lesiones de la íntima. Las placas que tienen tanto un contenido celular inflamatorio como lipídico alto son vulnerables a eventos de ruptura y eventos posteriores que incluyen infarto de miocardio e isquemia del cerebelo.

25 Actualmente, el AAA es la décima causa conducente a la muerte en hombres mayores de 55 años de edad. No existe tratamiento farmacéutico aprobado conocido indicado para el AAA. También, a pesar de la disponibilidad de tratamientos farmacéuticos que se relacionan con altos niveles de colesterol y alta presión sanguínea, la aterosclerosis permanece como un área que requiere más compromiso médico. Además, a pesar de la promesa de antagonistas del leucotrieno tales como aquellos en la patente de los Estados Unidos No. 5.462.954 y el documento WO 98/42346, no se han aprobado antagonistas de LTB₄ para indicaciones inflamatorias. Los compuestos antagonistas del LTB₄ han demostrado que también son ligandos de receptores activados por el proliferador de peroxisoma (PPAR) que se cree que limita su desarrollo como agentes antiinflamatorios. El antagonismo de LTB₄, sin enlazamiento significativo de PPAR, proporciona una opción para atender las necesidades médicas para el tratamiento de AAA, aterosclerosis, o

30 ambos.

La presente invención proporciona un compuesto de Fórmula (I):



40 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. El compuesto de fórmula (I) se llama, ácido 4-[[3-[3-[2-Étil-4-(4-fluorofenil)-5-hidroxi-fenoxi]propoxi]-2-propil-fenil]amino]-2,2-dimetil-4-oxo-butanoico de acuerdo con la nomenclatura de la IUPAC en Symyx® Draw versión 3.2.NET.

45 Un segundo aspecto de la presente invención proporciona una sal sódica de un compuesto de Fórmula 1 el cual es 4-[[3-[3-[2-etil-4-(4-fluorofenil)-5-hidroxi-fenoxi]propoxi]-2-propil-fenil]amino]-2,2-dimetil-4-oxo-butanoato de sodio.

Un tercer aspecto de la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un portador farmacéuticamente aceptable.

50 Un cuarto aspecto de la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende 4-[[3-[3-[2-etil-4-(4-fluorofenil)-5-hidroxi-fenoxi]propoxi]-2-propil-fenil]aminol-2,2-dimetil-4-oxo-butanoato de sodio y un portador farmacéuticamente aceptable.

- Un quinto aspecto de la presente invención proporciona un método para tratar AAA, aterosclerosis, o ambos en un paciente que requiere del mismo, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, a dicho paciente.
- Un sexto aspecto de la presente invención proporciona un método para tratar AAA, aterosclerosis, o ambos en un paciente que requiere del mismo, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto 4-[[3-[3-[2-etil-4-(4-fluorofenil)-5-hidroxi-fenoxi]propoxi]-2-propil-fenil]amino]-2,2-dimetil-4-oxo-butanoato de sodio o una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto 4-[[3-[3-[2-etil-4-(4-fluorofenil)-5-hidroxi-fenoxi]propoxi]-2-propil-fenil]amino]-2,2-dimetil-4-oxo-butanoato de sodio a dicho paciente.
- Un séptimo aspecto de la presente invención proporciona un compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en terapia.
- Un octavo aspecto de la presente invención proporciona un compuesto 4-[[3-[3-[2-etil-4-(4-fluorofenil)-5-hidroxi-fenoxi]propoxi]-2-propil-fenil]amino]-2,2-dimetil-4-oxo-butanoato de sodio para su uso en terapia.
- Un noveno aspecto de la presente invención proporciona un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de AAA, aterosclerosis, o ambos.
- Un décimo aspecto de la presente invención proporciona un compuesto 4-[[3-[3-[2-etil-4-(4-fluorofenil)-5-hidroxi-fenoxi]propoxi]-2-propil-fenil]amino]-2,2-dimetil-4-oxo-butanoato de sodio para su uso en el tratamiento de AAA, aterosclerosis, o ambos.
- Un undécimo aspecto de la presente invención es el uso de un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de AAA, aterosclerosis, o ambos.
- Un duodécimo aspecto de la presente invención es el uso de un compuesto 4-[[3-[3-[2-etil-4-(4-fluorofenil)-5-hidroxi-fenoxi]propoxi]-2-propil-fenil]amino]-2,2-dimetil-4-oxo-butanoato de sodio para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de AAA, aterosclerosis, o ambos.
- Otro aspecto de la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula (I), o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente uno o más de otros agentes terapéuticos.
- Un aspecto adicional de la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto 4-[[3-[3-[2-etil-4-(4-fluorofenil)-5-hidroxi-fenoxi]propoxi]-2-propil-fenil]amino]-2,2-dimetil-4-oxo-butanoato de sodio en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente uno o más de otros agentes terapéuticos.
- Aún otro aspecto de la presente invención proporciona un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de AAA, o aterosclerosis, o ambos.
- Un aspecto adicional de la presente invención proporciona un compuesto 4-[[3-[3-[2-etil-4-(4-fluorofenil)-5-hidroxi-fenoxi]propoxi]-2-propil-fenil]amino]-2,2-dimetil-4-oxo-butanoato de sodio para su uso en el tratamiento de AAA o aterosclerosis, o ambos.
- Incluso otro aspecto de la presente invención proporciona el uso de un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de AAA o aterosclerosis, o ambos.
- Un aspecto todavía adicional de la presente invención proporciona el uso de un compuesto 4-[[3-[3-[2-etil-4-(4-fluorofenil)-5-hidroxi-fenoxi]propoxi]-2-propil-fenil]amino]-2,2-dimetil-4-oxo-butanoato de sodio para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de AAA o aterosclerosis, o ambos.
- Como se usa más arriba y a través de la memoria descriptiva de la invención, los siguientes términos, a menos que se indique lo contrario, tendrán el siguiente significado:
- El término “aneurisma aórtico abdominal” (o “AAA”) como se usa en la presente memoria significa una dilatación localizada o abultamiento de la aorta abdominal, en general entendido que es aquella porción de la aorta por debajo del diafragma, en un mamífero causando que el tamaño de al menos un segmento de la aorta abdominal exceda el tamaño de un estado que de otro modo sería considerado normal de 2 cm. La aorta abdominal puede ser medida y comparada en términos de cualquier medición de dimensión que incluye, pero no se limita al diámetro externo, diámetro luminal,

perímetro luminal, y área luminal. Los medios para medición y diagnóstico pueden ser a través del uso de ultrasonido, escaneo con CT, u otras técnicas de formación de imágenes. Por ejemplo, el AAA está presente en un humano cuando el diámetro aórtico es mayor de 3 cm. Si el diámetro aórtico externo es sin embargo mayor de 5 cm, entonces la reparación endovascular o quirúrgica inmediata (cánula intraluminal o injerto) es el estándar de cuidado para prevenir la ruptura y una fatalidad potencial. Sin embargo, si dicho tratamiento no está indisponible o no es una opción debido a cualquier razón, por ejemplo, edad, entonces esta población también puede ser tratada usando la presente invención.

El término "aterosclerosis" como se usa en la presente memoria significa una placa o lesión rica en lípidos en la íntima de las arterias.

El término "que requiere del mismo" como se usa en la presente memoria significa que tiene o es diagnosticado con una condición, AAA o aterosclerosis, que requiere tratamiento.

El término "paciente" como se usa en la presente memoria significa un mamífero tal como un perro, gato, caballo, vaca, oveja, cerdo o humano.

El término "sal farmacéuticamente aceptable del mismo" se refiere a sales de los compuestos de la presente invención. Ejemplos y métodos para su preparación están también dentro del conocimiento de aquellos expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Stahl y colaboradores, "Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use," VCHA/Wiley-VCH, 2002; y S.M. Berge, y colaboradores, "Pharmaceutical Salts," Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 66, No.1, enero de 1977, páginas 1-19. Sales farmacéuticamente aceptables particulares incluyen sodio, potasio, calcio y magnesio. Una sal farmacéuticamente aceptable preferida de la presente invención es sodio.

El término "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad o dosis de un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o composición que comprende un compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para lograr el tratamiento. Las dosificaciones anticipadas de un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, están en el intervalo de 60 hasta 1000 mg/paciente/día. Las dosificaciones preferidas se anticipa que están en el intervalo de 100 hasta 800 mg/paciente/día. Las dosificaciones más preferidas se anticipa que están en el intervalo de 130 hasta 650 mg/paciente/día. Una cantidad terapéuticamente efectiva puede ser fácilmente determinada por el médico tratante, como experto en la técnica, considerando una cantidad de factores conocidos por una persona experta en la técnica tales como, por ejemplo, peso, altura, edad, estado general de salud del paciente, severidad de la condición, modo de administración, régimen de dosificación, etc. Aunque se expresa como dosificación por día, el régimen de dosificación puede ser ajustado para producir un beneficio terapéutico más óptimo a un paciente. Además de la dosificación diaria, la dosificación dos veces al día (BID) o tres veces al día puede ser apropiada. Un régimen de dosificación de BID es actualmente contemplado como preferido.

El término "tratamiento" como se usa en la presente memoria significa reducir la velocidad o el progreso de un estado de enfermedad. También puede incluir interrumpir el estado de enfermedad. El término además puede incluir no solamente interrumpir la enfermedad, sino también reducir cualquier estado de enfermedad que ya ha ocurrido. Por ejemplo, en el contexto de AAA, el término "tratamiento" puede significar disminución de la velocidad de expansión de una aneurisma aórtico abdominal. También puede incluir detener la expansión del aneurisma aórtico abdominal. Además, puede incluir reducir cualquier expansión que ya ha ocurrido. En el contexto de aterosclerosis, el término "tratamiento" puede significar disminuir o detener el progreso de la placa aterosclerótica. También puede incluir reducir la placa existente.

El compuesto de la presente invención es preferiblemente formulado como una composición farmacéutica y administrado por una variedad de rutas. Preferiblemente, tales composiciones son para administración oral. Ejemplos y métodos para su preparación estén también dentro del conocimiento de aquellos expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (A. Gennaro, y colaboradores, eds. 19a edición, Mack Publishing Co., 1995).

El compuesto de la presente invención, y sus sales farmacéuticamente aceptables, pueden ser preparados por una variedad de procedimientos conocidos en la técnica así como también aquellos descritos en los Esquemas, Preparaciones y Ejemplos que se presentan más adelante. Sin embargo, la siguiente discusión no pretende ser limitante para el alcance de la presente invención de ninguna manera. Por ejemplo, las etapas específicas de síntesis para cada una de las rutas descritas pueden ser combinadas en diferentes formas, o en conjunto con las etapas de diferentes Esquemas, para preparar el compuesto, y las sales farmacéuticamente aceptables, de la presente invención. El Esquema 2 ilustra un procedimiento alterno para sintetizar el compuesto de la presente invención.

