

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

ENTRADA EN FASE NACIONAL

21. EXPEDIENTE No.

06-117703

54. TITULO DERIVADOS HETEROCICLICOS PARA TRATAMIENTO DE HIPERLIPIDEMIA Y
ENFERMEDADES RELACIONADAS

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL A 61K 31/4706

71. SOLICITANTE AVANIR PHARMACEUTICALS

DOMICILIO SAN DIEGO, CALIFORNIA, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. APODERADO JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

22. SANTAFE DE BOGOTA, D.C.

PETITORIO

AS: 102.483



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-117703-00000-0000
Fec: 2005-11-21 16:22:46 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra. 11 PATENTEYH
Eva. 376 FASE NACIONAL
Act. 111 PRESENTACION Fec: 195

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE

PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

09/01/07

1 SOLICITUD DE:			
☒ Patente de Invención.		☐ Patente de Modelo de Utilidad.	
☒ Capítulo I.		☐ Capítulo II.	
2 SOLICITANTE (71)	Nombre: AVANIR PHARMACEUTICALS Dirección: 11388 Sorrento Valley Road, Suite 200, San Diego, California 92121, US Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América Lugar de Constitución: Estados Unidos de América Teléfono: Fax E-mail		IDENTIFICACION C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número _____
3 REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO Dirección: Cra. 7 No. 71-21, Torre B, Piso 4 Teléfono: 744-2200 Fax: 742-2200 E-mail:		IDENTIFICACION C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número 80 410.337 TP 57492
4 INVENTOR (ES) (72)	Nombre: Jagadish C. SIRCAR, Richard J. THOMAS, Haripada KHATUYA, Igor NIKOULIN Dirección: 4832 Riding Ridge Road, San Diego, CA 92130, US; 12627 Sarsaparilla Street, San Diego, CA 92129, US; 13624 Via Cima Bella, San Diego, CA 92129, US; 3845 Elijah Court, #635, San Diego, CA 92130, Estados Unidos de América (Respectivamente) Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América (Respectivamente)		
5 PCT (86) Solicitud Internacional No. <u>PCT/US2005/020660</u> Fecha <u>09-06-2005</u> Publicación Internacional No. <u>WO/2005/123888 A1</u> Fecha <u>29-12-2005</u>			
6 Título (54): <u>DERIVADOS HETEROCÍCLICOS PARA TRATAMIENTO DE HIPERLIPIDEMIA Y ENFERMEDADES RELACIONADAS</u>			
7 Clasificación Internacional (51) <u>A61K 31/4706</u>			
8 Prioridad	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
SI ☒ NO ☐	US	09-06-2004	60/578,227
9 Comprobante de pago No. <u>06-76.645</u> Fecha <u>20-11-2008</u>			

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

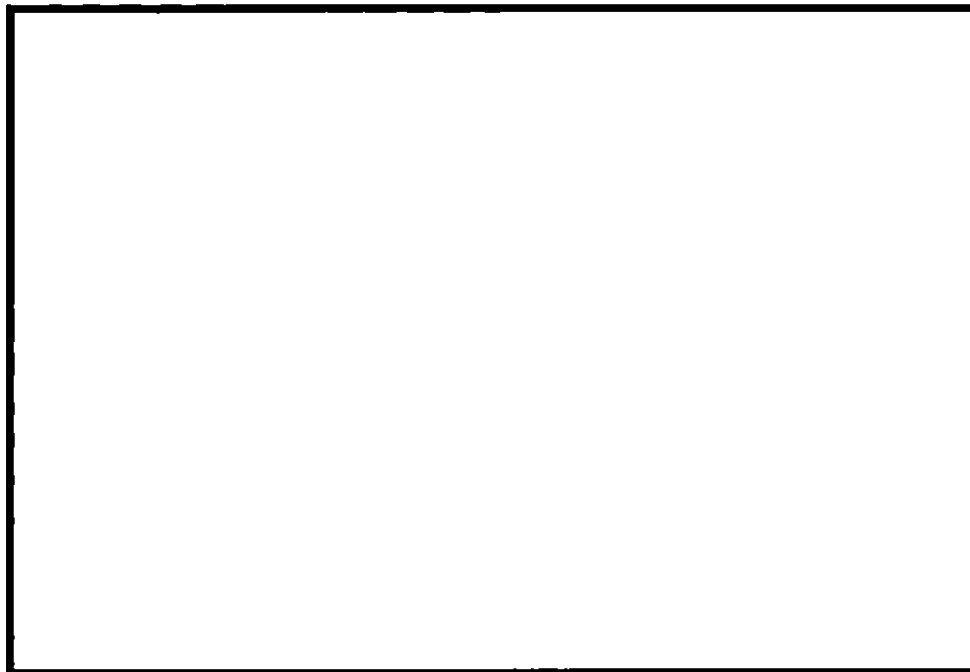
10

ANEXOS

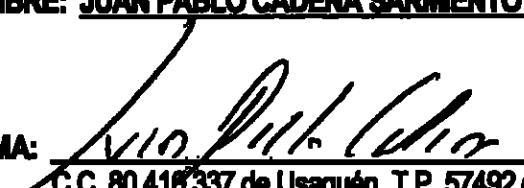
2

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. \$443.000
- ☒ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros: Documentos PCT
Tarjeta de propietarios

11 FIGURA CARACTERÍSTICA:



12 Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: JUAN PABLO CADENA SARMIENTOFIRMA: 

C.C. 80.416.337 de Usaquén T.P. 57492 del C.S.J.

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página.

Ab 102.423

3

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 08-117703- 00000-0000
Fec: 2005-11-21 16:22:46 Dep. 2080 NUECREACIONE
Tta. 11 PATENTEYII
Ene: 376 FASENACIONALI
Adi 411 PRESENTACION Folios: 126

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 76,645
FECHA : OCTUBRE 4 DE 2004

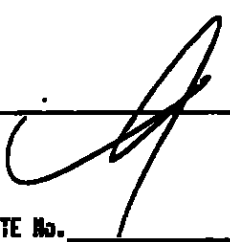
***** CONSIGNACION *****

POSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	58188063	04/10/2004	32,840,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
1		TRANITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	463,000.00
		TOTAL :	463,000.00

CON: CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
TRANSMITTAL OF COPY OF INTERNATIONAL
APPLICATION AS PUBLISHED OR REPUBLISHED

To:

DELANEY, Karoline, A.
Knobbe, Martens, Olson & Bear, LLP
2040 Main Street, 14th Floor
Irvine, CA 92614
ETATS-UNIS D'AMERIQUEDate of mailing (day/month/year)
29 December 2005 (29.12.2005)Applicant's or agent's file reference
AVANIR.138VP

IMPORTANT NOTICE

International application No.
PCT/US2005/020660International filing date (day/month/year)
09 June 2005 (09.06.2005)Priority date (day/month/year)
09 June 2004 (09.06.2004)

Applicant

AVANIR PHARMACEUTICALS et al

The International Bureau transmits herewith the following documents:

- ☒ copy of the international application as published by the International Bureau on 29 December 2005 (29.12.2005) under No. WO 2005/123686
- ☐ copy of international application as republished by the International Bureau on under No. WO
For an explanation as to the reason for this republication of the international application, reference is made to INID codes (15), (48) or (88) (as the case may be) on the front page of the attached document.

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Dorothee Mülhausen

Facsimile No. +41 22 740 14 35

Facsimile No. +41 22 338 87 40

Form PCT/IB/311 (January 2004)

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
29 December 2005 (29.12.2005)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/123686 A1

(51) International Patent Classification: C07D 215/54,
207/34, 231/14, 401/04, A61K 31/4706, 31/40, 31/415,
A61P 3/00

(74) Agent: DELANEY, Karoline, A.; Knobbe, Martens, Ol-
son & Bear, LLP, 2040 Main Street, 14th Floor, Irvine, CA
92614 (US).

(21) International Application Number:
PCT/US2005/020660

(22) International Filing Date: 9 June 2005 (09.06.2005)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/578,227 9 June 2004 (09.06.2004) US

(71) Applicant (for all designated States except US): AVANIR
PHARMACEUTICALS [US/US]; 11388 Sorrento Valley
Road, Suite 200, San Diego, CA 92121 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): SIRCAR, Jagadish,
C. [US/US]; 4832 Riding Ridge Road, San Diego, CA
92130 (US). THOMAS, Richard, J. [US/US]; 12627 Sar-
saparilla Street, San Diego, CA 92129 (US). KHATUYA,
Haripada [IN/US]; 13624 Via Cima Bella, San Diego,
CA 92129 (US). NIKOULIN, Igor [RU/US]; 3845 Elijah
Court, #635, San Diego, CA 92130 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA,
MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,
OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO,
SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN,
GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
with international search report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: HETEROCYCLIC DERIVATIVES FOR TREATMENT OF HYPERLIPIDEMIA AND RELATED DISEASES

(57) Abstract: The present invention provides compositions adapted to enhance reverse cholesterol transport in mammals. The compositions are suitable for oral delivery and useful in the treatment and/or prevention of hypercholesterolemia, atherosclerosis and associated cardiovascular diseases.

WO 2005/123686 A1

HETEROCYCLIC DERIVATIVES FOR TREATMENT OF HYPERLIPIDEMIA AND RELATED DISEASES

Cross-Reference to Related Application

[0001] This application claims priority under 35 U.S.C. § 119(e) to U.S. Provisional Application No. 60/578,227, filed June 9, 2004, which is incorporated herein by reference.

Background of the Invention

Field of the Invention

[0002] The invention relates to small molecule mediators of reverse cholesterol transport (RCT) for treating hypercholesterolemia and associated cardiovascular diseases and other diseases.

Description of the Related Art

[0003] It is now well-established that elevated serum cholesterol ("hypercholesterolemia") is a causal factor in the development of atherosclerosis, a progressive accumulation of cholesterol within the arterial walls. Hypercholesterolemia and atherosclerosis are leading causes of cardiovascular diseases, including hypertension, coronary artery disease, heart attack and stroke. About 1.1 million individuals suffer from heart attack each year in the United States alone, the costs of which are estimated to exceed \$117 billion. Although there are numerous pharmaceutical strategies for lowering cholesterol levels in the blood, many of these have undesirable side effects and have raised safety concerns. Moreover, none of the commercially available drug therapies adequately stimulate reverse cholesterol transport, an important metabolic pathway that removes cholesterol from the body.

[0004] Circulating cholesterol is carried by plasma lipoproteins – particles of complex lipid and protein composition that transport lipids in the blood. Low density lipoproteins (LDLs), and high density lipoproteins (HDLs) are the major cholesterol carriers. LDLs are believed to be responsible for the delivery of cholesterol from the liver (where it is synthesized or obtained from dietary sources) to extrahepatic tissues in the body. The term "reverse cholesterol transport" describes the transport of cholesterol from extrahepatic tissues to the liver where it is catabolized and eliminated. It is believed that plasma HDL particles play a major role in the reverse transport process, acting as scavengers of tissue cholesterol.

[0005] Compelling evidence supports the concept that lipids deposited in atherosclerotic lesions are derived primarily from plasma LDL; thus, LDLs have popularly become known as the "bad" cholesterol. In contrast, plasma HDL levels correlate inversely with coronary heart disease – indeed, high plasma levels of HDL are regarded as a negative risk factor. It is hypothesized that high levels of plasma HDL are not only protective against coronary artery disease, but may actually induce regression of atherosclerotic plaques (e.g. see Badimon *et al.*, 1992, *Circulation* 86 (Suppl. III)86-94). Thus, HDLs have popularly become known as the "good" cholesterol.

[0006] The amount of intracellular cholesterol liberated from the LDLs controls cellular cholesterol metabolism. The accumulation of cellular cholesterol derived from LDLs controls three processes: (1) it reduces cellular cholesterol synthesis by turning off the synthesis of HMGCoA reductase, a key enzyme in the cholesterol biosynthetic pathway; (2) the incoming LDL-derived cholesterol promotes storage of cholesterol by activating LCAT, the cellular enzyme which converts cholesterol into cholesteryl esters that are deposited in storage droplets; and (3) the accumulation of cholesterol within the cell drives a feedback mechanism that inhibits cellular synthesis of new LDL receptors. Cells, therefore, adjust their complement of LDL receptors so that enough cholesterol is brought in to meet their metabolic needs, without overloading. (For a review, see Brown & Goldstein, In: *The Pharmacological Basis Of Therapeutics*, 8th Ed., Goodman & Gilman, Pergamon Press, NY, 1990, Ch. 36, pp. 874-896).

[0007] Reverse cholesterol transport (RCT) is the pathway by which peripheral cell cholesterol can be returned to the liver for recycling to extrahepatic tissues, or excreted into the intestine as bile. The RCT pathway represents the only means of eliminating cholesterol from most extrahepatic tissues. The RCT consists mainly of three steps: (1) cholesterol efflux, the initial removal of cholesterol from peripheral cells; (2) cholesterol esterification by the action of lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT), preventing a re-entry of effluxed cholesterol into the peripheral cells; and (3) uptake/delivery of HDL cholesteryl ester to liver cells. LCAT is the key enzyme in the RCT pathway and is produced mainly in the liver and circulates in plasma associated with the HDL fraction. LCAT converts cell derived cholesterol to cholesteryl esters which are sequestered in HDL destined for removal. The RCT pathway is mediated by HDLs.