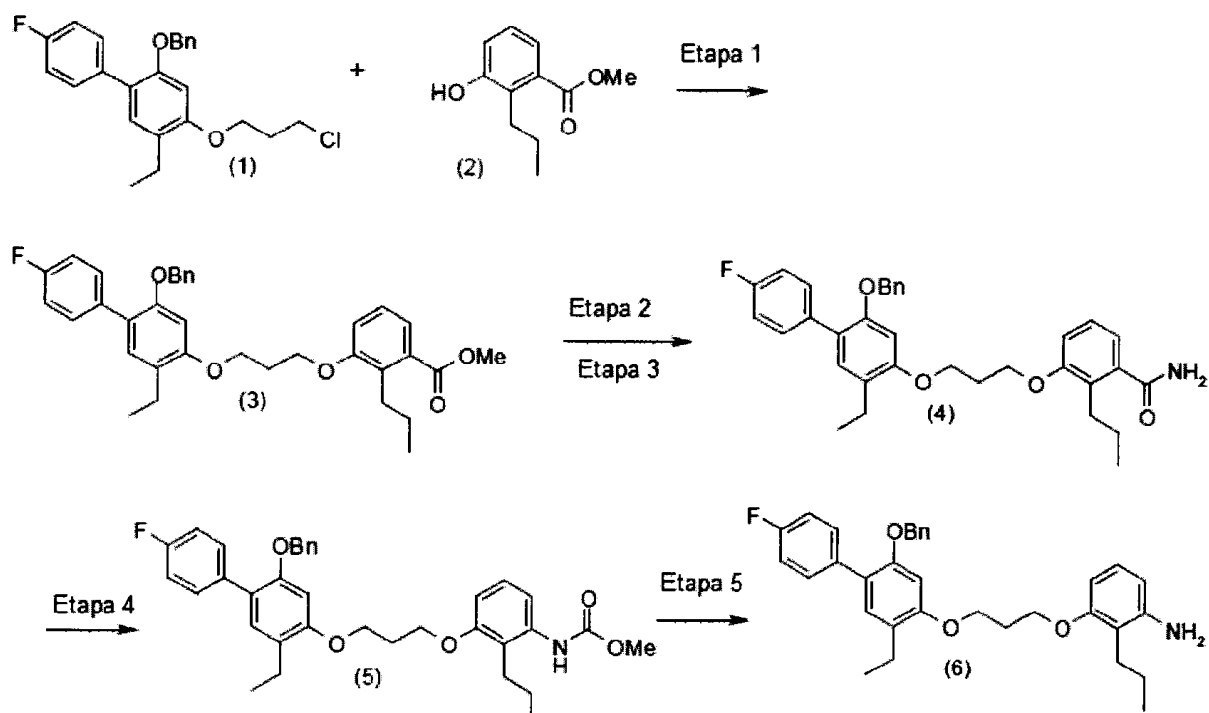
Las siguientes Preparaciones y Ejemplos ilustran además la invención y representan la síntesis típica del compuesto de Fórmula (I), que incluye cualquiera de los compuestos intermediarios novedosos. Los reactivos y materiales de partida están fácilmente disponibles para una persona ordinariamente capacitada en la técnica o pueden ser elaborados por procedimientos que se seleccionan a partir de técnicas estándar de química orgánica y heterocíclica, técnicas que son análogas a las síntesis de compuestos estructuralmente similares conocidos, y los procedimientos descritos en los Ejemplos siguientes, que incluyen cualquiera de los procedimientos novedosos.

Ejemplos de procedimientos conocidos y métodos incluyen aquellos descritos en los textos generales de referencia tales como Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers Inc., 1989; Compendium of Organic Synthetic Methods, Volúmenes 1-10, 1974-2002, Wiley Interscience; Advanced Organic Chemistry, Reactions Mechanisms, and Structure, 5a Edición, Michael B. Smith y Jerry March, Wiley Interscience, 2001; Advanced Organic Chemistry, 4a Edición, Parte B, Reactions and Synthesis, Francis A. Carey y Richard J. Sundberg, Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2000, etc., y las referencias citadas allí.

La nomenclatura de las siguientes Preparaciones y Ejemplos se hace en general usando la nomenclatura de la IUPAC en Symyx® Draw versión 3.2.NET. Los nombres alternativos usando diferentes metodologías de nomenclatura pueden ser usados para identificar sin ambigüedad las Preparaciones y el compuesto de Fórmula (I).

Como se usa en la presente memoria, los siguientes términos tienen los significados indicados: "Bn" se refiere a bencilo; "DBU" se refiere a 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno; "DMF" se refiere a dimetilformamida; "DMSO" se refiere a dimetil sulfóxido; "EtOAc" se refiere a acetato de etilo; "EtOH" se refiere a etanol; "MeOH" se refiere a metanol; "NBS" se refiere a N-bromosuccinimida; y "THF" se refiere a tetrahidrofurano.

Esquema 1



En el Esquema 1 se representa la formación de una 2-propil anilina intermediaria (6).

En la Etapa 1, se alquila 3-hidroxi-2-propil-benzoato de metilo (2) con 1-benciloxi-5-(3-cloropropoxi)-4-etil-2-(4-fluorofenil)benceno (1) (preparado de conformidad con Org. Process Res. Dev. (2009), 13: 268-275) para producir un propoxi benzoato de metilo (3). El experto en la técnica reconocerá que existen diversas condiciones de reacción que efectuarán tal alquilación. Por ejemplo, la reacción puede ser realizada en un disolvente inerte, tal como DMSO, en presencia de N,N-dimetilpiridin-4-amina con carbonato de potasio como base durante 2 a 4 días aproximadamente a 50 - 90°C. Alternativamente, la reacción puede ser realizada en DMF, en la presencia de yoduro de potasio, con una base inorgánica, tal como carbonato de potasio o preferiblemente carbonato de cesio. La reacción se realiza a una temperatura de 50 a 110°C durante 8 a 24 h. Otras bases que pueden ser usadas incluyen, por ejemplo, hidruro de sodio.

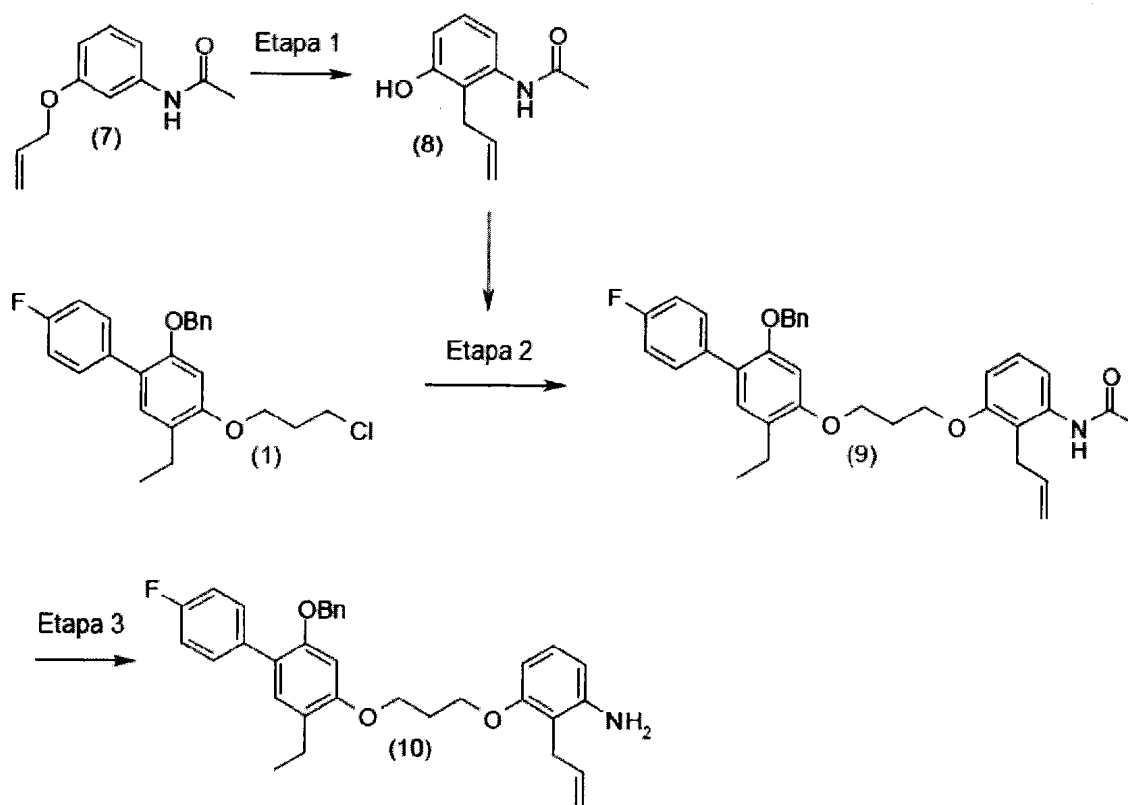
En la Etapa 2, el benzoato de metilo (3) es hidrolizado hasta ácido benzoico (no mostrado) usando KOH en N-metilpirrolidona a una temperatura de 90 a 140°C. Esto es seguido, en la Etapa 3, por tratamiento con cloruro de tionilo para elaborar el haluro de acilo y la reacción con hidróxido de amonio para obtener la benzamida (4).

En la Etapa 4, la benzamida (4) sufre un reordenamiento de Hofmann para producir el isocianato, el cual en presencia de MeOH como disolvente, proporciona el carbamato (5). La reacción tiene lugar en presencia de una base, tal como DBU y un agente de bromación, tal como NBS. El disolvente usado es MeOH y la reacción procede a una temperatura de -10 hasta 10°C durante un periodo de 12 a 30 h.

En la Etapa 5, el carbamato (5) es hidrolizado a la 2-propil anilina (6) usando hidróxido de potasio sólido en un disolvente inerte, tal como N-metilpirrolidona a una temperatura de 90 a 140°C durante 1 a 8 h.

El 3-hidroxi-2-propil-benzoato de metilo (2) se prepara a partir del ácido 2,3-dimetoxibenzoico. El ácido benzoico es convertido a 2,3-dimetoxibenzoato de terc-butilo a través del haluro de acilo. El tratamiento con un reactivo Grignard, el cloruro de propilmagnesio da como resultado la sustitución del grupo orto metoxi para producir 3-metoxi-2-propil-benzoato de terc-butilo. La desprotección con BBr₃ produce ácido 3-hidroxi-2-propil-benzoico que luego se esterifica para producir el 3-hidroxi-2-propil benzoato de metilo (6). Una síntesis alterna está disponible en la literatura partiendo con 3-benciloxibenzaldehído (Bioorg. Med. Chem. 1998, 6, 595-604).

Esquema 2



En el Esquema 2 se representa la formación de una 2-alil anilina intermediaria (10).

En la Etapa 1, la N-3(-aliloxifenil)acetamida (7) sufre un reordenamiento de Claisen para producir N-(2-alil-3-hidroxi-fenil)acetamida (8). La reacción se realiza en un disolvente inerte de alto punto de ebullición, tal como dimetilanilina, a la temperatura de reflujo del disolvente durante 12 a 24 h.

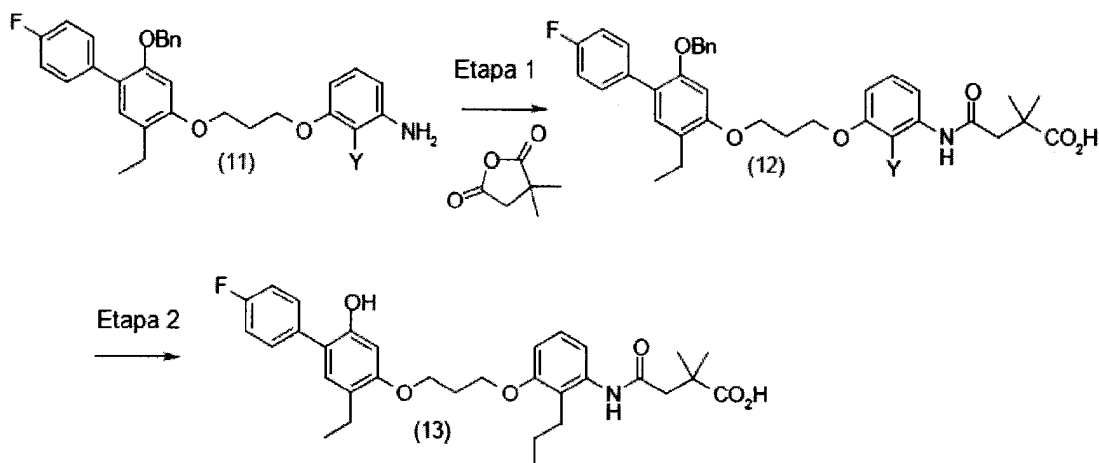
En la Etapa 2, se alquila la N-(2-alil-3-hidroxi-fenil)acetamida (8) con benciloxi-5-(3-cloropropoxi)-4-etil-2-(4-fluorofenil)benceno (1) para producir la fenoxi acetamida (9), usando condiciones previamente descritas para el Esquema 1, Etapa 1.

En la Etapa 3, se hidroliza la fenoxi acetamida (9) para producir la 2-alil anilina (10). La reacción procede en una mezcla de disolvente de HCl 6N/etanol a una temperatura de 50°C a la temperatura de reflujo del disolvente durante aproximadamente 1 a 12 h.

La N-3(-aliloxifenil)acetamida (7) se prepara por alquilación de acetamidofenol con 3-yodopropeno.

Esquema 3

5



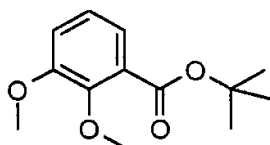
En el Esquema 3 se representa la síntesis del compuesto de la invención (13).

10 En la Etapa 1, una anilina de fórmula (11) (Y = alilo o propilo) es acilada con 3,3-dimetiltetrahidrofuran-2,5-diona para producir la amida (12). La reacción se realiza en un disolvente inerte tal como diclorometano o THF. Se puede agregar una base orgánica, tal como N-metilmorfolina o diisopropiletilamina. La reacción procede a una temperatura de 10 a 40°C durante 6 a 72 h.

15 En la Etapa 2, se remueve el grupo protector bencilo del compuesto (12) usando hidrogenación para producir el compuesto de la invención (13). La reacción procede bajo una atmósfera de hidrógeno usando 5 o 10% de paladio sobre carbono en un disolvente o mezcla de disolventes tales como THF, EtOH/THF, EtOH, MeOH, o EtOAc/MeOH. Si Y = alilo, entonces se reduce el grupo alilo al grupo propilo bajo las condiciones de reacción. Si se desea, el producto puede ser convertido a la sal carboxilato de sodio usando NaOH acuoso (1 eq.) y concentración al vacío.

20 Preparación 1

2,3-dimetoxibenzoato de terc-Butilo



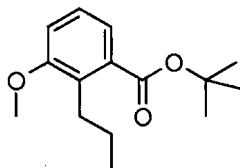
25

Se agrega cloruro de tionilo (67,6 ml, 928 mmol) gota a gota a una solución de ácido 2,3-dimetoxibenzoico (132 g, 714 mmol) y DMF (1,32 ml) en tolueno (528 ml) mantenida a 40°C. Se agita la solución durante 1 h a 40°C después que se completa la adición. Se concentra la mezcla al vacío y se disuelve el residuo en diclorometano (528 ml). Se calienta la mezcla a reflujo y se agrega alcohol terc-butílico (203,4 ml). Se agrega piridina (86,6 ml) gota a gota durante 5 min seguido por la adición de N,N-dimetilpiridin-4-amina (4,36 g, 35,7 mmol) y se agita la mezcla 1 h mientras se enfría hasta temperatura ambiente. Se diluye la mezcla con agua (200 ml) y se acidifica la mezcla (pH = 2) con ácido clorhídrico 2 N. Se separan las fases y la fase orgánica con ácido clorhídrico 0,5 N (2 x 30 ml). Se lava la fase orgánica con carbonato de potasio al 15%, agua, y salmuera. Se concentra la fase orgánica al vacío para producir el compuesto del título (141,2 g, 83%) como un sólido de color blanco. ES/MS m/z 165 [M-(C₄H₉O)]⁺.

35

Preparación 2

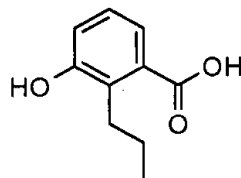
3-metoxi-2-propil-benzoato de terc-butilo



A una solución enfriada (-34°C) de 2,3-dimetoxibenzoato de terc-butilo (171 g, 718 mmol) en THF (855 ml) se le agrega cloruro de propilmagnesio 2 M en éter (448,5 ml, 897 mmol) gota a gota a una velocidad suficiente para mantener la temperatura interna por debajo de -10°C. Se agitó la mezcla 3.5 h manteniendo la temperatura cercana a -12°C. Se
 5 agrega ácido acético (51,4 ml) gota a gota a la mezcla mientras se mantiene la temperatura por debajo de -10°C y luego se diluye con agua (340 ml). Se separan las fases y se extrae la fase acuosa con metil-terc-butiléter (3 x 100 ml). Se lavan los extractos orgánicos combinados con salmuera y se concentra la fase orgánica al vacío para producir el compuesto del título (190 g, cuantitativo) como un aceite incoloro que contiene trazas de THF y metil-terc-butiléter. ¹H
 10 RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 7,24-7,14 (m, 2H), 6,93 (dd, J = 1,4, 8,01-12, 1H), 3,82 (s, 3H), 2,84-2,79 (m, 2H), 1,59 (m, 11H), 0,97 (t, J: 7,4 Hz, 3H).

Preparación 3

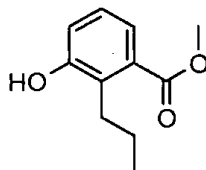
Ácido 3-Hidroxi-2-propil-benzoico



Se agrega tribromuro de boro (305,6 ml, 305,6 mmol) gota a gota mientras se mantiene la temperatura por debajo de 0°C a una solución de 3-metoxi-2-propil-benzoato de terc-butilo (61,2 g, 244 mmol) en tolueno (428 ml) que ha sido enfriado a -25°C. Se agita a -5°C durante 3 h. Se agrega agua (100 ml) gota a gota, elevando la temperatura hasta 7°C, y se agita durante 30 min. Se concentra la mezcla al vacío y luego se suspende el semisólido en agua (200 ml). Se agita
 20 1 h y después y se filtra la suspensión a través de una frita de vidrio. Se lava el sólido recolectado con agua y se seca el sólido para producir el compuesto del título (43,1 g, 98%). RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7,58 (d, J = 8,0 Hz, 1H); 7,16 (t, J 8,0 Hz, 1H); 6,99(d, J = 7,7 Hz, 1H); 5,0 (bs, 2 H); 2,98 (t, J = 7,7 Hz, 2H), 1,64 (m, 2H); 1,02 (t, J = 7,4 Hz, 3H).

Preparación 4

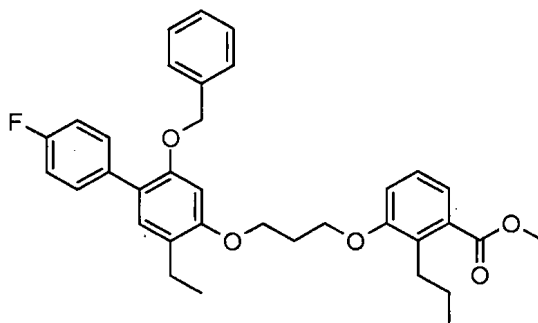
3-Hidroxi-2-propil-benzoato de metilo



Se enfría una solución de ácido 3-hidroxi-2-propil-benzoico (59,79 g, 332 mmol) en MeOH (598 ml) a -10°C y se agrega cloruro de tionilo (36,26 ml, 497,1 mmol) usando una bomba de jeringa durante 35 min. La mezcla se deja calentar a temperatura ambiente mientras se agita durante 35 h. Se concentra la mezcla al vacío y se diluye el residuo con metil-terc-butiléter (360 ml). Se concentra la mezcla resultante al vacío hasta sequedad para producir el compuesto del título
 35 (64,4 g, 87%) como un sólido color canela. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7,38 (dd, J = 8,0, 0,8 Hz, 1H); 7,10 (t, J = 8,0 Hz, 1H); 6,93 (dd, J = 8,0, 0,8 Hz, 1H); 5,1 (bs, 1 H); 3,89 (s, 3H); 2,98 (m, 2H), 1,61 (m, 2H); 1,00 (t, J 7,4 Hz, 3H).

Preparación 5

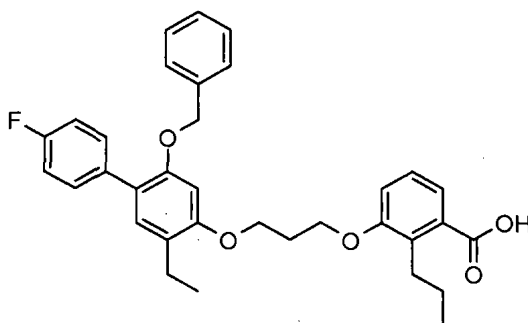
3-[3-[5-Benciloxi-2-etil-4-(4-fluorofenil)fenoxi]propoxi]-2-propil-benzoato de metilo



5 A una solución de 3-hidroxi-2-propil-benzoato de metilo (40,0 g, 206 mmol) y 1-benciloxi-5-(3-cloropropoxi)-4-etil-2-(4-fluorofenil)benceno (preparada de acuerdo con Org. Process Res. Dev. (2009), 13: 268-275) (82,15 g, 206 mmol) en dimetilsulfóxido (240 ml) se le agrega carbonato de potasio (30,2 g, 219 mmol) y N,N-dimetilpiridin-4-amina (2,0 g, 16 mmol) en forma sucesiva. Se agita la suspensión durante 87 h a 60°C y luego se deja enfriar. Se diluye la mezcla con agua (600 ml) y con metil-terc-butiléter (100 ml) y se agité durante 15 min. Se separan las fases y se lava la porción acuosa con metil-terc-butiléter (3 x 30 ml). Se lavan los extractos orgánicos combinados con agua y salmuera. Se concentra la porción orgánica al vacío para producir el compuesto del título (123,0 g, cuantitativo) como un aceite de color marrón. ES/MS m/z 557 (M+1).

Preparación 6

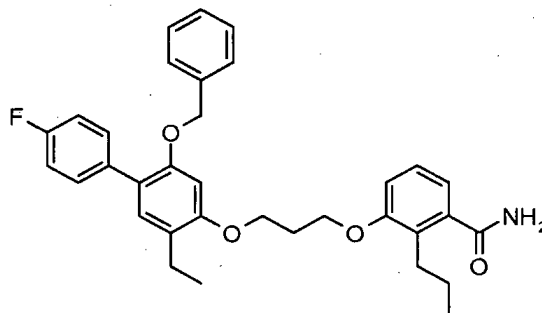
15 Ácido 3-[3-[5-benciloxi-2-etil-4-(4-fluorofenil)fenoxi]propoxi]-2-propil-benzoico



20 A una solución de 3-[3-[5-benciloxi-2-etil-4-(4-fluorofenil)fenoxi]propoxi]-2-propil-benzoato de metilo (119 g, 181 mmol) en N-metilpirrolidona (476 ml), se le agrega hidróxido de potasio (21,2 g, 378 mmol) y se agita durante 25 min a 120°C. Se deja enfriar y luego se diluye con agua (240 ml) y metil-terc-butiléter (100 ml). Se ajusta el pH a 2,5 con ácido clorhídrico 12 N. Se separan las fases y se lava la fase acuosa con metil-terc-butiléter (3 x 35 ml). Se lavan los extractos orgánicos combinados dos veces con agua y una vez con salmuera. Se concentran los extractos orgánicos al vacío. Se recrystaliza el residuo resultante a partir de acetonitrilo, se filtra y se seca para producir (78 g, 67%) como un sólido de color blanco. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7,60-7,47 (m, 3H); 7,37-7,20 (m, 6H); 7,12-7,02 (m, 4H); 6,60 (s, 1 H); 5,00 (s, 2H); 4,20 (m, 4H); 3,00 (m, 2H); 2,61 (q, J = 7,7 Hz, 2H); 2,33 (m, 2H); 1,59 (m, 2H); 1,18 (t, J = 7,7 Hz, 3H); 0,98 (t, J = 7,7 Hz, 3H).

Preparación 7

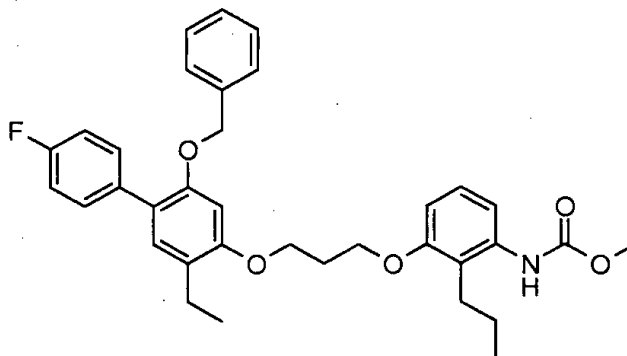
30 3-[3-[5-Benciloxi-2-etil-4-(4-fluorofenil)fenoxi]propoxi]-2-propil-benzamida



Se agrega cloruro de tionilo (8,22 ml, 113 mmol) gota a gota a una solución del ácido 3-[3-[5-benciloxi-2-etil-4-(4-fluorofenil)fenoxi]propoxi]-2-propil-benzoico (50,0 g, 92 mmol) y DMF (2,5 ml, 32 mmol) en THF (250 ml). Se agita durante 1 h y luego se agrega la reacción a una solución de hidróxido de amonio (102,5 ml, 1,52 mol) a 0-5°C. Se agrega MeOH (250 ml) y agua (500 ml) en una forma gota a gota. Se concentra hasta aproximadamente la mitad del volumen al vacío y se agita la suspensión resultante durante 30 min a 0-5°C. Se filtra la suspensión se filtré en una frita de vidrio y se secan los sólidos resultantes al vacío para producir el compuesto del título (50,3 g, cuantitativo) como un sólido blancuzco. ES/MS m/z 542 (M+1).