[0008] HDL is a generic term for lipoprotein particles which are characterized by their high density. The main lipidic constituents of HDL complexes are various phospholipids,

cholesterol (ester) and triglycerides. The most prominent apolipoprotein components are A-I and A-II which determine the functional characteristics of HDL.

[0009] Each HDL particle contains at least one copy (and usually two to four copies) of apolipoprotein A-I (ApoA-I). ApoA-I is synthesized by the liver and small intestine as preapoapolipoprotein which is secreted as a proprotein that is rapidly cleaved to generate a mature polypeptide having 243 amino acid residues. ApoA-I consists mainly of 6 to 8 different 22 amino acid repeats spaced by a linker moiety which is often proline, and in some cases consists of a stretch made up of several residues. ApoA-I forms three types of stable complexes with lipids: small, lipid-poor complexes referred to as pre-beta-1 HDL; flattened discoidal particles containing polar lipids (phospholipid and cholesterol) referred to as pre-beta-2 HDL; and spherical particles containing both polar and nonpolar lipids, referred to as spherical or mature HDL (HDL₃ and HDL₂). Although most HDL in circulation contains both ApoA-I and ApoA-II, the fraction of HDL which contains only ApoA-I (AI-HDL) appears to be more effective in RCT. Epidemiologic studies support the hypothesis that AI-HDL is anti-atherogenic. (Parra *et al.*, 1992, *Arterioscler. Thromb.* 12:701-707; Decossin *et al.*, 1997, *Eur. J. Clin. Invest.* 27:299-307).

[0010] Several lines of evidence based on data obtained in vivo implicate the HDL and its major protein component, ApoA-I, in the prevention of atherosclerotic lesions, and potentially, the regression of plaques--making these attractive targets for therapeutic intervention. First, an inverse correlation exists between serum ApoA-I (HDL) concentration and atherogenesis in man (Gordon & Rifkind, 1989, *N. Eng. J. Med.* 321:1311-1316; Gordon *et al.*, 1989, *Circulation* 79:8-15). Indeed, specific subpopulations of HDL have been associated with a reduced risk for atherosclerosis in humans (Miller, 1987, *Amer. Heart* 113:589-597; Cheung *et al.*, 1991, *Lipid Res.* 32:383-394); Fruchart & Ailhaud, 1992, *Clin. Chem.* 38:79).

[0011] Second, animal studies support the protective role of ApoA-I (HDL). Treatment of cholesterol fed rabbits with ApoA-I or HDL reduced the development and progression of plaque (fatty streaks) in cholesterol-fed rabbits (Koizumi *et al.*, 1988, *J. Lipid Res.* 29:1405-1415; Badimon *et al.*, 1989, *Lab. Invest.* 60:455-461; Badimon *et al.*, 1990, *J. Clin. Invest.* 85:1234-1241). However, the efficacy varied depending upon the source of HDL (Beitz *et al.*, 1992, *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 47:149-152; Mezdour *et al.*, 1995, *Atherosclerosis* 113:237-246).

[0012] Third, direct evidence for the role of ApoA-I was obtained from experiments involving transgenic animals. The expression of the human gene for ApoA-I transferred to mice genetically predisposed to diet-induced atherosclerosis protected against the development of aortic lesions (Rubin *et al.*, 1991, *Nature* 353:265-267). The ApoA-I transgene was also shown to suppress atherosclerosis in ApoE-deficient mice and in Apo(a) transgenic mice (Paszty *et al.*, 1994, *J. Clin. Invest.* 94:899-903; Plump *et al.*, 1994, *PNAS. USA* 91:9607-9611; Liu *et al.*, 1994, *J. Lipid Res.* 35:2263-2266). Similar results were observed in transgenic rabbits expressing human ApoA-I (Duverger, 1996, *Circulation* 94:713-717; Duverger *et al.*, 1996, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16:1424-1429), and in transgenic rats where elevated levels of human ApoA-I protected against atherosclerosis and inhibited restenosis following balloon angioplasty (Burkey *et al.*, 1992, *Circulation*, Supplement 1, 86:I-472, Abstract No. 1876; Burkey *et al.*, 1995, *J. Lipid Res.* 36:1463-1473).

Current Treatments for Hypercholesterolemia and other Dyslipidemias

[0013] In the past two decades or so, the segregation of cholesterolemic compounds into HDL and LDL regulators and recognition of the desirability of decreasing blood levels of LDL has led to the development of a number of drugs. However, many of these drugs have undesirable side effects and/or are contraindicated in certain patients, particularly when administered in combination with other drugs. These drugs and therapeutic strategies include:

- (1) bile-acid-binding resins, which interrupt the recycling of bile acids from the intestine to the liver [e.g., cholestyramine (QUESTRAN LIGHT, Bristol-Myers Squibb), and colestipol hydrochloride (COLESTID, Pharmacia & Upjohn Company)];
- (2) statins, which inhibit cholesterol synthesis by blocking HMGCoA reductase— the key enzyme involved in cholesterol biosynthesis [e.g., lovastatin (MEVACOR, Merck & Co., Inc.), a natural product derived from a strain of *Aspergillus*, pravastatin (PRAVACHOL, Bristol-Myers Squibb Co.), and atorvastatin (LIPITOR, Warner Lambert)];
- (3) niacin is a water-soluble vitamin B-complex which diminishes production of VLDL and is effective at lowering LDL;
- (4) fibrates are used to lower serum triglycerides by reducing the VLDL fraction and may in some patient populations give rise to modest reductions of plasma cholesterol via the same

mechanism [e.g., clofibrate (ATROMID-S, Wyeth-Ayerst Laboratories), and gemfibrozil (LOPID, Parke-Davis)];

(5) estrogen replacement therapy may lower cholesterol levels in post-menopausal women;

(6) long chain alpha,omega-dicarboxylic acids have been reported to lower serum triglyceride and cholesterol (See, e.g., Bisgaier et al., 1998, *J. Lipid Res.* 39:17-30; WO 98/30530; U.S. Pat. No. 4,689,344; WO 99/00116; U.S. Pat. No. 5,756,344; U.S. Pat. No. 3,773,946; U.S. Pat. No. 4,689,344; U.S. Pat. No. 4,689,344; U.S. Pat. No. 4,689,344; and U.S. Pat. No. 3,930,024);

(7) other compounds including ethers (See, e.g., U.S. Pat. No. 4,711,896; U.S. Pat. No. 5,756,544; U.S. Pat. No. 6,506,799), phosphates of dolichol (U.S. Pat. No. 4,613,593), and azolidinedione derivatives (U.S. Pat. No. 4,287,200) are disclosed as lowering serum triglyceride and cholesterol levels.

[0014] None of these currently available drugs for lowering cholesterol safely elevate HDL levels and stimulate RCT. Indeed, most of these current treatment strategies appear to operate on the cholesterol transport pathway, modulating dietary intake, recycling, synthesis of cholesterol, and the VLDL population.

ApoA-I Agonists for Treatment of Hypercholesterolemia

[0015] In view of the potential role of HDL, i.e., both ApoA-I and its associated phospholipid, in the protection against atherosclerotic disease, human clinical trials utilizing recombinantly produced ApoA-I were commenced, discontinued and apparently re-commenced by UCB Belgium (Pharmaprojects, Oct. 27, 1995; IMS R&D Focus, Jun. 30, 1997; Drug Status Update, 1997, *Atherosclerosis* 2(6):261-265); see also M. Eriksson at Congress, "The Role of HDL in Disease Prevention," Nov. 7-9, 1996, Fort Worth; Lacko & Miller, 1997, *J. Lip. Res.* 38:1267-1273; and WO 94/13819) and were commenced and discontinued by Bio-Tech (Pharmaprojects, Apr. 7, 1989). Trials were also attempted using ApoA-I to treat septic shock (Opal, "Reconstituted HDL as a Treatment Strategy for Sepsis," IBC's 7th International Conference on Sepsis, Apr. 28-30, 1997, Washington, D.C.; Gouni et al., 1993, *J. Lipid Res.* 94:139-146; Levine, WO 96/04916). However, there are many pitfalls associated with the production and use of ApoA-I, making it less than ideal as a drug; e.g., ApoA-I is a large protein that is difficult and expensive to produce;

significant manufacturing and reproducibility problems must be overcome with respect to stability during storage, delivery of an active product and half-life in vivo.

[0016] In view of these drawbacks, attempts have been made to prepare peptides that mimic ApoA-I. Since the key activities of ApoA-I have been attributed to the presence of multiple repeats of a unique secondary structural feature in the protein – a class A amphipathic α -helix (Segrest, 1974, *FEBS Lett.* 38:247-253; Segrest *et al.*, 1990, *PROTEINS: Structure, Function and Genetics* 8:103-117), most efforts to design peptides which mimic the activity of ApoA-I have focused on designing peptides which form class A-type amphipathic α -helices (See e.g., Background discussions in U.S. Pat. Nos. 6,376,464 and 6,506,799; incorporated herein in their entirety by reference thereto).

[0017] In one study, Fukushima *et al.* synthesized a 22-residue peptide composed entirely of Glu, Lys and Leu residues arranged periodically so as to form an amphipathic α -helix with equal-hydrophilic and hydrophobic faces ("ELK peptide") (Fukushima *et al.*, 1979, *J. Amer. Chem. Soc.* 101(13):3703-3704; Fukushima *et al.*, 1980, *J. Biol. Chem.* 255:10651-10657). The ELK peptide shares 41% sequence homology with the 198-219 fragment of ApoA-I. The ELK peptide was shown to effectively associate with phospholipids and mimic some of the physical and chemical properties of ApoA-I (Kaiser *et al.*, 1983, *PNAS USA* 80:1137-1140; Kaiser *et al.*, 1984, *Science* 223:249-255; Fukushima *et al.*, 1980, *supra*; Nakagawa *et al.*, 1985, *J. Am. Chem. Soc.* 107:7087-7092). A dimer of this 22-residue peptide was later found to more closely mimic ApoA-I than the monomer; based on these results, it was suggested that the 44-mer, which is punctuated in the middle by a helix breaker (either Gly or Pro), represented the minimal functional domain in ApoA-I (Nakagawa *et al.*, 1985, *supra*).

[0018] Another study involved model amphipathic peptides called "LAP peptides" (Pownall *et al.*, 1980, *PNAS USA* 77(6):3154-3158; Sparrow *et al.*, 1981, In: *Peptides: Synthesis-Structure-Function*, Roch and Gross, Eds., Pierce Chem. Co., Rockford, IL, 253-256). Based on lipid binding studies with fragments of native apolipoproteins, several LAP peptides were designed, named LAP-16, LAP-20 and LAP-24 (containing 16, 20 and 24 amino acid residues, respectively). These model amphipathic peptides share no sequence homology with the apolipoproteins and were designed to have hydrophilic faces organized in a manner unlike the class A-type amphipathic helical domains associated with apolipoproteins (Segrest *et al.*, 1992, *J. Lipid Res.* 33:141-166).

From these studies, the authors concluded that a minimal length of 20 residues is necessary to confer lipid-binding properties to model amphipathic peptides.

[0019] Studies with mutants of LAP20 containing a proline residue at different positions in the sequence indicated that a direct relationship exists between lipid binding and LCAT activation, but that the helical potential of a peptide alone does not lead to LCAT activation (Ponsin *et al.*, 1986, *J. Biol. Chem.* 261(20):9202-9205). Moreover, the presence of this helix breaker (Pro) close to the middle of the peptide reduced its affinity for phospholipid surfaces as well as its ability to activate LCAT. While certain of the LAP peptides were shown to bind phospholipids (Sparrow *et al.*, *supra*), controversy exists as to the extent to which LAP peptides are helical in the presence of lipids (Buchko *et al.*, 1996, *J. Biol. Chem.* 271(6):3039-3045; Zhong *et al.*, 1994, *Peptide Research* 7(2):99-106).

[0020] Segrest *et al.* have synthesized peptides composed of 18 to 24 amino acid residues that share no sequence homology with the helices of ApoA-I (Kannelis *et al.*, 1980, *J. Biol. Chem.* 255(3):11464-11472; Segrest *et al.*, 1983, *J. Biol. Chem.* 258:2290-2295). The sequences were specifically designed to mimic the amphipathic helical domains of class A exchangeable apolipoproteins in terms of hydrophobic moment (Eisenberg *et al.*, 1982, *Nature* 299:371-374) and charge distribution (Segrest *et al.*, 1990, *Proteins* 8:103-117; U.S. Pat. No. 4,643,988). One 18-residue peptide, the "18A" peptide, was designed to be a model class-A α -helix (Segrest *et al.*, 1990, *supra*). Studies with these peptides and other peptides having a reversed charged distribution, like the "18R" peptide, have consistently shown that charge distribution is critical for activity; peptides with a reversed charge distribution exhibit decreased lipid affinity relative to the 18A class-A mimics and a lower helical content in the presence of lipids (Kannelis *et al.*, 1980, *J. Biol. Chem.* 255:11464-11472; Anantharamaiah *et al.*, 1985, *J. Biol. Chem.* 260:10248-10255; Chung *et al.*, 1985, *J. Biol. Chem.* 260:10256-10262; Epand *et al.*, 1987, *J. Biol. Chem.* 262:9389-9396; Anantharamaiah *et al.*, 1991, *Adv. Exp. Med. Biol.* 285:131-140).