Preparación 8

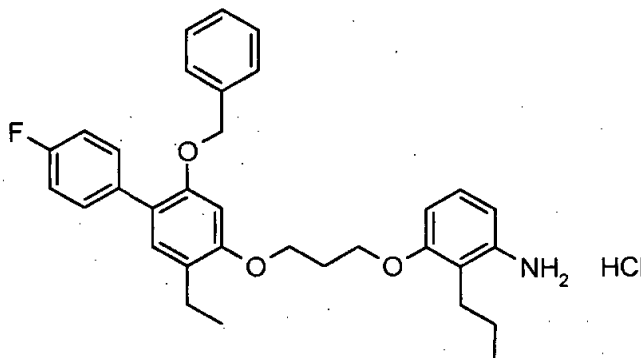
N-[3-[3-[5-benciloxi-2-etil-4-(4-fluorofenil)fenoxi]propoxi]-2-propil-fenil]carbamato de metilo



Se agregan secuencialmente 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (51,6 ml, 345 mmol) y N-bromosuccinimida (34,6 g, 194 mmol) a una suspensión agitada mecánicamente de 3-[3-[5-benciloxi-2-etil-4-(4-fluorofenil)fenoxi]propoxi]-2-propil-benzamida (62,0 g, 114 mmol) en MeOH (620 ml) tiempo durante el cual la temperatura se eleva desde -4,1°C hasta -3,2°C durante 1 min. Se agita la reacción a -5°C hasta -10°C durante 22 h. Se agrega una solución de bisulfito de sodio (25,1 g, 209 mmol, en 25 ml de agua) gota a gota con agitación. Se agrega agua (620 ml) gota a gota y se agita durante 30 min a 10°C. Se filtra la suspensión en una frita de vidrio, se lava el sólido recolectado con agua, y se seca al vacío para producir el compuesto del título (65,8 g, cuantitativo) como un polvo blancuzco. ES/MS m/z 572 (M+1).

Preparación 9

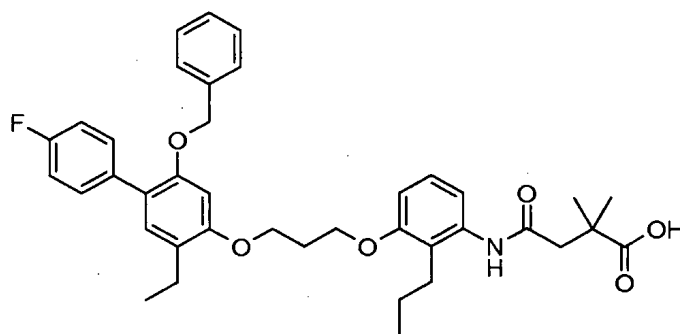
Clorhidrato de 3-[3-[5-benciloxi-2-etil-4-(4-fluorofenil)fenoxi]propoxi]-2-propil-anilina



Se agrega hidróxido de potasio (12,97 g, 231 mmol) a una solución de N-[3-[3-[5-benciloxi-2-etil-4-(4-fluorofenil)fenoxi]propoxi]-2-propil-fenil]carbamato de metilo (65,8 g, 115 mmol) en N-metilpirrolidona (203 ml) y se agita a 110-120°C durante 2 h. Se deja enfriar la mezcla y luego se vierte en una mezcla de agua (450 ml) y metil-terc-butiléter (180 ml). Se agita la mezcla durante 20 min y se separan las fases. Se extrae la fase acuosa con metil-terc-butiléter adicional (3 x 50 ml). Se filtran los extractos orgánicos combinados a través de una frita de vidrio y se lava el filtrado con solución de salmuera al 15%. Se concentra el filtrado al vacío y se disuelve el residuo en una mezcla de acetato de etilo (300 ml) y metil-terc-butiléter (300 ml). Se agrega ácido clorhídrico 4 N (43,1 ml) gota a gota a esta solución mientras se agita y se enfría la suspensión resultante con un baño de hielo/sal. Se recolecta el sólido por filtración en una frita de vidrio, se lava con metil-terc-butiléter frío, y se seca al vacío para producir el compuesto del título (57,8 g, 91%) como un sólido blancuzco. ES/MS m/z 514 (M+1, base libre).

Preparación 10

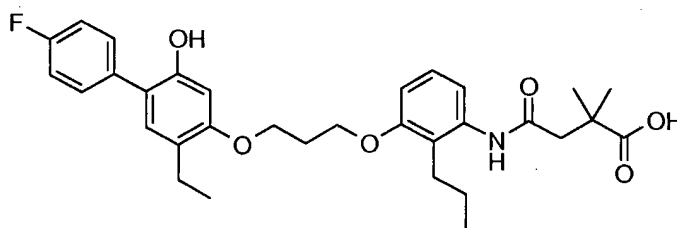
Ácido 4-[[3-[3-[5-benciloxi-2-etil-4-(4-fluorofenil)fenoxi]propoxi]-2-propil-fenil]amino]-2,2-dimetil-4-oxo-butanoico



Se agrega diisopropiletilamina (57 ml, 327 mmol) a una suspensión de clorhidrato de 3-[3-[5-benciloxi-2-etil-4-(4-fluorofenil)fenoxi]propoxi]-2-propil-anilina (90 g, 175 mmol) en THF (450 ml). A esta mezcla, se le agrega dihidro-3,3-dimetil-2,5-furandiona (32,1 g, 251 mmol) y se agita a 35°C hasta que el LCMS indica que queda 5% del material de partida. Se concentra la mezcla al vacío y se agrega metil-terc-butiléter (100 ml) y agua (75 ml). Se ajusta el pH a 2-3 con ácido fosfórico y se separan las capas. Se lava la capa acuosa con metil-terc-butiléter adicional (2 x 50 ml). Se lavan los extractos orgánicos combinados con salmuera y se concentran al vacío. Se disuelve el residuo crudo en metil-terc-butiléter (180 ml) y se agrega hexano (450 ml) para obtener una suspensión y se agita durante 30 min. Se recoge la suspensión por filtración y se seca para producir el compuesto del título (92,5 g, 88%) como un sólido de color blanco. ES/MS m/z 642 (M+1).

Ejemplo 1

Ácido 4-[[3-[3-[2-etil-4-(4-fluorofenil)-5-hidroxi-fenoxi]propoxi]-2-propil-fenil]amino]-2,2-dimetil-4-oxo-butanoico



Se hidrogena una suspensión de 10% de paladio sobre carbón, se humedece al 50% (con agua en peso) (13 g) y ácido 4-[[3-[3-[5-benciloxi-2-etil-4-(4-fluorofenil)fenoxi]propoxi]-2-propil-fenil]amino]-2,2-dimetil-4-oxo-butanoico (260 g, 405 mmol) en THF (1560 ml) partiendo a una presión de hidrógeno de 63,2763 kg/cm². Se continua la hidrogenación durante 20 h sin agregar hidrógeno adicional. Se hidrogena durante dos días más manteniendo la presión de hidrógeno de 14,0614 kg/cm². Se filtra la mezcla a través de tierra de diatomeas y se concentró el filtrado al vacío para producir el compuesto del título (251 g, cuantitativo) como un sólido. El exceso de peso es debido a la presencia de THF. ES/MS m/z 552 (M+1).

Ejemplo 2

4-[[3-[3-[2-etil-4-(4-fluorofenil)-5-hidroxi-fenoxi]propoxi]-2-propil-fenil]amino]-2,2-dimetil-4-oxo-butanoato de sodio

Se agrega hidróxido de sodio 1 N (404 ml) gota a gota a una solución de ácido 4-[[3-[3-[2-etil-4-(4-fluorofenil)-5-hidroxifenoxi]propoxi]-2-propil-fenil]amino]-2,2-dimetil-4-oxo-butanoico (223 g, 404 mmol) en THF (1.115 ml) y se agita a temperatura ambiente durante 15 min. Se reduce el volumen al vacío y se agrega agua (1.300 ml). Se remueve el disolvente adicional utilizando una bomba de membrana para evitar el calentamiento de la solución, para obtener un volumen final de 1.250 ml. Se liofiliza el resto de la solución por lotes para producir el compuesto del título (230 g, 99%) como un sólido blancuzco. ES/MS m/z 552 (M+1, base libre).

Los estudios con animales han implicado en forma creciente la ruta de síntesis del leucotrieno en enfermedades inflamatorias crónicas, que incluyen aterosclerosis y AAA. Poeckel, y colaboradores, Cardiovascular Research (2010), 86: 243-253. La aterosclerosis es una condición en la cual una placa aterosclerótica o lesión en la cual se forma una placa aterosclerótica y se empotra en la íntima de las arterias. Es una respuesta inflamatoria crónica de las paredes de las arterias causada principalmente por la acumulación de glóbulos blancos macrófagos y promovida por lipoproteínas de baja densidad sin adecuada remoción de las grasas y el colesterol de los macrófagos por lipoproteínas funcionales de alta densidad. La arteria se inflama. El LTB₄ juega un papel proaterogénico en la aterosclerosis debido a su capacidad para promover la adhesión y quimiotaxis de los leucocitos a través del endotelio. Nuevamente, Current Atherosclerosis Reports (2008), 10: 244-251; Aiello y colaboradores, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. (2002) 22: 443-449; Rosenfeld, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. (2002) 22: 361-363. La placa de colesterol causa que las células musculares se alarguen y formen una cubierta dura sobre el área afectada. Spanbroek y colaboradores. PNAS, (2003), 100(3): 1238-1243.

Las placas ateroscleróticas estables, que tienden a ser asintomáticas, son ricas en matriz extracelular y en células de músculo liso. Las placas inestables son ricas en macrófagos y células espumosas y "la matriz extracelular que separa la lesión del lumen arterial (capa fibrosa) se debilita típicamente y es propensa a la ruptura. Las rupturas de la capa fibrosa exponen el material trombogénico, tal como el colágeno, a la circulación y eventualmente inducen formación de trombos en el lumen. Después de la formación, los trombos intraluminales pueden ocluir las arterias completamente o pueden separarlas, moverse en la circulación y eventualmente ocluir las ramas arteriales corriente más pequeñas hacia abajo causando tromboembolismo (Ross, N. Engl. J. Med. (1999), 340(2): 115-126).

Un trastorno degenerativo, AAA se caracteriza por el progreso inexorable de 1) inflamación de la pared aórtica; 2) producción local no controlada de proteasas destructivas; 3) destrucción de las proteínas estructurales; y 4) agotamiento de las células de músculo liso medio. La fase temprana o aguda comienza con el reclutamiento de células inflamatorias en la media y adventicias. La lesión intramurales se producen cuando el oxígeno reactivo local, leucotrienos, quimiocinas y productos de degradación de matriz actúan en conjunto para activar varios sistemas de proteasas. Estos cambios patológicos en la pared aórtica conducen a un debilitamiento de los segmentos, dilatación progresiva, y ruptura espontánea (Nanda y colaboradores. Recent Patents on Cardiovascular Drug Discovery (2009), 4: 150-159).

La inflamación transmural crónica es una de las principales características histológicas del AAA establecido. Esta respuesta inflamatoria consiste en fagocitos mononucleares, linfocitos y células de plasma sanguíneo. La naturaleza de la respuesta a la inflamación crónica en AAA parece diferir de aquella observada en la aterosclerosis. La respuesta inflamatoria en AAA es usualmente transmural en distribución, con infiltrados densos ampliamente enfocados en la media exterior y la adventicia. En la aterosclerosis, las células inflamatorias infiltraciones se confinan principalmente en la íntima enferma, y no parecen que se concentran tanto o se distribuyan extensivamente como en los AAA. A pesar de que el componente común de la inflamación crónica, la destrucción de las proteínas estructurales en la pared aórtica exterior, no se observa en la aterosclerosis, parece ser el responsable de la degeneración aneurismal. (Thompson y colaboradores Curr. Probl. Surg. (2002), 39(2): 110-230, en 115, 137 y 142).

Aunque existen estudios publicados de lo contrario (véase, por ejemplo, Cao y colaboradores. Prostaglandins & other Lipid Mediators, (2007) 84: 34-42), una mayoría de los estudios publicados se cree que apoya el papel de la ruta de la 5-lipoxigenasa, y LTB₄, en la patogénesis de AAA. Los niveles elevados de LTB₄ derivados de neutrófilos juegan un papel clave en la patogénesis de AAA (Houard y colaboradores. FASEB J. (2009), 23: 1376-1383; Ahluwalia, y colaboradores. J. Immunol. (2007), 179: 691-697; Kristo y colaboradores Atherosclerosis, (2010), 210: 107-113).

Los siguientes estudios *in vitro* e *in vivo* demuestran la actividad y eficacia del compuesto de fórmula (I), o la sal sódica del mismo, en el tratamiento de aterosclerosis y AAA mediante antagonización de LTB₄. Estos ensayos son en general reconocidos por aquellos expertos en la técnica como indicativos de actividad terapéutica clínica humana. Los ensayos que evidencian la actividad y eficacia de antagonismo de señalización de LTB₄ pueden ser llevados a cabo sustancialmente de la siguiente forma o por ensayos similares que producen datos similares.

Procedimientos de Ensayo *in vitro*:

El enlazamiento y activación de BLT1 por LTB₄ aumenta los niveles de 1,4,5-trifosfasa de inositol intracelular que conduce a liberación de calcio intracelular y la afluencia de calcio es mediada por el acoplamiento con y la señalización a través de las subunidades de la ruta de transducción de señal acoplada a la proteína G específica (Gaudreau y

colaboradores Biochem. J. (1998), 335 (Pt 1): 15-18). A continuación se presentan dos ensayos *in vitro* usados para demostrar el antagonismo del Ejemplo 2 de los eventos de la cascada de señalización proximal de BLT1: un ensayo de desplazamiento de ligando [³H]-LTB₄ usando preparaciones de membrana generadas a partir de líneas celulares estables BLT1 y BLT2 y un ensayo de movilización de calcio de células completas.

5

Ensayo de Desplazamiento del Ligando LTB₄

Se utilizan [³H]-LTB₄ y antagonistas conocidos de BLT1 y BLT2 para generar curvas de desplazamiento de LTB₄ y valores de IC₅₀ para compuestos de la presente invención. La inhibición del receptor por los compuestos de la presente invención se determina con relación a las moléculas de referencia del inhibidor de BLT1 y del inhibidor de BLT2 para obtener eficacias en porcentaje.

10

Preparaciones del compuesto de prueba hBLT1: Para el ensayo de *hBLT1*, se preparan compuestos de prueba en DMSO para elaborar una solución patrón de 10 mM. La solución patrón se diluye inicialmente 1:10 en Regulador A (ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-etanosulfónico (HEPES) 50 mM, pH 7,4, MgCl₂ 10 mM, NaCl 10 mM, glicerol al 10% (v/v), albúmina de suero bovino al 1% (BSA) (p/v)), seguido por 3 diluciones seriales en Regulador B (HEPES 50 mM, pH 7,4, MgCl₂ 10 mM, NaCl 10 mM, glicerol al 10% (v/v), BSA al 1% (p/v), DMSO al 10% (v/v)) creando una curva de dilución de diez puntos. Las concentraciones del compuesto final que están en el intervalo de 30 µM a 1,52 nM se siembran en placa en una placa de fondo redondo de 96 pozos para realizar los ensayos *in vitro*.

15

20

Preparaciones del compuesto de ensayo hBLT2: Para los ensayos de *hBLT2*, se preparan los compuestos de prueba en DMSO para elaborar una solución patrón de 10 mM. La solución patrón se diluye inicialmente 1:10 en Regulador A (HEPES 50 mM, pH 7,4, MgCl₂ 10 mM, NaCl 10 mM, glicerol al 10% (v/v), BSA al 1% (p/v)), seguido por 3 diluciones seriales en Regulador B (HEPES 50 mM, pH 7,4, MgCl₂ 10 mM, NaCl 10 mM, glicerol al 10% (v/v), BSA al 1% (p/v), DMSO al 10% (v/v)) creando una curva de dilución de diez puntos. Las concentraciones del compuesto final que están en el intervalo de 300 µM a 15,2 nM se siembran en placa en una placa de fondo redondo de 96 pozos para realizar los ensayos *in vitro*.

25

Métodos para la generación de líneas de células estables BLT1/CHO-K1 y BLT2/CHO-K1:

30

Generalmente, estas líneas celulares se general utilizando materiales comercialmente disponibles y mediante procedimientos conocidos por aquellos expertos en la técnica.

Preparaciones de líneas celulares estables hBLT1/CHO-K1: El ADN receptor de BLT1 humano (National Center for Biotechnology Information (NCBI), Secuencia de Referencia NM_181657) se sintetiza y se clona en el vector de expresión pcDNA3.1/Hygro(+) (Invitrogen V87020). El constructo del vector de expresión de ADNC se transfecta en células de ovario de hámster chino (CHO-K1) (American Type Culture Collection) (ATCC) CCL-61) usando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) como reactivo de transfección. Las células se cultivan en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) que contiene 200 µg/ml de Higromicina, 24 horas después de la transfección. Los clones individuales se aíslan y se criban para la expresión y función de BLT1 utilizando análisis de transferencia tipo Western y un ensayo de liberación de calcio con el lector de placa de formación de imágenes fluorométricas (FLIPR®).

35

40

Preparaciones de líneas celulares estables hBLT2/CHO-K1: El ADN receptor forma BLT2 humano corto (National Center for Biotechnology Information (NCBI), secuencia de referencia GenBank AB029892) que es 32 aminoácidos más corto que la forma larga de BLT2 en el terminal N, Wang y colaboradores J. Biol. Chem. (2000), 275 (52): 40686-40694) se sintetiza y se clona en el vector de expresión pcDNA3.1/Hygro(+) (Invitrogen V87020). El constructo del vector de expresión de ADNC se transfecta en células CHO-K1 ATCC CCL-61) utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) como reactivo de transfección. Las células se cultivan en medio de DMEM selectivo que contiene 200 µg/ml de Higromicina, 48 h después de la transfección. Los clones individuales se aíslan y se criban para la expresión y función de BLT2 utilizando análisis de transferencia tipo Western y un ensayo de liberación de calcio con FLIPR®.

45

50

Preparaciones en membrana de hBLT1: Se suspenden células CHO-K1 transfectadas con hBLT1 en HEPES 50 mM, pH 7,4, MgCl₂ 10 mM, regulador de NaCl 10 mM, se sonicaron, y se concentraron por centrifugación diferencial. En resumen, después de la sonicación, los homogeneizados se centrifugan a 1000 X g durante 10 min. Se recuperan los sobrenadantes y se centrifugan nuevamente a 50,000 X g durante 60 min. Se recoge el precipitado, se resuspende en regulador que contiene HEPES 50 mM a pH 7,4, MgCl₂ 10 mM, NaCl 10 mM, glicerol al 10% y se usa como la membrana para hBLT1.

55

Preparaciones de membrana para hBLT2: Se suspenden células CHO-K1 transfectadas con hBLT2 en HEPES 50 mM, pH 7,4, MgCl₂ 10 mM, regulador de NaCl 10 mM, se sonicaron, y se concentraron por centrifugación diferencial. En resumen, después de la sonicación, los homogeneizados se centrifugan a 1000 X g durante 10 min. Se recuperan los sobrenadantes y se centrifugan nuevamente a 50.000 X g durante 60 min. Se recoge el precipitado, se resuspende en regulador que contiene HEPES 50 mM a pH 7,4, MgCl₂ 10 mM, NaCl 10 mM, glicerol al 10% y se usa como la membrana para hBLT2.

60

Ensayo de enlazamiento de [³H]-LTB₄ en membranas que contienen hBLT1:

- Se colocan alícuotas de [³H]-LTB₄ (30 µl de 1,3 nM, PerkinElmer NET-852) en una placa de enlazamiento con filtro Multiscreen Millipore de 96 pozos (catálogo número MAFBNOB10) que se humedece previamente con Regulador A (HEPES 50 mM, pH 7,4, MgCl₂ 10 mM, NaCl 10 mM, glicerol al 10%, BSA al 1%). Se agrega luego un intervalo de respuesta a la dosis preparada previamente del compuesto de prueba (10 µl) en las columnas 2-11, con concentraciones finales del compuesto en el intervalo de 3 µM a 152 pM. Para los controles de enlazamiento, se agregan alícuotas de 2-[3-[3-[(5-etil-4'-fluoro-2-hidroxi[1,1'-bifenil]4-il)oxi]propoxi]-2-propilfenoxi]-benzoato de sodio (LY293111 Na, un inhibidor conocido de hBLT1 comercialmente disponible; Sawyer y colaboradores J. Med. Chem. (1995), 38: 4411-4432, compuesto 43b) (10 µl de 3 µM, concentración final) (como control positivo) o 10 µl del Regulador B (HEPES 50 mM, pH 7,4, MgCl₂ 10 mM, NaCl 10 mM, glicerol al 10%, BSA al 1%, DMSO al 10%) (control negativo) en pozos seleccionados. Se agrega la proteína a la membrana para hBLT1 (0,7 µg) a los pozos apropiados de la placa de microtitulación para un volumen total de 100 µl. Se coloca la placa en un mezclador de placa a baja velocidad y se incuba durante 1 h. Después de la incubación, se aspira la placa y luego se lava con 200 µl de Regulador C enfriado con hielo (HEPES 50 mM, pH 7,4, MgCl₂ 10 mM, NaCl 10 mM) seguido por dos lavados adicionales con 100 µl, aspirando entre los lavados. Se seca la placa al aire, y luego se agrega Microscint® 20 (PerkinElmer) (100 µl). Se deja reposar la placa durante 16 h y luego se lee en un Packard Instrument Company Topcount® durante 1 min. Los CPMS (recuentos por minuto) se grafican contra la concentración del inhibidor y se ajusta una curva con un ajuste logístico de 3 parámetros con el fondo fijado para obtener valores de IC₅₀. Los IC₅₀ se convierten en valores de K_i dividiendo por 2,7 (previamente calculado). (2,7 es una constante previamente determinada mediante el corrimiento de una curva de enlazamiento de saturación con [³H]-LTB₄ y hBLT1 y se determina la K_M, usando la fórmula $K_i = IC_{50} / 1 + [Sustrato] / K_M$ y simplificando $K_i = IC_{50} / 2,7$).
- Siguiendo un protocolo esencialmente como se describió anteriormente, el compuesto del Ejemplo 2 mostró un K_i absoluto de 5,5 nM (con relación a un K_i de 10,4 nM) bajo estas condiciones. Estos datos evidencian un antagonismo potente de LTB₄ por el compuesto del Ejemplo 2 en el receptor LTB₄ de alta afinidad.