[0021] A "consensus" peptide containing 22-amino acid residues based on the sequences of the helices of human ApoA-I has also been designed (Anantharamaiah *et al.*, 1990, *Arteriosclerosis* 10(1):95-105; Venkatachalapathi *et al.*, 1991, *Mol. Conformation and Biol. Interactions, Indian Acad. Sci. B*:585-596). The sequence was constructed by identifying the most prevalent residue at each position of the hypothesized helices of human ApoA-I. Like the peptides described above, the helix formed by this peptide has positively charged amino acid residues.

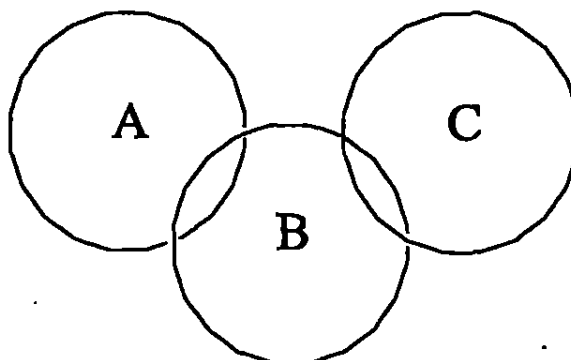
clustered at the hydrophilic-hydrophobic interface, negatively charged amino acid residues clustered at the center of the hydrophilic face and a hydrophobic angle of less than 180° . While a dimer of this peptide is somewhat effective in activating LCAT, the monomer exhibited poor lipid binding properties (Venkatachalapathi *et al.*, 1991, *supra*).

[0022] Based primarily on *in vitro* studies with the peptides described above, a set of "rules" has emerged for designing peptides which mimic the function of ApoA-I. Significantly, it is thought that an amphipathic α -helix having positively charged residues clustered at the hydrophilic-hydrophobic interface and negatively charged amino acid residues clustered at the center of the hydrophilic face is required for lipid affinity and LCAT activation (Venkatachalapathi *et al.*, 1991, *supra*). Anantharamaiah *et al.* have also indicated that the negatively charged Glu residue at position 13 of the consensus 22-mer peptide, which is positioned within the hydrophobic face of the α -helix, plays an important role in LCAT activation (Anantharamaiah *et al.*, 1991, *supra*). Furthermore, Brasseur has indicated that a hydrophobic angle (pho angle) of less than 180° is required for optimal lipid-apolipoprotein complex stability, and also accounts for the formation of discoidal particles having the peptides around the edge of the lipid bilayer (Brasseur, 1991, *J. Biol. Chem.* 66(24):16120-16127). Rosseneu *et al.* have also insisted that a hydrophobic angle of less than 180° is required for LCAT activation (WO 93/25581).

[0023] However, despite the progress in elucidating "rules" for designing ApoA-I agonists, to date the best ApoA-I agonists are reported as having less than 40% of the activity of intact ApoA-I. None of the peptide agonists described in the literature have been demonstrated to be useful as a drug. Thus, there is a need for the development of a stable molecule that mimics the activity of ApoA-I and which is relatively simple and cost-effective to produce. Preferably, candidate molecules would mediate both indirect and direct RCT. Such molecules would be smaller than existing peptide agonists, and have broader functional spectra. However, the "rules" for designing efficacious mediators of RCT have not been fully elucidated and the principles for designing organic molecules with the function of ApoA-I are unknown.

Summary of the Invention

[0024] A mediator of reverse cholesterol transport is disclosed comprising the structure:



[0025] wherein A, B, and C may be in any order, and wherein:

[0026] A comprises an acidic moiety, comprising an acidic group or a bioisostere thereof;

[0027] B comprises an aromatic or lipophilic moiety comprising at least a portion of HMG CoA reductase inhibitor or analog thereof; and

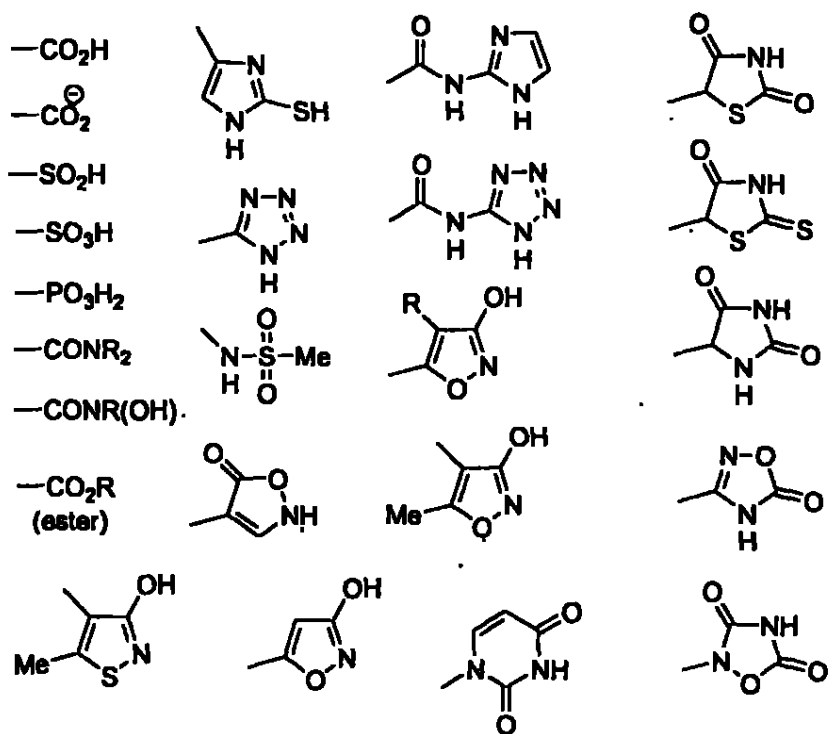
[0028] C comprises a basic moiety, comprising a basic group or a bioisostere thereof.

[0029] Preferably, at least one of the alpha amino or alpha carboxy groups have been removed from their respective amino or carboxy terminal moieties.

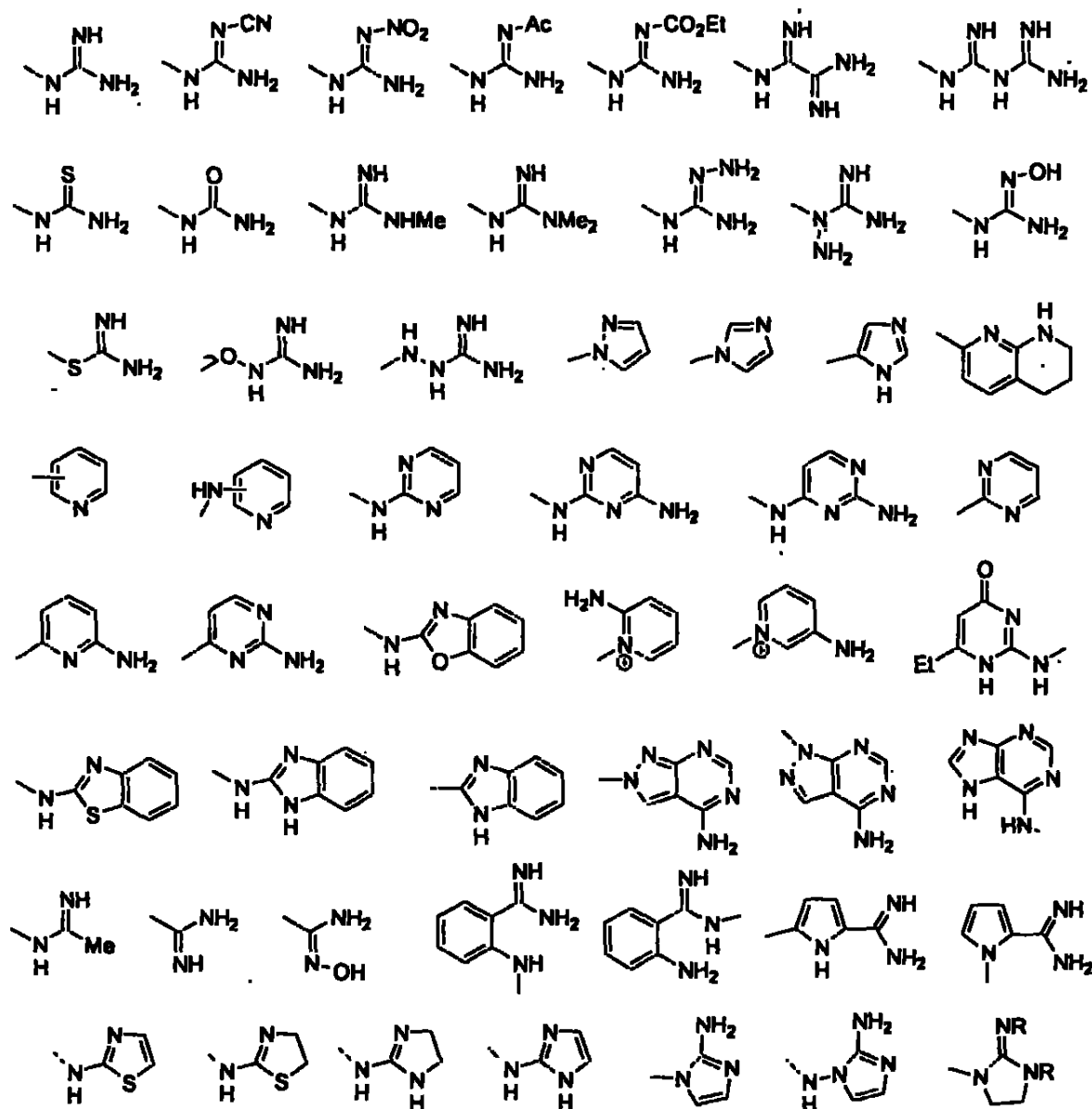
[0030] If not removed, the alpha amino group is preferably capped with a protecting group selected from the group consisting of acetyl, phenylacetyl, benzoyl, pivoyl, 9-fluorenylmethyloxycarbonyl, 2-naphthyl, nicotinic acid, a $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{CO}-$ where n ranges from 3 to 20, di-tert-butyl-4-hydroxy-phenyl, naphthyl, substituted naphthyl, Fmoc, biphenyl, substituted phenyl, substituted heterocycles, alkyl, aryl, substituted aryl, cycloalkyl, fused cycloalkyl, saturated heteroaryl, and substituted saturated heteroaryl.

[0031] If not removed, the alpha carboxy group is preferably capped with a protecting group selected from the group consisting of an amine, such as RNH where $\text{R} = \text{H}$, di-tert-butyl-4-hydroxy-phenyl, naphthyl, substituted naphthyl, Fmoc, biphenyl, substituted phenyl, substituted heterocycles, alkyl, aryl, substituted aryl, cycloalkyl, fused cycloalkyl, saturated heteroaryl, and substituted saturated heteroaryl.