Ensayo de enlazamiento de [³H]-LTB₄ en membranas que contienen hBLT2:

- Se colocan alícuotas de [³H]-LTB₄ (30 µl de 2,8 nM, PerkinElmer NET-852) en cada pozo de una placa de microtitulación Falcon® 3072 (BD Biosciences). Se agrega luego un intervalo de respuesta a la dosis preparada previamente de 10 puntos del compuesto de prueba (10 µl) en las columnas 2-11, con concentraciones finales del compuesto en el intervalo de 30 µM a 1,5 nM. Para los controles de enlazamiento, se agregan alícuotas de 1-(5-etil-2-hidroxi-4-(6-metil-6-1H-tetrazol-5-il)heptiloxi)fenil)etanona (LY255283, un inhibidor de hBLT2 conocido comercialmente disponible) (10 µl de 100 µM, concentración final de 10 µM) (como un control positivo) o 10 µl del Regulador B (HEPES 50 mM, pH 7,4, MgCl₂ 10 mM, NaCl 10 mM, glicerol al 10%, BSA al 1%, DMSO al 10%) (control negativo) en los pozos seleccionados. Se agrega la proteína a la membrana para hBLT2 (7,5 µg) a los pozos apropiados de la placa de microtitulación para un volumen total de 100 µl. Se colocan las placas en un mezclador de placas a baja velocidad y se incuba durante 1 h. Después de la incubación, se transfieren 90 µl de cada pozo de la mezcla de reacción a una placa de enlazamiento del filtro Multiscreen Millipore de 96 pozos (catálogo número MAFBNNOB10), que se humedece previamente con Regulador A (HEPES 50 mM, pH 7,4, MgCl₂ 10 mM, NaCl 10 mM, glicerol al 10%, BSA al 0,03%). Se aspira la placa y luego se lava 3 veces con 300 µl de regulador C enfriado con hielo (HEPES 50 mM, pH 7,4, MgCl₂ 10 mM, NaCl 10 mM), aspirando después de cada etapa de lavado. Se seca la placa al aire, y luego se agrega Microscint® 20 (PerkinElmer) (100 µl). Se deja reposar la placa durante 16 h y luego se lee en un Packard Instrument Company Topcount® durante 1 min. Los CPMS (recuentos por minuto) se grafican contra la concentración del inhibidor y se ajusta una curva con un ajuste logístico de 3 parámetros con el fondo fijado para obtener valores de IC₅₀.
- Siguiendo un protocolo esencialmente como se describió anteriormente, el compuesto del Ejemplo 2 mostró un IC₅₀ absoluto de 16,5 µM (IC₅₀ relativa de 15,4 µM) bajo estas condiciones. Estos datos evidencian un antagonismo estadísticamente insignificante de LTB₄ por el compuesto del Ejemplo 2 en el receptor LTB₄ de baja afinidad.

Ensayo de liberación de calcio FLIPR®:

- Las células de ovario de hámster chino (CHO-K1) que expresan en forma estable al receptor de LTB₄ de alta afinidad (BLT1) se siembran a razón de 10.000 células/pozo en una placa de 96 pozos (Corning) en medio de cultivo que contiene DMEM/F-12 (3:1) sin rojo fenol (Invitrogen), suero bovino fetal al 5% (FBS) (Hyclone), HEPES 20 mM (Invitrogen), 200 µg/ml de Higromicina B (Invitrogen) y 40 µg/ml de L-Prolina (Sigma). Se incuba la placa durante 22-24 h a 37°C y 5% de CO₂, luego se reemplaza el medio de cultivo con 50 µl/pozo del medio de prueba que contiene RPMI-1640 Roswell Park Memorial Institute (RPMI) sin rojo fenol, HEPES 20 mM (ambos de Invitrogen), y albumina de suero bovino al 0,2% p/v (Sigma). Después de 30-60 minutos de incubación a 37°C y 5% de CO₂, se agregan 50 µl del reactivo del kit de ensayo de Calcio 3 FLIPR diluido (Molecular Devices) que contiene probenecida 5 mM (Sigma) a los pozos y se incuba la placa durante 1,25 h adicionales a 37°C y 5% de CO₂. Se coloca la placa en un instrumento FLIPR® (Molecular Devices) y se agregan 50 µl de DMSO al 4% v/v o el compuesto seguido 6 minutos después por 50

µl del vehículo o LTB₄. La concentración final de LTB₄ es 8 nM. La placa se lee utilizando un tiempo de exposición de 0,5 y una potencia láser de 0,6 Watt.

- 5 El compuesto del Ejemplo 2 evidencia una inhibición de movilización de calcio inducida por LTB₄ (potencia y selectividad) Kb (nM) de 0,98 (n de 2; +/- 1,64) y una IC₅₀ relativa (nM) de 6,48 (n de 2; +/- 10,8).

Además, por debajo hay varios ensayos adicionales utilizados para medir los eventos secuencia abajo que son inducidos por el enlazamiento de LTB₄ con BLT1, incluyendo la fosforilación de las quinasas 1 y 2 reguladas por la señal extracelular (ERK) en monocitos (Lindsay y colaboradores J. Leukoc. Biol. (1998), 64: 555-562), y la inducción de CD11b en neutrófilos en tipos de células relevantes en ratones y sangre humana así como la afinidad de enlazamiento de LTB₄ con la subfamilia del receptor nuclear de los receptores activados del proliferador de peroxisoma (PPAR).

Ensayo de la quinasa relacionada con la señal extracelular fosforilada humana (pERK):

- 15 La capacidad del compuesto del Ejemplo 2 para bloquear la señalización inducida por LTB₄ a través de BLT1 fue evaluada en sangre completa obtenida de voluntarios humanos sanos y de ratones 129SvEv que son la cepa modelo para la evaluación de la eficacia preclínica de AAA.

20 La sangre completa se recolecta de donantes humanos en 10 ml en tubos vacutainer con ácido etilendiaminotetraacético K2 (EDTA) (BD Biosciences). Las alícuotas de la sangre completa se precalientan a 37°C durante 20 min. Se ensayan curvas de respuesta a la dosis de 10 puntos de los compuestos de prueba son sometidos a ensayo a concentraciones finales de 20 nM - 10 µM. Se preparan diluciones seriales 1/2 de 10 puntos del compuesto a 1000X de la concentración ensayada final en DMSO. Los compuestos se diluyen luego hasta 10X en solución salina regulada con fosfato de Dulbecco (DPBS) (la concentración de DMSO es ahora del 1%). Se agregan 10 µl de las diluciones del compuesto (a 10x en DPBS) o DMSO al 1% en DPBS a los pozos de una placa de 96 pozos profundos con un volumen de 2,0 ml de (Nunc) y se colocan en un bloque e calentamiento a 37°C.

30 Inmediatamente después de eso, se agregan 80 µl de sangre completa y se incuba durante 20 minutos a 37°C (se agregan 10 µl de CD14-FITC anti-humana de BD Biosciences durante 10 minutos finales). Se agregan 11 µl de LTB₄ 10x precalentado de Cayman Chemicals (concentración final 10 nM) y se incuba a 37°C durante 1 min. Se detiene la reacción con 1,5 ml de 1X Phosflow Lyse/Fix de BD Biosciences (precalentado a 37°C). Se sella la placa, se agita con agitación tipo vórtice, y se incuba a 37°C durante 10 min. Se lavan las células una vez con 1,5 ml de DPBS (Hyclone) luego se permeabilizan con 100 µl de Cytofix al 2% (BD Biosciences) + 900 µl de metanol frío durante 30 minutos sobre hielo. Se lavan las células una vez con 1 ml de regulador de lavado (solución salina regulada con fosfato de Dulbecco) (DPBS) + FBS al 5%) después se incuban con 100 µl de anticuerpo pERK (señalización celular diluida 1:100) durante 1 h a temperatura ambiente. Se lavan las células una vez con regulador de lavado luego se incuban con 100 µl de 2 µg/ml de IgG-PE anti-conejo (Invitrogen) durante 30 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Se lavan las células nuevamente con regulador de lavado luego se fijan en 400 µl de Cytofix al 1% (BD Biosciences). Se transfieren las células a tubos de 12 x 75 y luego se refrigeran hasta el análisis. Las muestras se calientan a temperatura ambiente y se analizan en un citómetro de flujo Beckman Coulter FC500. Mediante estrategia de conmutación de dispersión lateral contra CD14-FITC positivo. Se analizan los datos con el software WinList (Verity Software House) para determinar los valores de intensidad de fluorescencia medio y mediano de intensidad de fluorescencia para pERK-PE a partir de la población de monocitos.

- 45 Cuando se agrega el compuesto del Ejemplo 2 a sangre completa humana a diferentes concentraciones, se bloquea la fosforilación inducida por LTB₄ de ERK en monocitos con una IC₅₀ de 814 nM evidenciando antagonismo de eventos de señalización secuencia abajo por el compuesto del Ejemplo 2.

Ensayo de pERK de ratón:

50 Se recoge sangre completa de ratones 129SvEv en EDTA 50 mM (Gibco). Para los experimentos *in vitro*, se ensayan curvas de respuesta de dosis a la dosis de 10 puntos de compuestos de prueba con concentraciones finales de 20 nM - 10 µM. Se preparan diluciones seriales 1/2 de 10 puntos del compuesto a 1000x de la concentración final ensayada en DMSO. Se diluyen luego los compuestos hasta 10x en DPBS (la concentración de DMSO es ahora 1%). Se agregan 10 µl de diluciones del compuesto (con 10x diluido en DPBS) o DMSO al 1% en DPBS a los pozos de una placa de 96 pozos profundos. Se agregan 80 µl de sangre completa y se incuba durante 20 min a temperatura ambiente (10 µl de anticuerpo LY6G-FITC anti-ratón (BD Pharmingen) y 10 µl de CD11b-APC anti-ratón BD Biosciences a razón de 1 µg/ml de concentraciones finales durante 10 minutos finales). Se agregan 11 µl de LTB₄ 10x precalentado (concentración final 20 nM) y se incuba a 37°C durante 2 min. Se detiene la reacción con 1,5 ml de 1X Phosflow Lyse/Fix de BD Biosciences (precalentado a 37°C). Se sella la placa, se agita con agitación tipo vórtice, y se incuba a 37°C durante 10 min. Se lavan las células una vez con 1,5 ml de DPBS luego se permeabilizan con 1 ml de regulador BD Perm/Wash (BD Biosciences) durante 10 minutos temperatura ambiente. Se lavan las células una vez con 1 ml de regulador Perm/Wash luego se incuban con 100 µl de anticuerpo pERK (señalización celular diluida 1:100) durante 1 h a temperatura ambiente. Se lavan las células nuevamente con regulador Perm/Wash luego se incuban con 100 µl de 2 µg/ml de IgG-PE anti-conejo

(Invitrogen) durante 30 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Se lavan las células nuevamente con regulador Perm/Wash y luego se fijan en 400 µl de BD Cytotfix al 1%. Se aíslan los monocitos de ratón mediante estrategia de conmutación LY6G-FITC negativo/CD11b-APC positivo.

- 5 El compuesto del Ejemplo 2 bloqueó la fosforilación inducida por LTB₄ de ERK en monocitos de sangre completa de ratón con una IC₅₀ de 243 nM que evidencia el antagonismo de eventos de señalización secuencia abajo.

Ensayo CD11b:

- 10 La inflamación es un procedimiento patofisiológico susceptible al desarrollo de biomarcadores. Por ejemplo, una prueba simple de sangre puede servir como un sustituto para una biopsia de tejido para controlar la activación del neutrófilo. La activación del neutrófilo conduce a su migración desde la sangre hasta el sitio dañado del tejido y es central para el procedimiento inflamatorio (Busse, Am. J. Respir. Crit Care Med. (1998), 157: S210-213), y los neutrófilos están típicamente ausentes en tejidos sanos. Un ensayo basado en un biomarcador que es específico para la activación de neutrófilos en la sangre es un indicador menos invasivo de una respuesta inflamatoria en el tejido. Una mayor expresión de la integrina β2 CD11b/CD18 (Mac-1), una glicoproteína de la superficie del neutrófilo, es una etapa temprana en la migración de neutrófilos en el área de inflamación (Parkos, BioEssays (1997), 19: 865-873). La utilidad de CD11b como un biomarcador clínico y preclínico del antagonismo del receptor de BLT1 se basa en el hecho de que LTB₄ sobrerregula en forma potente la expresión de CD11b en los neutrófilos (Turner y colaboradores J. Clin. Invest. (1996), 97: 381-387), y la estimulación de CD11b por LTB₄ ha mostrado que se reduce significativamente por los antagonistas del receptor de LTB₄ (Allen y colaboradores J. Pharmacol. Exp. Ther. (1996), 277: 341-349; Davis y colaboradores J. Immunol. Methods (2000), 240: 125-132; Marder y colaboradores Biochem. Pharmacol. (1995), 49: 1683-1690).