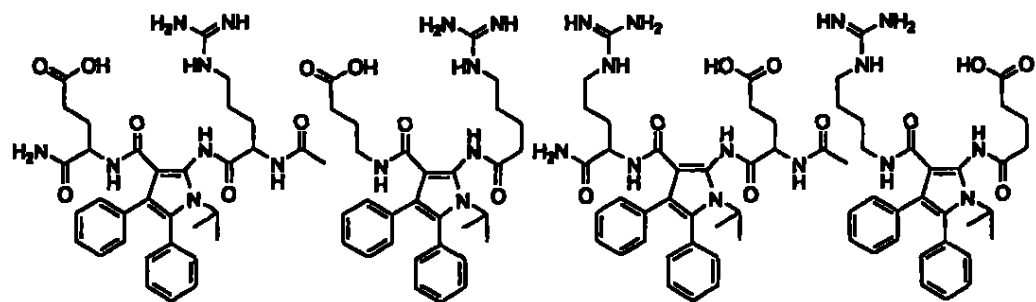
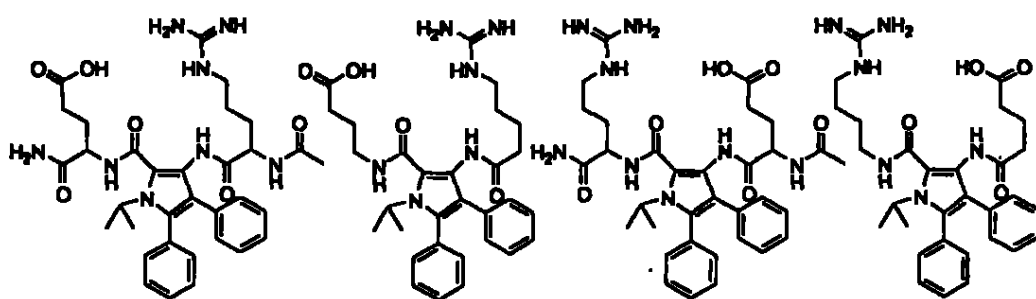
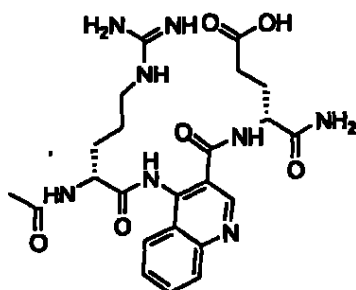
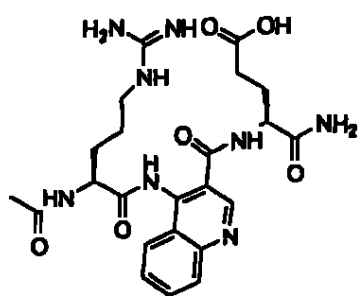
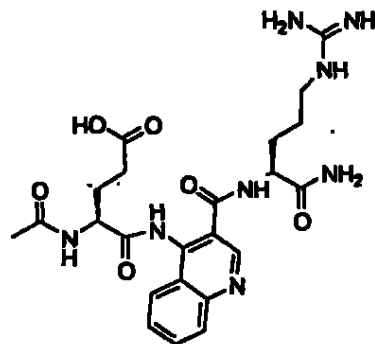
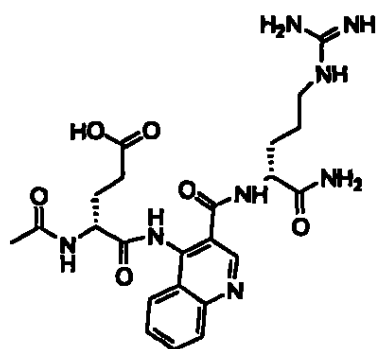
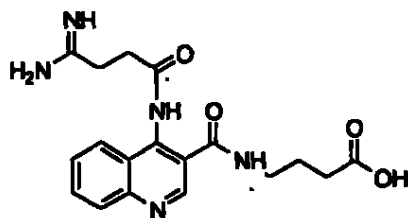
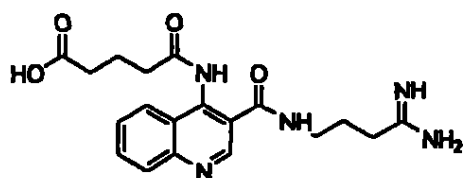
[0032] Bioisosteres of the acidic group may be selected from the group consisting of:



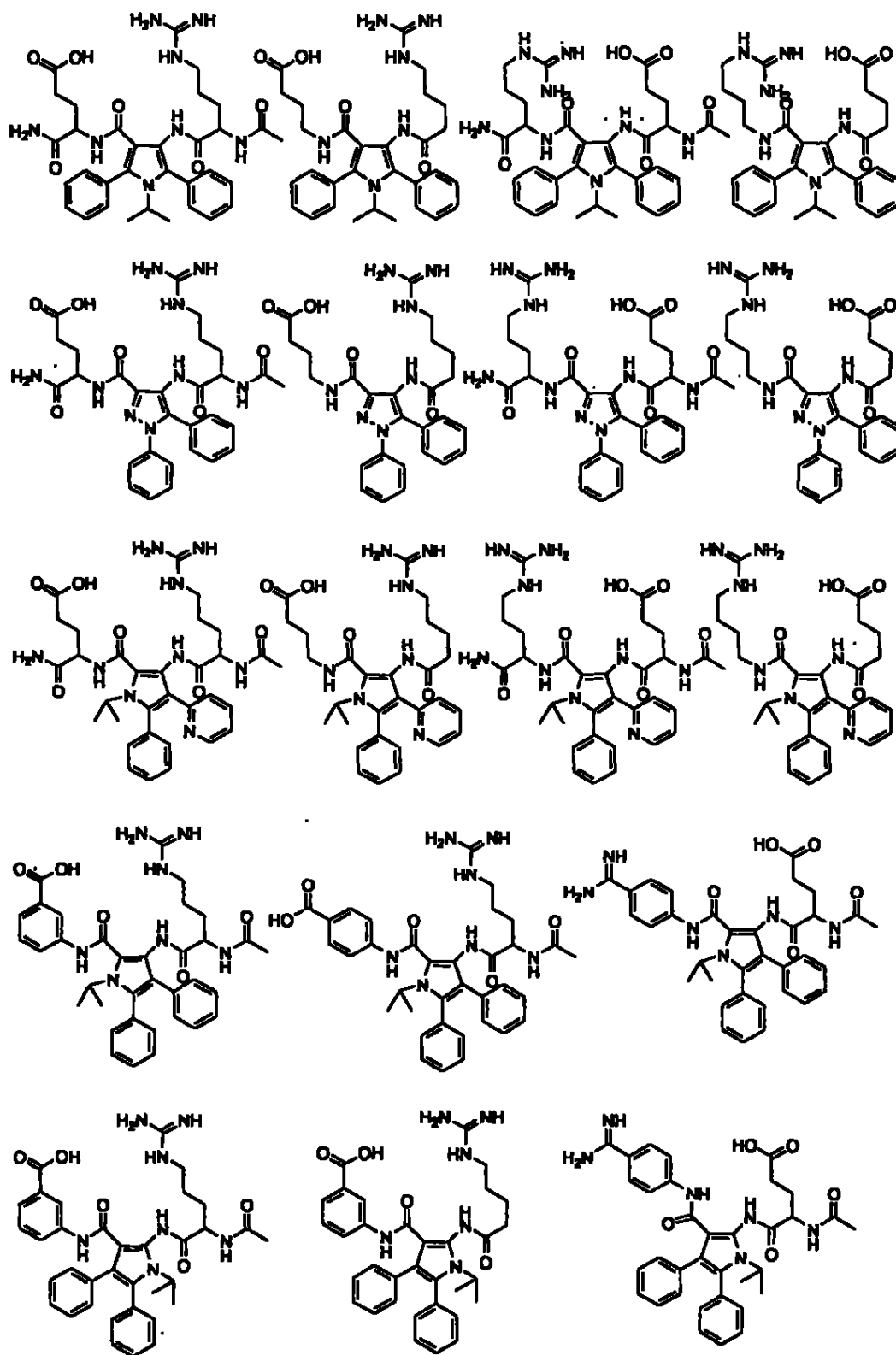
Bioisosteres of the basic group may be selected from the group consisting of:

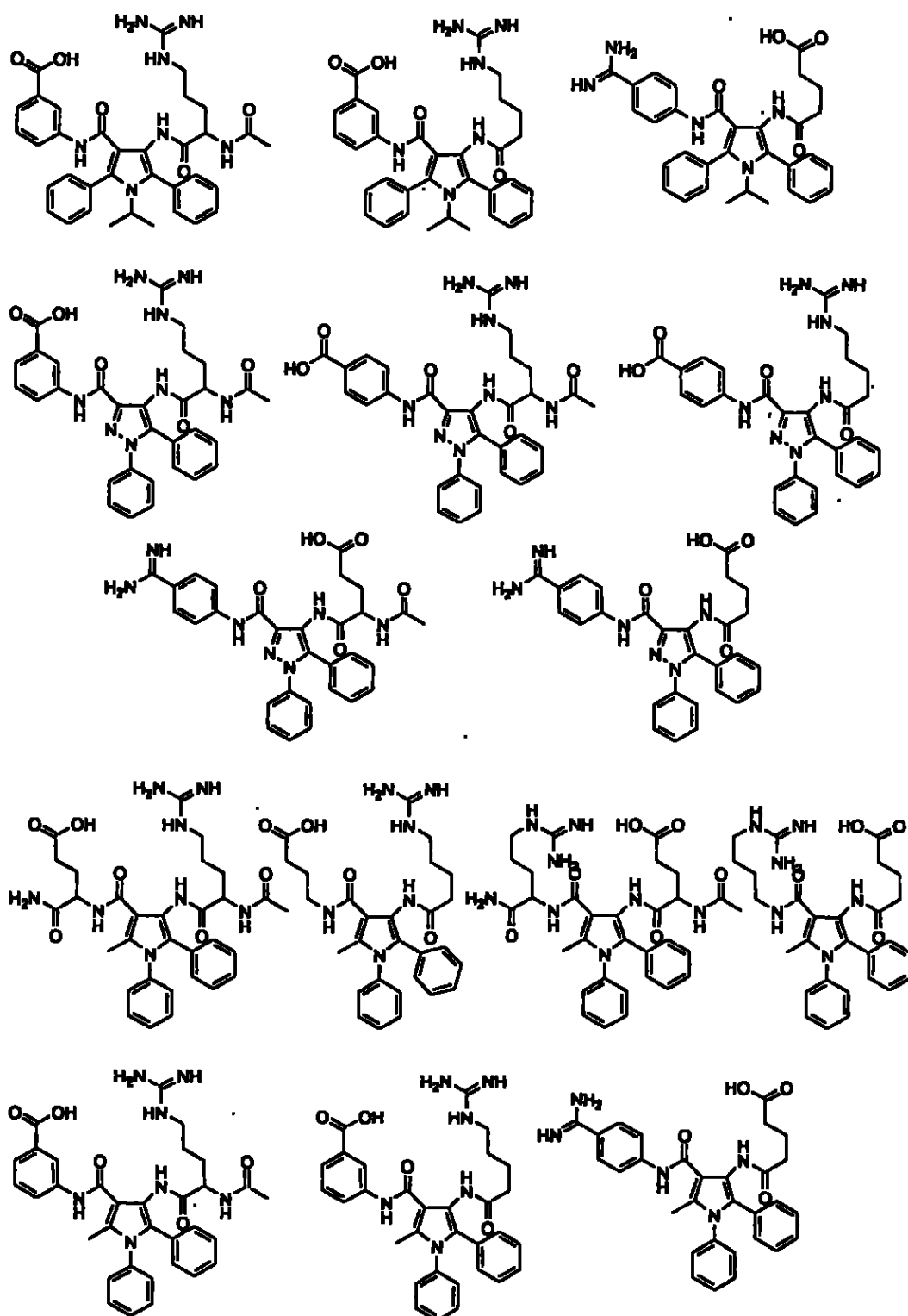


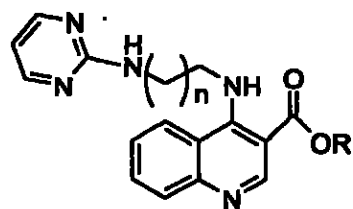
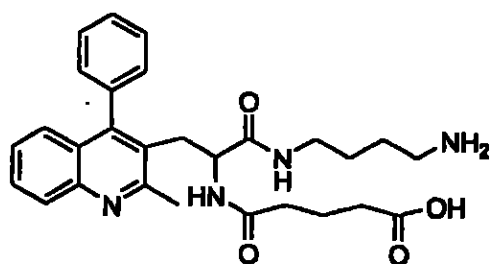
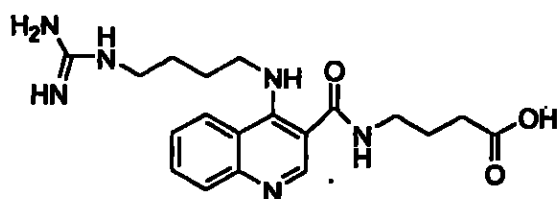
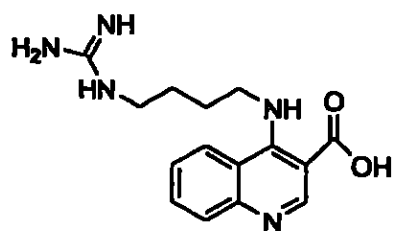
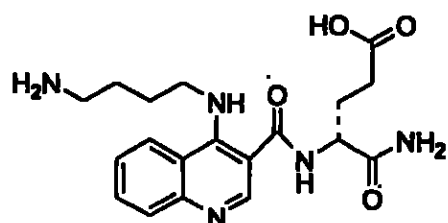
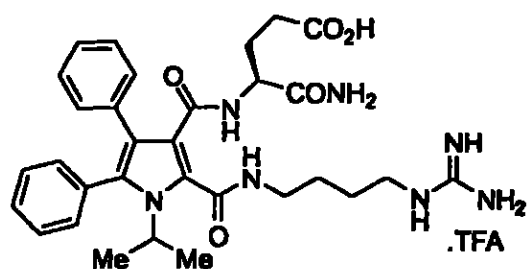
[0033] The following mediators are disclosed in accordance with preferred embodiments:



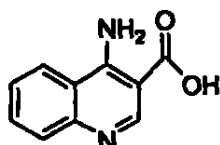
12



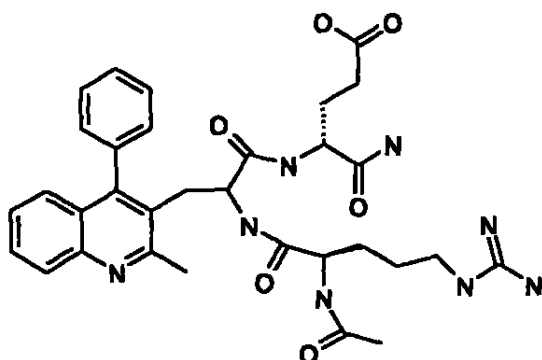




wherein $n = 1-10$



[0034] In preferred embodiments, the following compounds are disclosed: 4-Agmatine-3-amidoGABAquinoline, 4-(1-(4-aminobutylcarbamoyl)-2-(2-methyl-4-phenylquinolin-3-yl)ethylcarbamoyl)butanoic acid, and 4-(5-guanidinopentylamino)quinoline-3-carboxylic acid. Any underivatized amino and/or carboxy terminal amino acid residues in the above list of preferred compounds are capped with a protecting group. In another preferred embodiment, the mediator has the structure:



Detailed Description of the Preferred Embodiment

[0035] The mediators of RCT in preferred embodiments of the invention mimic ApoA-I function and activity. In a broad aspect, these mediators are molecules comprising three regions, an acidic region, a lipophilic (e.g., aromatic) region, and a basic region. The molecules preferably contain a positively charged region, a negatively charged region, and an uncharged, lipophilic region. The locations of the regions with respect to one another can vary between molecules; thus, in a preferred embodiment, the molecules mediate RCT regardless of the relative positions of the three regions within each molecule. Whereas in some preferred embodiments, the molecular template or model comprises an "acidic" amino acid-derived residue, a lipophilic moiety, and a basic amino acid-derived residue, linked in any order to form a mediator of RCT, in other preferred embodiments, the molecular model can be embodied by a single residue having acidic, lipophilic and basic regions, such as for example, the amino acid, phenylalanine.