- 25 Se recoge sangre anti-coagulada con EDTA de donadores humanos o de ratones como anteriormente. Para los experimentos *in vitro*, se ensayan las curvas de respuesta a la dosis de 8 o 10 puntos de compuestos de prueba a concentraciones finales de 78 nM - 10 µM o 20 nM - 10 µM respectivamente. Las diluciones seriales 1/2 del compuesto a 1000x de la concentración final ensayada se preparan en DMSO. Se diluye luego el compuesto a 10x en DPBS (la concentración de DMSO es ahora 1%). Se agregan 10 µl de diluciones del compuesto (a 10x en DPBS) o DMSO al 1% en DPBS a los pozos de una placa de 96 pozos profundos. Se agregan 90 µl de sangre completa y se incuba durante 20 min a temperatura ambiente. Se agregan 11 µl de 10x LTB₄ (concentración final 25 nM para ratones o 10 nM para humanos) y se incuba a 37°C durante 30 min. Se detiene la reacción incubando la placa en hielo durante 5 min. Se tiñen las células con 10 µl de CD11b-PE antirratón o antihumano (BD Biosciences diluido 1:20 para ratón y no diluido para humano) y se incuba en hielo durante 30 minutos en la oscuridad (para experimentos con ratones, se agregan 10 µl de anticuerpo LY6G-FITC antirratón (BD Pharmingen) diluido 1:25 para los 10 minutos finales). Los glóbulos rojos (RBC) son sometidos a lisis agregando 1,5 ml de 1X BD FACSlyse (BD Biosciences) y se incuba durante 10 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Se lavan las células una vez con 1,5 ml de DPBS y después se fijan en 400 µl de Cytotfix al 1%. Los neutrófilos de ratón son aislados por estrategia de conmutación LYGG-FITC positiva y se aíslan los neutrófilos humanos por sus propiedades de dispersión de la luz. Los datos son analizados con software WinList (Verity Software House) para determinar los valores de intensidad de fluorescencia media y mediana para CD11b-PE de la población de neutrófilos.

- 45 La expresión de CD11b inducida por LTB₄ en neutrófilos es inhibida de una forma dependientemente de la dosis en este modelo preclínico por el compuesto del Ejemplo 2 y el Ejemplo 2 bloquea la expresión de CD11b inducida por LTB₄ en neutrófilos de sangre completa humano y de ratón. La expresión inducida por LTB₄ de CD11b en neutrófilos de sangre completa humana es bloqueada con una IC₅₀ de 193 nM. De manera similar, el compuesto del Ejemplo 2 inhibe la expresión de CD11b en neutrófilos de sangre completa de ratón con una IC₅₀ de 1,45 µM.

- 50 Ensayo de enlazamiento del receptor alfa, delta y gama activado por el proliferador del peroxisoma (PPAR α, δ, γ) activado por el ligando:

- Los antagonistas del receptor de LTB₄ y BLT han demostrado ser ligandos de la subfamilia del receptor nuclear de los receptores activados por el proliferador de peroxisoma (PPAR) y se cree es una limitación en sus oportunidades de desarrollo (Devchand et al J. Biol. Chem. (1999), 274: 23341-23348; Devchand y colaboradores. Nature (1996), 384: 39-43).

- 55 Preparación de lisado funcional de PPAR:

- En general, estas líneas celulares son generadas usando materiales comercialmente disponibles, y por procedimientos conocidos por aquellos expertos en la técnica.

- 60 El ADN del receptor de PPARα de longitud completa que codifica secuencias de nucleótidos (National Center for Biotechnology Information (NCBI) Secuencia de Referencia NM_005036.4), el ADN del receptor de PPARδ (NCBI Secuencia de Referencia NM_006238.4), el ADN del receptor PPARγ (NCBI Secuencia de Referencia NM_015869.4) y el ADN del Receptor X Retinoide (RXR) α (NCBI Secuencia de Referencia NM_002957.4) son sintetizados e insertados

en el vector pFastBacHTb (Invitrogen) en el marco con la etiqueta HIS del terminal N del vector. Los bácmidos recombinantes (plásmido vector lanzador del baculovirus) son creados mediante transformación de células DH10Bac y aislando el ADN de colonias blancas de conformidad con el protocolo del fabricante del sistema de Expresión del Baculovirus Bac-to-Bac (Invitrogen; véase también el manual del usuario de Invitrogen, Versión F, fechado el 4 de Septiembre de 2010; y el manual de instrucciones de Invitrogen fechado el 27 de febrero de 2009). Células Sf9 son transfectadas en placas de 6 pozos a razón de $0,9 \times 10^6$ células/pozo usando el reactivo CellFectin (Invitrogen). El virus P0 es recolectado 72 h después de la transfección y usado para infectar células de insecto Sf9 en suspensión a razón de 100 μ l del virus P0 por 50 ml de células a razón de $1,5 \times 10^6$ células/ml. Se recolecta el virus P1 después de 96 h. Para la producción de proteína, se infecta 1 L de células Sf9 son infectadas a razón de $1,5 \times 10^6$ células/ml con 5 ml de virus P1 y las células son cosechadas después de 48 h. Para preparar el lisado celular, se resuspenden los precipitados celulares de 1 L de cultivo con 12,5 ml de regulador de lisis enfriado en hielo (HEPES 20 mM, pH 7,8, KCl 160 mM, $MgCl_2$ 1 mM, ditiotritol 2 mM (DTT), 1% de 3-[(3-cloramidopropil)dimetilamonio]-1-propansulfonato (CHAPS), glicerol al 40%, 1 x de cóctel inhibidor de proteasa Roche) para PPAR o regulador B de lisis (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, NaCl 500 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, glicerol al 50%, 1 x cóctel inhibidor de proteasa Roche) para RXR α , y luego se homogeniza y sonica sobre hielo. Después de la centrifugación en un rotor JA18 de Beckman a 16,500 rpm durante 45 min a 4°C, se toman alícuotas del sobrenadante y se congelan a -80°C. La concentración de proteína se determina mediante el ensayo de Bradford utilizando BSA como el estándar. Afinidades de enlazamiento de compuestos para los receptores de PPAR α , δ , y γ se evalúan utilizando tecnología de ensayo de proximidad de centelleo (SPA).

Oligonucleótido biotinilado (DR2)

Se utiliza 5'TAATGTAGGTAATAGTTCAATAGGTCAAAGGG3' (SEQ ID NO: 1) para el enlazamiento de los receptores con las perlas de SPA recubiertas con estreptavidina y silicato de Itrio (Perkin Elmer). El PPAR α , δ , y γ y los receptores retinoide X receptor (RXR) α (expresados en forma endógena como heterodímeros) son lisados celulares de sistemas de expresión de baculovirus en células Sf9. El DR2 se une a las perlas SPA de estreptavidina mezclado durante un periodo de 30 minutos a temperatura ambiente en un regulador de enlazamiento que contiene HEPES 10 mM a pH 7,8, KCl 80 mM, $MgCl_2$ 0,5 mM, DTT 1 mM, CHAPS al 0,5% y 16,6 μ g de albúmina de suero bovino. La mezcla se centrifuga a 2000 rpm durante 3 min para precipitar la mezcla de perla-oligo. Se remueve el sobrenadante y e resuspende el precipitado de perla-oligo en el mismo regulador de enlazamiento anterior. Se incuban los lisados celulares en cada pozo con una de 11 concentraciones del compuesto, el intervalo de 0,17 hasta 10.000 nM, en presencia de $\sim 0,0338 \mu$ Ci de GW2331 tritiado (ácido 2-[4-[2-[(2,4-difluorofenil)carbamoil](heptil)amino]etil]fenoxi]-2-metilbutanoico racémico) para los receptores alfa y delta y $\sim 0,0338 \mu$ Ci de GW2331 tritiado ácido 2-metil-2-[4-[3-[propil[(5-piridin-2-iltiofen-2-il)sulfonil]amino]propil]fenoxi]propanoico para el receptor gamma, 110,3 μ g de perlas recubiertas con estreptavidina SPA, 0,126 nM de HD Oligo DR2, y ya sea 0,3 μ g de PPAR α con 0,5 μ g de RXR α , 0,5 μ g de PPAR δ con 0,5 μ g de RXR α , o 1,25 μ g de PPAR δ con 3,03 μ g de RXR α en el regulador de enlazamiento anterior más glicerol al 14% y 5 μ g de esperma de salmón cortado. Se determina el enlazamiento no específico en presencia de GW2331 no marcado 10.000 nM (Kliwer, S. A. colaboradores. Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. (1997), 94: 4318-4323) para los receptores alfa y delta y 2-metil-2-[4-[3-[propil[(5-piridin-2-iltiofen-2-il)sulfonil]amino]-propil]fenoxi]propanoico (WO 2004/073606) para el receptor gamma. La reacción de enlazamiento (100 μ l por pozo en una placa de 96 pozos [Costar 3632]) se incuba durante 10 h y se hace un recuento de las desintegraciones por minuto (dpm) en un Contador de centelleo líquido Wallac Microbeta Luminometer. Se determina la afinidad de enlazamiento del receptor (IC_{50}) para los compuestos ajustando una curva de respuesta de concentración de 11 puntos con una ecuación logística de 4 parámetros. K_i se determina a partir de la IC_{50} usando la ecuación de Cheng-Prusoff y se determina K_d por enlazamiento de saturación.

Se puede obtener GW2331 tritiado siguiendo en general los procedimientos en la literatura de síntesis del análogo de gem-dimetilo (WO 92/10468; Hawke, R. L. y colaboradores. J. Lipid Res. 1997, 38:1189-1203) para obtener el material no tritiado. La tritiación se puede lograr usando gas tritio y catalizador de Crabtree (Heys, J. R. y colaboradores J. Labelled de. Radiopharm. (1999), 42: 797-807) que coloca el tritio en la posición orto del difluorofenilo. Alternativamente, se coloca el tritio en la porción heptilo de la molécula mediante reducción catalizada por paladio con gas tritio del análogo de heptenilo (ibidem, Kliwer, S.A.).

El ácido 2-metil-2-[4-[3-[propil[(5-piridin-2-iltiofen-2-il)sulfonil]amino]propil]fenoxi]propanoico tritiado puede ser elaborado por reducción catalítica del precursor alilo con gas tritio. El precursor alilo (ácido 2-[4-[3-[alil-[(5-(2-piridil)-2-tienil]sulfonil]amino]propil]fenoxi]-2-metil-propanoico) puede en general ser elaborado siguiendo los procedimientos en el documento WO 2004/073606, comenzando con 2-metil-2-[4-[3-(p-tolilsulfonilo)propil]fenoxi]propanoato de etilo en reacción con alilamina, seguido por sulfonilación con cloruro de 5-(2-piridinil)-2-tiofensulfonilo e hidrólisis del éster etílico.

El uso de los dos ligandos radioactivos se puede encontrar en la literatura (Burris y colaboradores Molecular Pharmacology, 2004 67: 948-954 y Xu y colaboradores J. Med, Chem. 2004, 47: 2422-2425).

Siguiendo un protocolo esencialmente como se describe anteriormente el compuesto del Ejemplo 2 presentó un Ki en los ensayos de enlazamiento de PPAR α , δ , y γ de aproximadamente 617 nM (n = 3), > 8830 nM (n = 4), y 1380 nM (n = 2) respectivamente. Estos datos demuestran que el compuesto del Ejemplo 2 es solamente débilmente interactivo, con receptores de PPAR. Se cree que la actividad evidencia selectividad y no presenta una limitación de desarrollo.

5

Procedimientos de Ensayo *in vivo*:

Modelo de eficacia animal de AAA inducida por CaCl_2 :

- 10 Una aplicación dirigida de una solución de cloruro de calcio a la aorta del ratón induce dilatación de los bazos, Chiou y colaboradores J. Surg. Res. (2001), 99: 371-376; Lomgo y colaboradores J. Clin. Invest. (2002), 110: 625-632. Dos semanas después del tratamiento, se comparó la dilatación de los bazos con el diámetro original de los bazos que se vuelve estadísticamente significativo, con un aumento hasta del 75% del perímetro luminal aórtico después de 4 semanas. El calcio precipitado ha sido localizado principalmente dentro de la red elástica del medio. La ruptura de esta estructura por el complejo del tejido elástico de calcio debilita la pared del bazo, contribuyendo a la formación de la aneurisma. Esta lesión también sirve como un estímulo proinflamatorio, reclutamiento de neutrófilos, linfocitos, monocitos y mastocitos.

Animales:

20

Ratones: 129SvEv machos, 7 semanas de edad, se adquieren a través de Taconic Farms, Germantown, Nueva York, EE.UU.