14

[0036] In some preferred embodiments, the molecular mediators of RCT comprise natural L- or D- amino acids, amino acid analogs (synthetic or semisynthetic), and amino acid derivatives. For example, the mediator may include an "acidic" amino acid residue or analog thereof, an aromatic or lipophilic scaffold, and a basic amino acid residue or analog thereof, the residues being joined by peptide or amide bond linkages, or any other bonds. The molecular mediators of RCT share the common aspect of reducing serum cholesterol through enhancing direct and/or indirect RCT pathways (i.e., increasing cholesterol efflux), ability to activate LCAT, and ability to increase serum HDL concentration.

[0037] In a preferred embodiment, the mediator of reverse cholesterol transport preferably comprises an acid group, a lipophilic group and a basic group, and comprises the sequence: X1-X2-X3, X1-X2-Y3, Y1-X2-X3, or Y1-X2-Y3 wherein: X1 is an acidic amino acid or analog thereof; X2 is an aromatic or a lipophilic portion of a HMG CoA reductase inhibitor (e.g., a scaffold or pharmacophore); X3 is a basic amino acid or analog thereof; Y1 is an acidic amino acid analog without the alpha amino group; and Y3 is a basic amino acid analog without the alpha carboxy group. When the amino terminal alpha amino group is present (e.g., X1), it further comprises a first protecting group, and when the carboxy terminal alpha carboxy group is present (e.g., X3), it further comprises a second protecting group. The first (amino terminal) protecting groups are preferably selected from the group consisting of an acetyl, phenylacetyl, pivoyl, 2-naphthyl, nicotinic acid, a $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{CO}-$ where n ranges from 1 to 20, and an amide of acetyl, phenylacetyl, di-tert-butyl-4-hydroxy-phenyl, naphthyl, substituted naphthyl, FMOC, biphenyl, substituted phenyl, substituted heterocycles, alkyl, aryl, substituted aryl, cycloalkyl, fused cycloalkyl, saturated heteroaryl, substituted saturated heteroaryl and the like. The second (carboxy terminal) protecting groups are preferably selected from the group consisting of an amine such as RNH_2 where R = di-tert-butyl-4-hydroxy-phenyl, naphthyl, substituted naphthyl, FMOC, biphenyl, substituted phenyl, substituted heterocycles, alkyl, aryl, substituted aryl, cycloalkyl, fused cycloalkyl, saturated heteroaryl, substituted saturated heteroaryl and the like. The order of the acidic, lipophilic and basic groups can be scrambled in any and all possible ways to provide compounds that retain the basic features of the molecular model. In some preferred embodiments, analogs of X1 and X3 may comprise bioisosteres of the acid and base R groups. In other embodiments, one or more of X1, X2 or X3 are D or other modified synthetic amino acid residues

to provide metabolically stable molecules. This could also be achieved by peptidomimetic approach i.e. reversing the peptide bonds in the backbone or similar groups.

[0038] In another embodiment, the mediator can be incorporated into a larger entity, such as a peptide of about 1 to 10 amino acids, or a molecule.

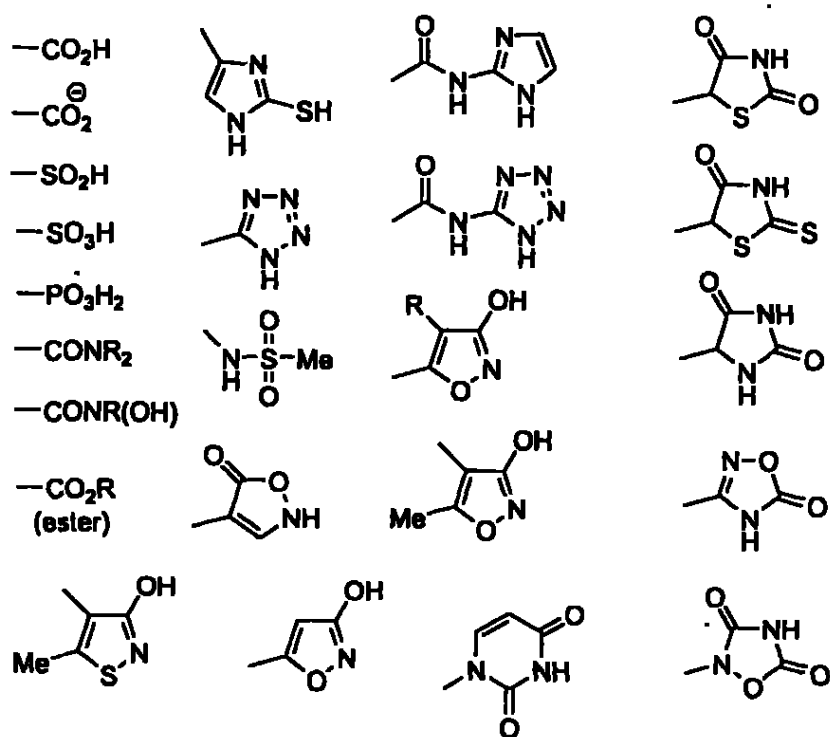
[0039] A scaffold is used herein to denote a pharmacophore which is a model to simplify an interaction process between a ligand (candidate drug molecule) and a protein. A scaffold can possess certain features of the native molecule fixed in an active site of the protein. It can be assumed that these features interact with some complementary features in the cavity of the protein. Variations can be derived by attaching functional groups to the scaffold. Preferably, we define a scaffold by the following heuristic: A scaffold is a mimic of at least a portion of an HMG CoA reductase inhibitor that is lipophilic or aromatic.

[0040] The terms "bioisostere", "bioisosteric replacement", "bioisosterism" and closely related terms as used herein have the same meanings as those generally recognized in the art. Bioisosteres are atoms, ions, or molecules in which the peripheral layers of electrons can be considered substantially similar. The term bioisostere is usually used to mean a portion of an overall molecule, as opposed to the entire molecule itself. Bioisosteric replacement involves using one bioisostere to replace another with the expectation of maintaining or slightly modifying the biological activity of the first bioisostere. The bioisosteres in this case are thus atoms or groups of atoms having similar size, shape and electron density. Bioisosterism arises from a reasonable expectation that a proposed bioisosteric replacement will result in maintenance of similar biological properties. Such a reasonable expectation may be based on structural similarity alone. This is especially true in those cases where a number of particulars are known regarding the characteristic domains of the receptor, etc. involved, to which the bioisosteres are bound or which works upon said bioisosteres in some manner.

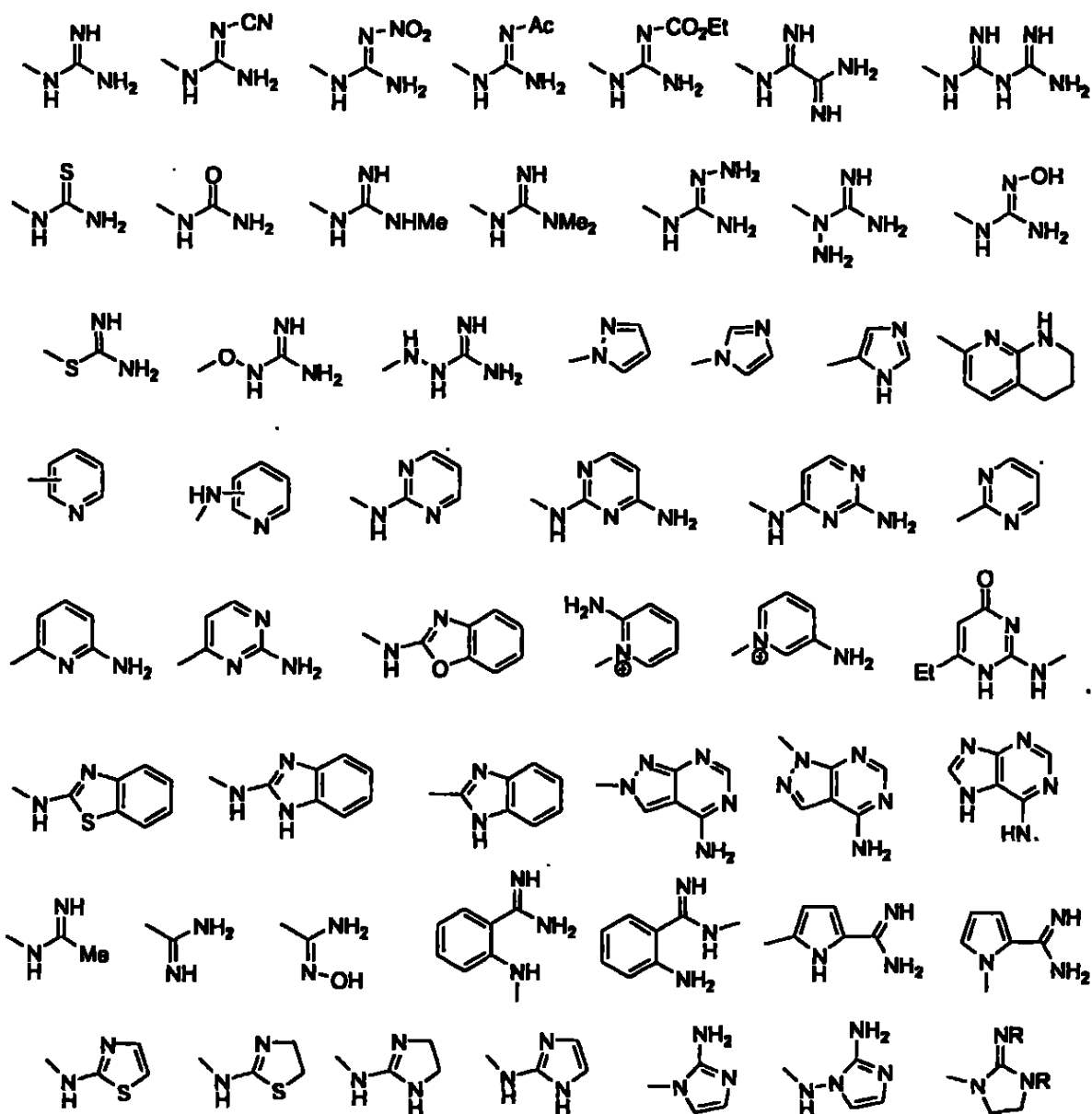
[0041] Examples of bioisosteres for acid and base groups are shown below.

15

Carb xylic Acid Bioisosteres (R = H/alkyl)



Guanidine Bioisosteres (R = H/alkyl)



[0042] As used herein, the term "amino acid" can also refer to a molecule of the general formula $\text{NH}_2\text{-CHR-COOH}$ or the residue within a peptide bearing the parent amino acid, where "R" is one of a number of different side chains. "R" can be a substituent referring to one of the twenty genetically coded amino acids. "R" can also be a substituent referring to one that is not of the twenty genetically coded amino acids. As used herein, the term "amino acid residue" refers to the portion of the amino acid which remains after losing a water molecule when it is joined to

another amino acid. As used herein, the term "amino acid analog" refers to a structural derivative of an amino acid parent compound that differs from it by at least one element, such as for example, an alpha amino group or an acidic amino acid in which the acidic R group has been replaced with a bioisostere thereof. As such "half-denuded" and "denuded" embodiments of the present invention comprise amino acid analogs since these versions vary from a traditional amino acid structure in missing at least an element, such as an alpha amino or carboxy group. The term "modified amino acid" refers more particularly to an amino acid bearing an "R" substituent that does not correspond to one of the twenty genetically coded amino acids—as such modified amino acids fall within the broader class of amino acid analogs.

[0043] As used herein, the term "fully protected" refers to a preferred embodiment in which both the amino and carboxyl terminals comprise protecting groups.

[0044] As used herein, the term "half-denuded" refers to a preferred embodiment in which one of the alpha amino group or the alpha carboxy group is missing from the respective amino or carboxy terminal amino acid residues or analogs thereof. The remaining alpha amino or alpha carboxy group is capped with a protecting group.

[0045] As used herein, the term "denuded" or "fully-denuded" refers to a preferred embodiment in which both the alpha amino and alpha carboxy groups have been removed from the respective amino or carboxy terminal amino acid residues or analogs thereof.

[0046] Certain compounds can exist in tautomeric forms. All such isomers including diastereomers and enantiomers are covered by the embodiments. It is assumed that the certain compounds are present in either of the tautomeric forms or mixture thereof.

[0047] Certain compounds can exist in polymorphic forms. Polymorphism results from crystallization of a compound in at least two distinct forms. All such polymorphs are covered by the embodiments. It is assumed that the certain compounds are present in a certain polymorph or mixture thereof.

HMG-CoA Reductase Inhibition

[0048] As stated above, a scaffold is a mimic of a portion of an HMG CoA reductase inhibitor that is lipophilic or aromatic.

[0049] HMG CoA reductase inhibitors share a rigid, hydrophobic group which is linked to an HMG-like moiety. HMG CoA reductase inhibitors are competitive inhibitors of HMGR with

respect to binding of the substrate HMG CoA. The structurally diverse, rigid hydrophobic groups of HMG CoA reductase inhibitors are accommodated in a shallow non-polar groove of HMGR.

[0050] Inhibition of HMGR is an effective and safe method in cholesterol lowering therapy. HMG CoA reductase inhibitors have other effects in addition to lowering cholesterol. These include nitric oxide mediated promotion of new blood vessel growth, stimulation of bone formation, protection against oxidative modification of low-density lipoprotein, anti-inflammatory effects, and reduction in C-reactive protein levels.

RCT Mediation

[0051] To date, efforts at designing ApoA-I agonists have focused on the 22-mer unit structures, e.g., the "consensus 22-mer" of Anantharamaiah *et al.*, 1990, *Arteriosclerosis* 10(1):95-105; Venkatachalapathi *et al.*, 1991, *Mol. Conformation and Biol. Interactions, Indian Acad. Sci. B*:585-596, which are capable of forming amphipathic α -helices in the presence of lipids. (See e.g., U.S. Pat. No. 6,376,464 directed at peptide mimetics derived from modifications of the consensus 22-mer). There are several advantages of using such relatively short peptides compared to longer 22-mers. For example, the shorter mediators of RCT are easier and less costly to produce, they are chemically and conformationally more stable, the preferred conformations remain relatively rigid, there is little or no intra-molecular interactions within the peptide chain, and the shorter peptides exhibit a higher degree of oral availability. Multiple copies of these shorter peptides might bind to the HDL or LDL producing the same effect of a more restrained large peptide. Although ApoA-I multifunctionality may be based on the contributions of its multiple α -helical domains, it is also possible that even a single function of ApoA-I, e.g., LCAT activation, can be mediated in a redundant manner by more than one of the α -helical domains. Thus, in a preferred aspect of the embodiments, multiple functions of ApoA-I may be mimicked by the disclosed mediators of RCT which are directed to a single sub-domain.

[0052] Three functional features of ApoA-I are widely accepted as major criteria for ApoA-I agonist design: (1) ability to associate with phospholipids; (2) ability to activate LCAT; and (3) ability to promote efflux of cholesterol from the cells. The molecular mediators of RCT in accordance with some modes of the preferred embodiments may exhibit only the last functional feature—ability to increase RCT. However, quite a few other properties of ApoA-I, which are often overlooked, make ApoA-I a particularly attractive target for therapeutic intervention. For example, ApoA-I directs the cholesterol flux into the liver via a receptor-mediated process and modulates

pre- β -HDL (primary acceptor of cholesterol from peripheral tissues) production via a PLTP driven reaction. However, these features allow broadening of the potential usefulness of ApoA-I mimetic molecules. This, entirely novel approach to viewing ApoA-I mimetic function, will allow use of the peptides or amino acid-derived small molecules, which are disclosed herein, to facilitate direct RCT (via HDL pathway) as well as indirect RCT (i.e., to intercept and clear the LDLs from circulation, by redirecting their flux to the liver). To be capable of enhancing indirect RCT, the molecular mediators of the preferred embodiments will preferably be able to associate with phospholipids and bind to the liver (i.e., to serve as ligand for liver lipoprotein binding sites).

[0053] Thus, a goal of the research efforts which led to preferred embodiments was to identify, design, and synthesize the short stable small molecule mediators of RCT that exhibit preferential lipid binding conformation, increase cholesterol flux to the liver by facilitating direct and/or indirect reverse cholesterol transport, improve the plasma lipoprotein profile, and subsequently prevent the progression or/and promote the regression of atherosclerotic lesions.

[0054] The mediators of RCT of the preferred embodiments can be prepared in stable bulk or unit dosage forms, e.g., lyophilized products, that can be reconstituted before use *in vivo* or reformulated. Preferred embodiments of the invention includes the pharmaceutical formulations and the use of such preparations in the treatment of hyperlipidemia, hypercholesterolemia, coronary heart disease, atherosclerosis, diabetes, obesity, Alzheimer's Disease, multiple sclerosis, conditions related to hyperlipidemia, such as inflammation, and other conditions such as endotoxemia causing septic shock.

[0055] The preferred embodiments are illustrated by working examples which demonstrate that the mediators of RCT of the preferred embodiments associate with the HDL and LDL component of plasma, and can increase the concentration of HDL and pre- β -HDL particles, and lower plasma levels of LDL. Thus promote direct and indirect RCT. The mediators of RCT increase human LDL mediated cholesterol accumulation in human hepatocytes (HepG2 cells). The mediators of RCT are also efficient at activating PLTP and thus promote the formation of pre- β -HDL particles. Increase of HDL cholesterol served as indirect evidence of LCAT involvement (LCAT activation was not shown directly (*in vitro*)) in the RCT. Use of the mediators of RCT of the preferred embodiments *in vivo* in animal models results in an increase in serum HDL concentration.

[0056] The preferred embodiments are set forth in more detail in the subsections below, which describe composition and structure of the mediators of RCT, including lipophilic scaffolds derived from HMG CoA reductase inhibitors, including protected versions, half denuded versions, and denuded versions thereof; structural and functional characterization; methods of preparation of bulk and unit dosage formulations; and methods of use.

Mediator Structure and Function

[0057] In some preferred embodiments, the mediators of RCT are generally peptides, or analogues thereof, which mimic the activity of ApoA-I. In some embodiments, at least one amide linkage in the peptide is replaced with a substituted amide, an isostere of an amide or an amide mimetic. Additionally, one or more amide linkages can be replaced with peptidomimetic or amide mimetic moieties which do not significantly interfere with the structure or activity of the peptides. Suitable amide mimetic moieties are described, for example, in Olson *et al.*, 1993, *J. Med. Chem.* 36:3039-3049.

[0058] As used herein, the abbreviations for the genetically encoded L-enantiomeric amino acids are conventional and are as follows: The D-amino acids are designated by lower case, e.g. D-alanine = a, etc.

Table 1

Amino Acids	One-Letter Symbol	Common Abbreviation
Alanine	A	Ala
Arginine	R	Arg
Asparagine	N	Asn
Aspartic acid	D	Asp
Cysteine	C	Cys
Glutamine	Q	Gln
Glutamic acid	E	Glu
Glycine	G	Gly
Histidine	H	His
Isoleucine	I	Ile
Leucine	L	Leu
Lysine	K	Lys
Phenylalanine	F	Phe
Proline	P	Pro
Serine	S	Ser
Threonine	T	Thr
Tryptophan	W	Trp
Tyrosine	Y	Tyr
Valine	V	Val

[0059] Certain amino acid residues in the mediators of RCT can be replaced with other amino acid residues without significantly deleteriously affecting, and in many cases even enhancing, the activity of the peptides. Thus, also contemplated by the preferred embodiments are altered or mutated forms of the mediators of RCT wherein at least one defined amino acid residue in the structure is substituted with another amino acid residue or derivative and/or analog thereof. It will be recognized that in preferred embodiments, the amino acid substitutions are conservative, i.e., the replacing amino acid residue has physical and chemical properties that are similar to the amino acid residue being replaced.

[0060] For purposes of determining conservative amino acid substitutions, the amino acids can be conveniently classified into two main categories—hydrophilic and hydrophobic—depending primarily on the physical-chemical characteristics of the amino acid side chain. These two main categories can be further classified into subcategories that more distinctly define the characteristics of the amino acid side chains. For example, the class of hydrophilic amino acids can be further subdivided into acidic, basic and polar amino acids. The class of hydrophobic amino acids can be further subdivided into nonpolar and aromatic amino acids. The definitions of the various categories of amino acids that define ApoA-I are as follows:

[0061] The term "hydrophilic amino acid" refers to an amino acid exhibiting a hydrophobicity of less than zero according to the normalized consensus hydrophobicity scale of Eisenberg et al., 1984, J. Mol. Biol. 179:125-142. Genetically encoded hydrophilic amino acids include Thr (T), Ser (S), His (H), Glu (E), Asn (N), Gln (Q), Asp (D), Lys (K) and Arg (R).

[0062] The term "hydrophobic amino acid" refers to an amino acid exhibiting a hydrophobicity of greater than zero according to the normalized consensus hydrophobicity scale of Eisenberg, 1984, J. Mol. Biol. 179:125-142. Genetically encoded hydrophobic amino acids include Pro (P), Ile (I), Phe (F), Val (V), Leu (L), Trp (W), Met (M), Ala (A), Gly (G) and Tyr (Y).

[0063] The term "acidic amino acid" refers to a hydrophilic amino acid having a side chain pK value of less than 7. Acidic amino acids typically have negatively charged side chains at physiological pH due to loss of a hydrogen ion. Genetically encoded acidic amino acids include Glu (E) and Asp (D).

[0064] The term "basic amino acid" refers to a hydrophilic amino acid having a side chain pK value of greater than 7. Basic amino acids typically have positively charged side chains at

physiological pH due to association with hydronium ion. Genetically encoded basic amino acids include His (H), Arg (R) and Lys (K).

[0065] The term "polar amino acid" refers to a hydrophilic amino acid having a side chain that is uncharged at physiological pH, but which has at least one bond in which the pair of electrons shared in common by two atoms is held more closely by one of the atoms. Genetically encoded polar amino acids include Asn (N), Gln (Q) Ser (S) and Thr (T).

[0066] The term "nonpolar amino acid" refers to a hydrophobic amino acid having a side chain that is uncharged at physiological pH and which has bonds in which the pair of electrons shared in common by two atoms is generally held equally by each of the two atoms (i.e., the side chain is not polar). Genetically encoded nonpolar amino acids include Leu (L), Val (V), Ile (I), Met (M), Gly (G) and Ala (A).

[0067] The term "aromatic amino acid" refers to a hydrophobic amino acid with a side chain having at least one aromatic or heteroaromatic ring. The aromatic or heteroaromatic ring may contain one or more substituents such as —OH, —SH, —CN, —F, —Cl, —Br, —I, —NO₂, —NO, —NH₂, —NHR, —NRR, —C(O)R, —C(O)OH, —C(O)OR, —C(O)NH₂, —C(O)NHR, —C(O)NRR and the like where each R is independently (C₁ — C₆) alkyl, substituted (C₁ — C₆) alkyl, (C₁ — C₆) alkenyl, substituted (C₁ — C₆) alkenyl, (C₁ — C₆) alkynyl, substituted (C₁ — C₆) alkynyl, (C₃ — C₂₀) aryl, substituted (C₃ — C₂₀) aryl, (C₆ — C₂₆) alkaryl, substituted (C₆ — C₂₆) alkaryl, 5-20 membered heteroaryl, substituted 5-20 membered heteroaryl, 6-26 membered alkheteroaryl or substituted 6-26 membered alkheteroaryl. Genetically encoded aromatic amino acids include Phe (F), Tyr (Y) and Trp (W).

[0068] The term "aliphatic amino acid" refers to a hydrophobic amino acid having an aliphatic hydrocarbon side chain. Genetically encoded aliphatic amino acids include Ala (A), Val (V), Leu (L) and Ile (I).

[0069] The amino acid residue Cys (C) is unusual in that it can form disulfide bridges with other Cys (C) residues or other sulfanyl-containing amino acids. The ability of Cys (C) residues (and other amino acids with —SH containing side chains) to exist in a peptide in either the reduced free —SH or oxidized disulfide-bridged form affects whether Cys (C) residues contribute net hydrophobic or hydrophilic character to a peptide. While Cys (C) exhibits a hydrophobicity of 0.29 according to the normalized consensus scale of Eisenberg (Eisenberg, 1984, *supra*), it is to be

understood that for purposes of the preferred embodiments Cys (C) is categorized as a polar hydrophilic amino acid, notwithstanding the general classifications defined above.

[0070] As will be appreciated by those of skill in the art, the above-defined categories are not mutually exclusive. Thus, amino acids having side chains exhibiting two or more physical-chemical properties can be included in multiple categories. For example, amino acid side chains having aromatic moieties that are further substituted with polar substituents, such as Tyr (Y), may exhibit both aromatic hydrophobic properties and polar or hydrophilic properties, and can therefore be included in both the aromatic and polar categories. The appropriate categorization of any amino acid will be apparent to those of skill in the art, especially in light of the detailed disclosure provided herein.