Ratas: ratas Sprague-Dawley, 7-8 semanas de edad, se adquieren a través de Harlan, Indianápolis, Indiana, EE.UU.

25

Modelo de Inducción de Aneurisma: Todos los procedimientos se realizan de acuerdo con las directrices de cuidado y uso animal de Eli Lilly y Compañía Institucional. Después de su arribo, los animales tienen un periodo de aclimatación durante la cual tienen acceso libre al alimento estándar para roedores (Purina 2014) y agua de grifo. Después del periodo de aclimatación, se anestesian los animales con isoflurano, y se realiza una laparotomía para la inducción estimulada con CaCl_2 del aneurisma aórtico abdominal (AAA). La aorta abdominal a nivel de las arterias renales para la bifurcación ilíaca se aísla de la vena cava inferior y los tejidos conectores circundantes usando técnicas microquirúrgicas. Una vez aislada, se envuelve la región de interés (ROI) de la aorta abdominal con gasa estéril de algodón remojada previamente en una solución de CaCl_2 0,25 M. En los animales de control ficticios, se sustituye la solución salina al 0,9% por CaCl_2 . Después de 7 minutos, se remueve la gasa y se aplica nuevamente una segunda gasa remojada con CaCl_2 . Después del segundo periodo de 7 minutos, se remueve la gasa, se enjuaga la aorta con solución salina al 0,9%, y se cierra el abdomen. Se retornan los animales al alojamiento general al final de su día de cirugía.

Administración del compuesto: Los ratones reciben compuesto de prueba (Ejemplo 2) mediante alimentación oral forzada con un volumen de dosis de 10 ml/kg de peso corporal, y las ratas reciben compuesto de prueba (Ejemplo 2) por alimentación oral forzada con un volumen de dosis de 2,5 ml/kg de peso corporal. La administración del compuesto es BID (a.m. y p.m.) administrando la primera dosis un día antes de la cirugía (p.m.) y suministrando la segunda dosis la mañana de la cirugía. Los animales no reciben una dosis en la tarde el día de la cirugía. El día después de la cirugía, continua la dosificación BID durante 28 días.

45 Mediciones Aórticas por Ultrasonido: Veintiocho días después de la cirugía, se anestesiaron los animales y experimentaron mediciones abdominales por ultrasonido utilizando la unidad de ultrasonido eSaote MyLab 30 Gold Biosound Ultrasound equipada con una sonda de 7,5 MHz. Debido al desarrollo asimétrico de AAA en modelos de roedores preclínicos con CaCl_2 , se realizan las mediciones arteriales del diámetro exterior y el diámetro luminal (interior) durante el pico de sístole a lo largo tanto de los ejes longitudinal como seccional cruzado para identificar la sección más dilatadas dentro del ROI. Se recolectan las mediciones del perímetro luminal seccional transversal interior (mm) en ese punto para evaluar la eficacia y analizar estadísticamente con el software JMP® 7 (Cary, Carolina del Norte).

Análisis Estadístico: Las mediciones del perímetro luminal se expresan como valores medios $\pm$ DE. Para determinar el porcentaje de inhibición de AAA para los grupos tratados con fármaco, las mediciones del grupo de control ficticio tratado con vehículo representan 100% de inhibición del desarrollo de AAA, mientras que las mediciones del grupo de CaCl_2 tratado con vehículo representan 0% de inhibición del desarrollo de AAA. El análisis estadístico se realiza con el software JMP® 7 (Cary, Carolina del Norte) y se usa la prueba Dunnett para comparaciones estadísticas a través de los grupos de tratamiento. La significancia estadística se acepta con $P < 0,05$.

60 La ventana de la señal de eficacia en el modelo de aneurisma aórtico abdominal inducido por CaCl_2 se determina por el perímetro luminal de la aorta en ratones tratados con gasa remojada con solución salina seguido por dosificación durante 4 semanas con el vehículo que determina 100% de eficacia ("Vehículo Ficticio") y el perímetro luminal de la aorta en ratones tratados con gasa remojada con CaCl_2 seguido por dosificación durante 4 semanas con el vehículo ("vehículo") que determina 0% de eficacia.

5 Siguiendo un protocolo esencialmente como el descrito anteriormente, usando ratones 129SvEv, se reduce estadísticamente el perímetro luminal de la aorta (Tabla 1), comparado con ratones tratados con vehículo, usando el compuesto del Ejemplo 2, y evidencia que el compuesto del Ejemplo 2 reduce AAA en este modelo animal.

Tabla 1. Reducción del porcentaje (%) *in vivo* de AAA en ratones

Grupo	% Reducido ($\pm$ DE)	Valor P
Vehículo	0% $\pm$ 9	
10 mg/kg b.i.d.	41% $\pm$ 13	pH = 0,0522
30 mg/kg b.i.d.	48% $\pm$ 10	p = 0,0179
60 mg/kg b.i.d.	58% $\pm$ 13	p = 0,0028
Ficticio	100% $\pm$ 8	p = <0,0001

10 En un diseño similar de estudio, se evalúa la capacidad del compuesto del Ejemplo 2 para modular la dilatación de la aneurisma aórtico después de la lesión inducida por CaCl₂ en ratas Sprague-Dawley. El perímetro luminal de la aorta se reduce estadísticamente, en comparación con las ratas tratadas con el vehículo (Tabla 2), y evidencia que el compuesto del Ejemplo 2 reduce AAA.

Tabla 2. Reducción del porcentaje (%) *in vivo* de AAA en ratas

Grupo	% Reducido ($\pm$ DE)	Valor P
Vehículo	0% $\pm$ 7	
3 mg/kg b.i.d.	46% $\pm$ 7	p=0,0001
10 mg/kg b.i.d.	69% $\pm$ 4	p=<0,0001
30 mg/kg b.i.d.	85% $\pm$ 5	p=<0,0001
60 mg/kg b.i.d.	69% $\pm$ 10	p=<0,0001
Ficticio	100% $\pm$ 6	p=<0,0001

15 Modelo de aterosclerosis de arco braquiocefálico de ratón LDLr KO

El compuesto del Ejemplo 2 se prueba en el modelo de ratón inactivado genéticamente del receptor de lipoproteína de baja densidad (LDL) (LDLr KO) de aterosclerosis. Los ratones deficientes en la capacidad para codificar y sintetizar al receptor de LDL (LDLr KO) son hipercolesterolémicos, especialmente cuando se mantienen con una dieta alta en colesterol, Ishibashi y colaboradores J. Clin. Invest. (1994), 93: 1885-1893. En las arterias grandes, los ratones LDLr KO desarrollan lesiones ateroscleróticas espontáneas que imitan las características principales de la composición de la matriz celular, lipídica y extracelular de lesiones humanas. Un constituyente importante tanto de las lesiones humanas como de ratones es el macrófago cargado de lípido o "célula espumosa" en el subendotelio arterial. El colesterol esterificado almacenado por macrófagos es un sustituto para el desarrollo de lesiones. El ensayo de colesterol esterificado directamente del tejido arterial del ratón (por LC/MS) proporciona un índice rápido de carga de la lesión. El modelo LDLr KO utilizado en el presente estudio toma ventaja del rápido desarrollo de las placas ateroscleróticas maduras en la arteria braquiocefálica (BCA). Los puntos finales primarios para el estudio son el contenido de colesterol éster arterial y las dimensiones de la lesión obtenidas por mediciones con microscopio de luz de las lesiones en sección transversales seriales de la arteria.

Los ratones LDLr KO (JAX 002207), machos de 7 semanas de edad, se obtuvieron a través de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine). Después del arribo a las instalaciones de prueba y continuando durante un total de 10 semanas, los ratones fueron hospedados individualmente y alimentados con la dieta aterogénica TD.88137 (Teklad) a voluntad. Durante las primeras 6 semanas, los ratones descansaron tranquilamente en sus jaulas. Durante las últimas 4 semanas, los ratones recibieron el compuesto de prueba dos veces al día mediante alimentación oral forzada. Los datos de las evaluaciones se reportan en la Tabla 3, abajo.

Tabla 3: El área de la lesiones de aterosclerosis de la BCA de ratón LDLr KO ilustra la reducción que depende de la dosis en puntos finales de aterosclerosis. Las comparaciones entre grupos de tratamiento se hicieron con un ANOVA de una sola vía seguido por la prueba de Dunnett.

	Vehículo	3mg/kg BID Ejemplo 2	10 mg/kg BID Ejemplo 2	30 mg/kg BID Ejemplo 2
Área de la lesión (mm ²)	50.686	23.737	21.247	17.090
Área de la lesión vs. vehículo		-53%* (p<0,049)	-58%* (p<0,034)	-66%* (p<0,017)
Colesterol éster (nmoles)	22,50	17,95	16,97	14,51
Colesterol éster vs. vehículo		-8% (p=NS)	-18% (p<0,09)	-23%* (p<0,04)
Área de macrófagos (color marrón, mm ²)	18.571	6.515	2.864	8.520
Área de macrófagos vs. vehículo		-65%* (p<0,02)	-84%* (p<0,002)	-54% (p<0,09)
AUC (ng·h/ml)		1.106	5.375	12.849

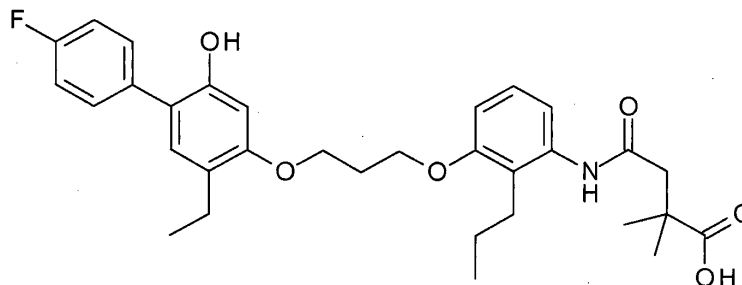
La Tabla 3 muestra que el compuesto del Ejemplo 2 con 30 mg/kg de dosificación b.i.d redujo el contenido del colesteriléster (CE) de la BCA en un 23% comparado con el grupo tratado con vehículo ($p < 0,04$). El compuesto del Ejemplo 2 con 10 mg/kg b.i.d, aunque menos efectivo que 30 mg/kg b.i.d., redujo el contenido de CE en un 18% comparado con el tratamiento con vehículo ($p < 0,09$). La tendencia hacia una reducción significativa de aterosclerosis de BCA sugiere que estos datos sustitutos se confirma y se extiende por la medición directa de las lesiones de BCA. La Tabla 3 muestra una reducción significativa en el área de la lesión producida por el compuesto del Ejemplo 2 con 30 mg/kg de dosificación oral b.i.d. El tratamiento con esta dosis da como resultado una reducción del área de la lesión de 66% comparado con el tratamiento del vehículo solo ($p < 0,017$). La reducción del 58% y 53% en el área de la lesión producida por el compuesto del Ejemplo 2 con 10mg/kg b.i.d y 3 mg/kg b.i.d. de dosificación, respectivamente, ilustra un efecto similar de respuesta a la dosis en comparación con el efecto sobre BCA del contenido de CE.

Listado de secuencias

15 <110> Eli Lilly and Company
 <120> COMPUESTO ANTAGONISTA DEL LEUKOTRIENO B4
 <130> X19559
 20 <150> 61/584975
 <151> 2012-01-10
 <150> 61/585799
 25 <151> 2012-01-12
 <160> 1
 <170> PatentIn versión 3.5
 30 <210> 1
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> constructo sintético
 <400> 1
 40 taatgtaggt aatagttcaa taggtcaaag gg 32

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de Fórmula (I)



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. Un compuesto de la reivindicación 1 que es 4-[[3-[3-[2-etil-4-(4-fluorofenil)-5-hidroxi-fenoxi]propoxi]-2-propilfenil]amino]-2,2-dimetil-4-oxo-butanoato de sodio.

3. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 y un portador farmacéuticamente aceptable.

4. Un compuesto de la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en terapia.

5. Un compuesto de la reivindicación 2, para su uso en terapia.

6. Un compuesto de la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de aneurisma aórtico abdominal, aterosclerosis o ambos.

7. Un compuesto de la reivindicación 2, para su uso en el tratamiento de aneurisma aórtico abdominal, aterosclerosis o ambos.