[0071] While the above-defined categories have been exemplified in terms of the genetically encoded amino acids, the amino acid substitutions need not be, and in certain embodiments preferably are not, restricted to the genetically encoded amino acids. Indeed, many of the preferred mediators of RCT contain genetically non-encoded amino acids. Thus, in addition to the naturally occurring genetically encoded amino acids, amino acid residues in the mediators of RCT may be substituted with naturally occurring non-encoded amino acids and synthetic amino acids.

[0072] Certain commonly encountered amino acids which provide useful substitutions for the mediators of RCT include, but are not limited to, β -alanine (β -Ala) and other omega-amino acids such as 3-aminopropionic acid, 2,3-diaminopropionic acid (Dpr), 4-aminobutyric acid and so forth; α -aminoisobutyric acid (Aib); ϵ -aminohexanoic acid (Aha); δ -aminovaleric acid (Ava); N-methylglycine or sarcosine (MeGly); ornithine (Orn); citrulline (Cit); t-butylalanine (t-BuA); t-butylglycine (t-BuG); N-methylisoleucine (Melle); phenylglycine (Phg); cyclohexylalanine (Cha); norleucine (Nle); naphthylalanine (Nal); 4-phenylphenylalanine, 4-chlorophenylalanine (Phe(4-Cl)); 2-fluorophenylalanine (Phe(2-F)); 3-fluorophenylalanine (Phe(3-F)); 4-fluorophenylalanine (Phe(4-F)); penicillamine (Pen); 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxylic acid (Tic); β -2-thienylalanine (Thi); methionine sulfoxide (MSO); homoarginine (hArg); N-acetyl lysine (AcLys); 2,4-diaminobutyric acid (Dbu); 2,3-diaminobutyric acid (Dab); p-aminophenylalanine (Phe (pNH₂)); N-methyl valine (MeVal); homocysteine (hCys), homophenylalanine (hPhe) and homoserine (hSer); hydroxyproline (Hyp), homoproline (hPro), N-methylated amino acids and peptoids (N-substituted glycines).

[0073] Other amino acid residues not specifically mentioned herein can be readily categorized based on their observed physical and chemical properties in light of the definitions provided herein.

[0074] The classifications of the genetically encoded and common non-encoded amino acids according to the categories defined above are summarized in Table 2, below. It is to be understood that Table 2 is for illustrative purposes only and does not purport to be an exhaustive list of amino acid residues and derivatives that can be used to substitute the mediators of RCT described herein.

Table 2. CLASSIFICATIONS OF COMMONLY ENCOUNTERED AMINO ACIDS

Classification	Genetically Encoded	Non-Genetically Encoded
<u>Hydrophobic</u>		
Aromatic	F, Y, W	Phg, Nal, Thi, Tic, Phe (4-Cl), Phe (2-F), Phe (3-F), Phe (4-F), hPhe
Nonpolar	L, V, I, M, G, A, P	t-BuA, t-BuG, Melle, Nle, MeVal, Cha, McGly, Aib
Aliphatic	A, V, L, I	b-Ala, Dpr, Aib, Aha, McGly, t-BuA, t-BuG, Melle, Cha, Nle, MeVal
<u>Hydrophilic</u>		
Acidic	D, E	
Basic	H, K, R	Dpr, Orn, hArg, Phe(p-NH ₂), Dbu, Dab
Polar	C, Q, N, S, T	Cit, AcLys, MSO, bAla, hSer
Helix-Breaking	P, G	D-Pro and other D-amino acids (in L-peptides)

[0075] Other amino acid residues not specifically mentioned herein can be readily categorized based on their observed physical and chemical properties in light of the definitions provided herein.

[0076] While in most instances, the amino acids of the mediators of RCT will be substituted with D-enantiomeric amino acids, the substitutions are not limited to D-enantiomeric amino acids. Thus, also included in the definition of "mutated" or "altered" forms are those situations where an D-amino acid is replaced with an identical L-amino acid (e.g., D-Arg→L-Arg) or with a L-amino acid of the same category or subcategory (e.g., D-Arg D-Lys), and vice versa. The mediators may advantageously be composed of at least one D-enantiomeric amino acid. Mediators containing such D-amino acids are thought to be more stable to degradation in the oral cavity, gut or serum than are molecules composed exclusively of L-amino acids.

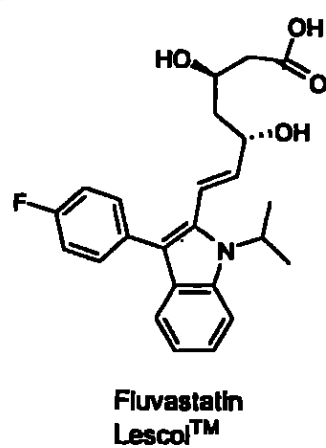
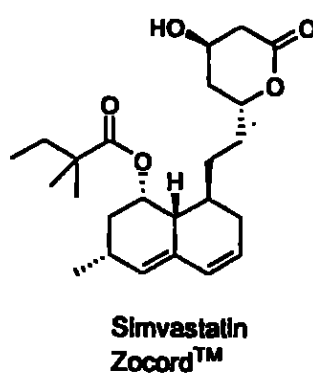
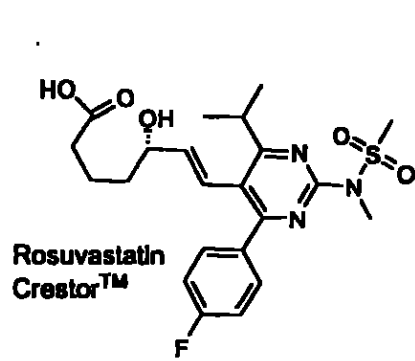
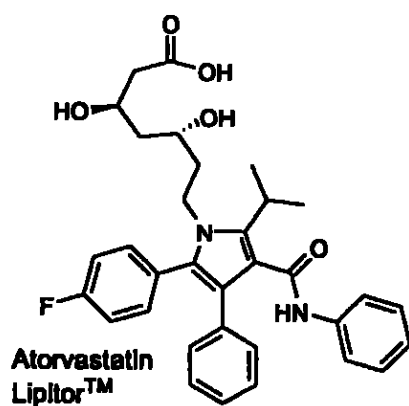
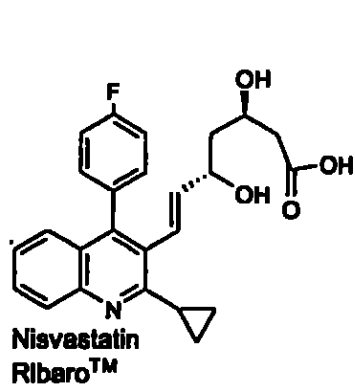
Linkers

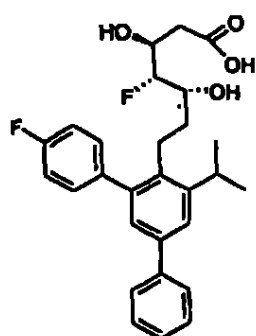
[0077] The mediators of RCT can be connected or linked in a head-to-tail fashion (i.e., N-terminus to C-terminus), a head-to-head fashion, (i.e., N-terminus to N-terminus), a tail-to-tail fashion (i.e., C-terminus to C-terminus), or combinations thereof. The linker can be any bifunctional molecule capable of covalently linking two peptides to one another. Thus, suitable linkers are bifunctional molecules in which the functional groups are capable of being covalently attached to the N- and/or C-terminus of a peptide. Functional groups suitable for attachment to the N- or C-terminus of peptides are well known in the art, as are suitable chemistries for effecting such covalent bond formation.

[0078] Linkers of sufficient length and flexibility include, but are not limited to, Pro (P), Gly (G), Cys-Cys, Gly-Gly, $H_2N-(CH_2)_n-COOH$ where n is 1 to 12, preferably 4 to 6; H_2N -aryl- $COOH$ and carbohydrates. However, in some embodiments, no separate linkers per se are used at all. Instead, the acidic, lipophilic and basic moieties are all part of a single molecule.

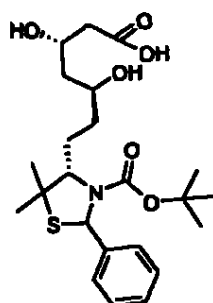
HMG CoA Reductase Inhibitors Scaffold

[0079] In preferred embodiments, the hydrophobic or aromatic scaffold is based on an HMG CoA reductase inhibitor. Examples of HMG CoA reductase inhibitors are shown below:

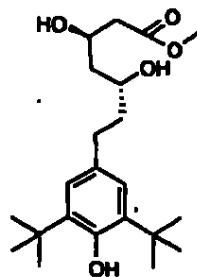




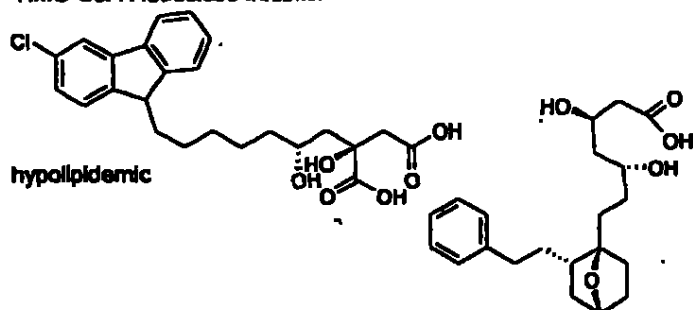
HMG-CoA Reductase Inhibitor



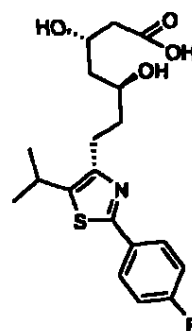
HMG-CoA Reductase Inhibitor



HMG-CoA Reductase Inhibitor

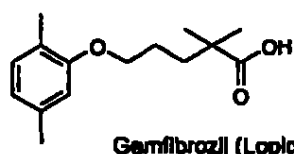


HMG-CoA Reductase Inhibitor

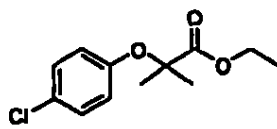


HMG-CoA Reductase Inhibitor

Fibrates hypolipidemic agents activate PPAR α

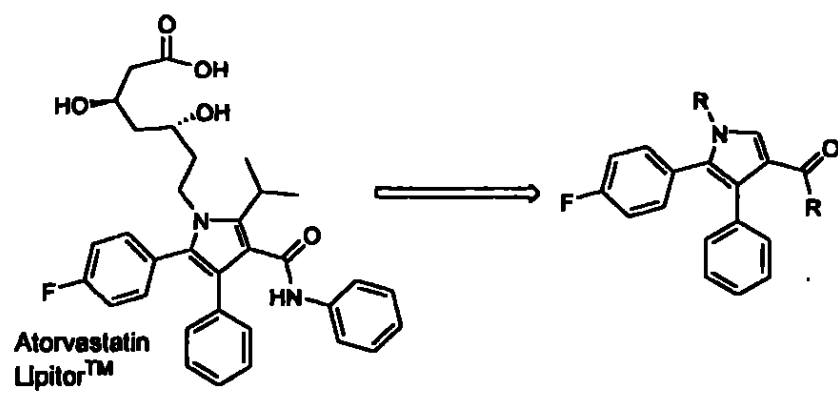
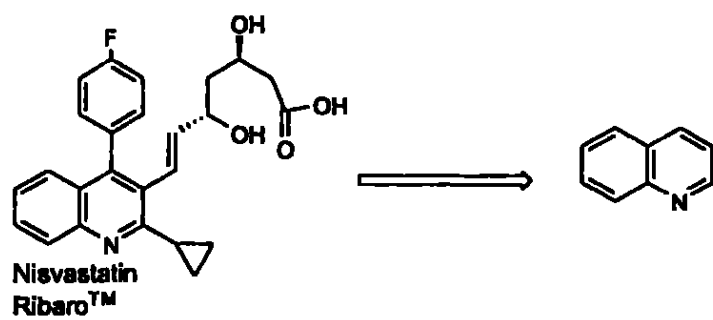
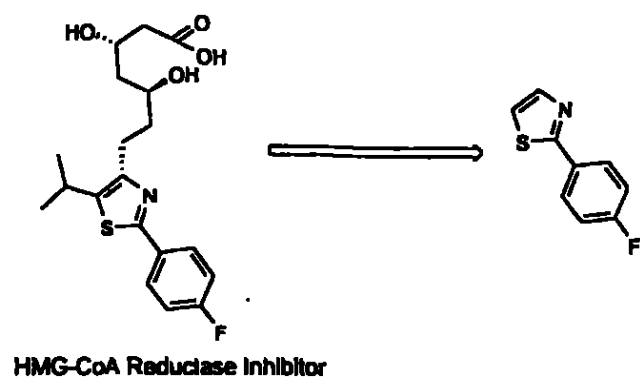


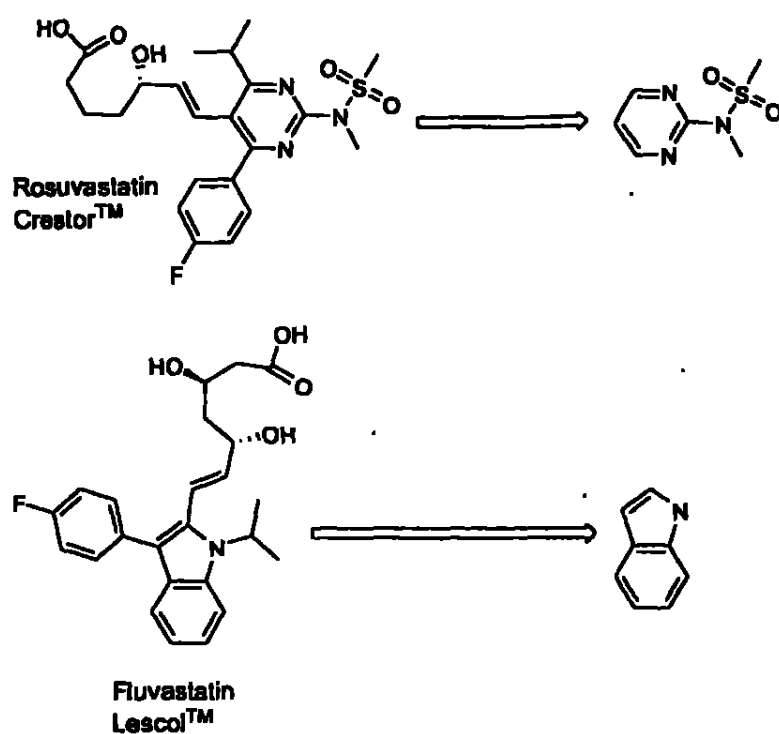
Gemfibrozil (Lopid)



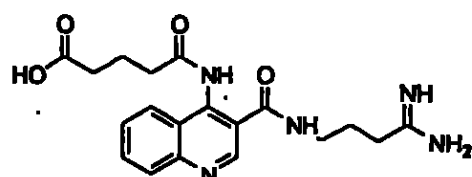
Clofibrate (PPAR α)

[0080] Accordingly, examples of lipophilic or aromatic scaffolds based on HMG CoA reductase inhibitors are shown below along with the parent HMG CoA reductase inhibitor:

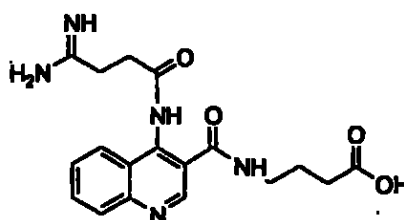
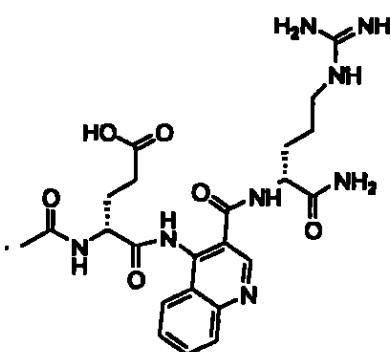
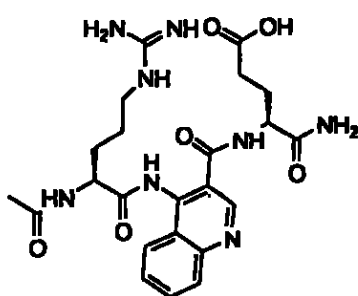
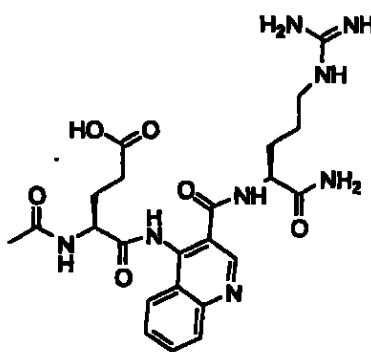
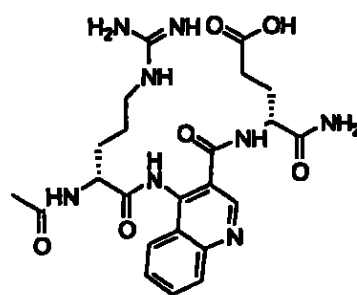




[0081] Examples of RCT mediators that comprise a lipophilic scaffold based on an HMG CoA reductase inhibitor, such as nisvastatin, are shown below.



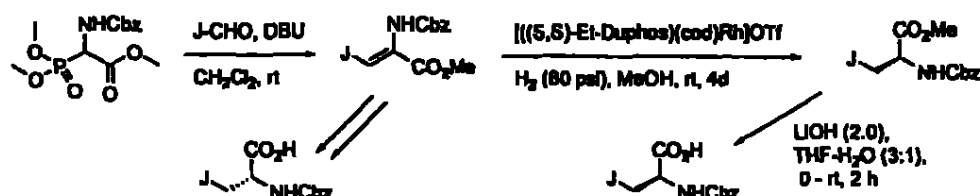
Glutaric Acid-Quinoline-Agmatine

AcE-Quin-RNH₂Ace-Quin-rNH₂Acr-Quin-eNH₂Acr-Quin-ENH₂

[0082] As stated above, preferably, a scaffold is a mimic of a portion of an HMG CoA reductase inhibitor that is lipophilic or aromatic. HMG CoA reductase inhibitors share a rigid, hydrophobic group which is linked to an HMG-like moiety. HMG CoA reductase inhibitors are competitive inhibitors of HMGR with respect to binding of the substrate HMG CoA. The structurally diverse, rigid hydrophobic groups of HMG CoA reductase inhibitors are accommodated in a shallow non-polar groove of HMGR.

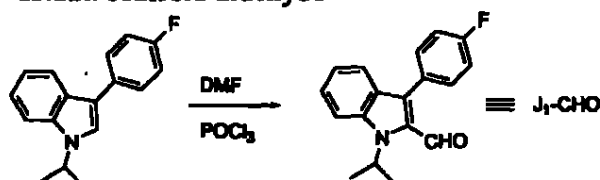
[0083] HMG CoA reductase inhibitor scaffold substituted alanine derivatives are replacements of the central amino acid (X_2) in the X_1 - X_2 - X_3 , X_1 - X_2 - Y_3 , Y_1 - X_2 - X_3 or Y_1 - X_2 - Y_3 molecular models; although the molecules can be rearranged in any order. The amino acid derivatives can be prepared from the corresponding aryl aldehydes (J -CHO, where J is any of the stann scaffolds), as shown below. The amino acid derivatives can be prepared in enantiomerically pure (D or L, depending on the chiral catalyst) or in the racemic form.

Scheme: General synthesis of statin scaffolds tethered alanine derivatives

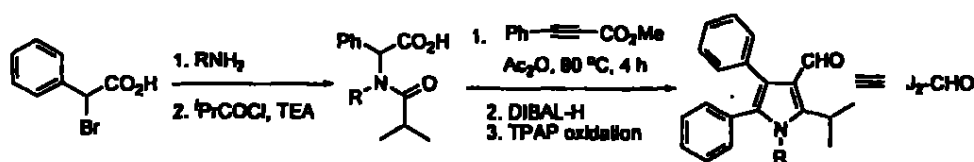


[0084] The above-mentioned aryl aldehydes (J_n -CHO, $n = 1-4$) can be prepared according to the following schemes.

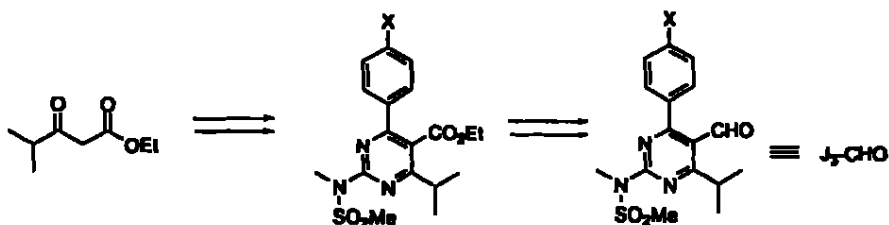
Scheme: Synthesis of Fluvastatin scaffold aldehyde



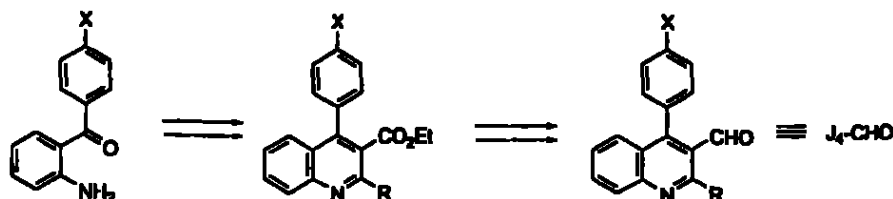
Scheme: Synthesis of Atorvastatin scaffold aldehyde (where R is an alkyl or alkyl sulfonyl group)



Scheme: Synthesis of Rosuvastatin scaffold aldehyde (where X is hydrogen or halogen)

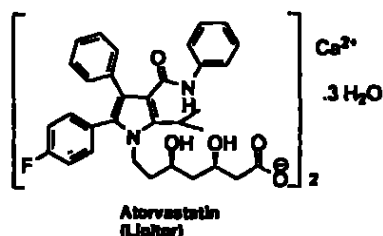


Scheme: Synthesis of Nisvastatin scaffold aldehyde (where X is hydrogen or halogen and R is alkyl)



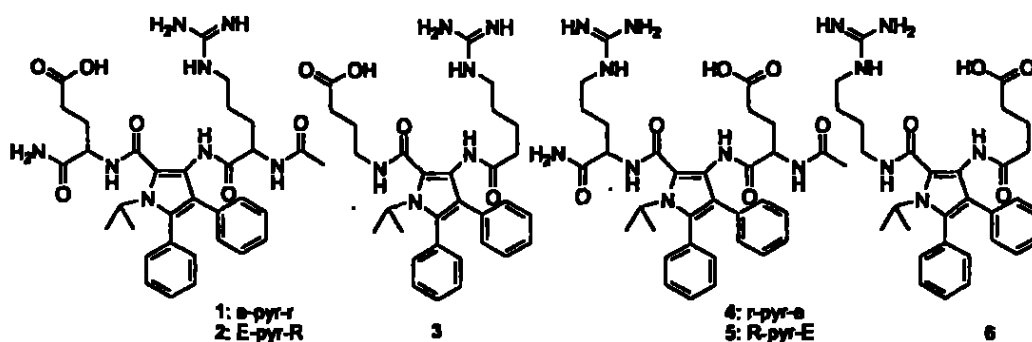
[0085] These statin substituted alanine derivatives can then be coupled with other amino acid derivatives (e.g., Glu or Arg). Further, these derivatives can be denuded partly or fully, as described in the case of EFR or efr.

[0086] One embodiment of the RCT mediators using an HMG CoA reductase scaffold is based on atorvastatin.

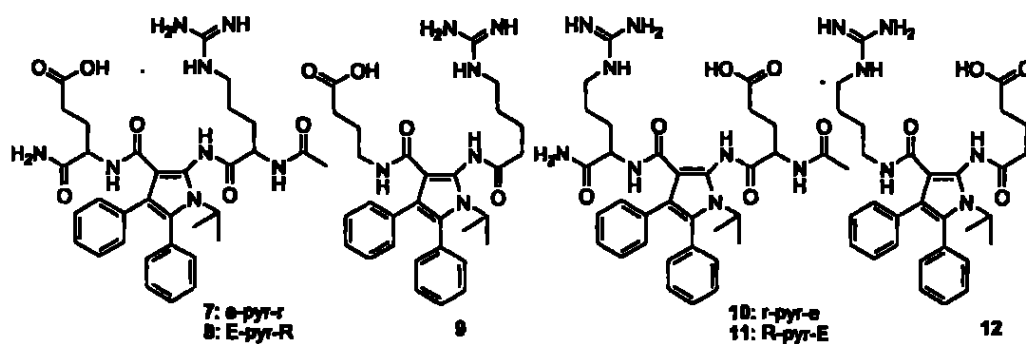
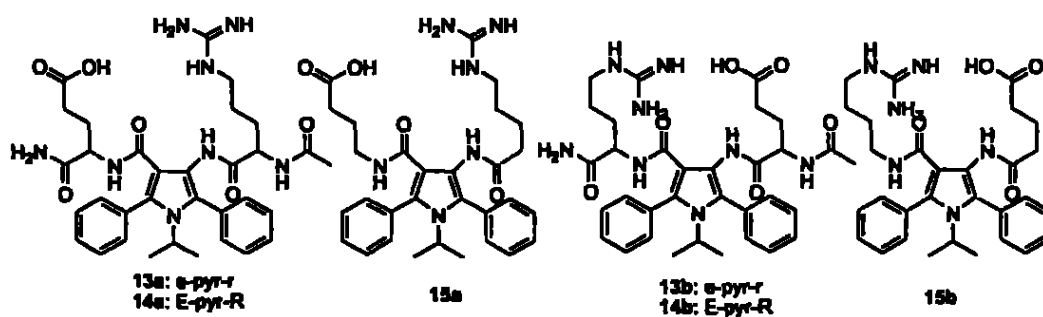
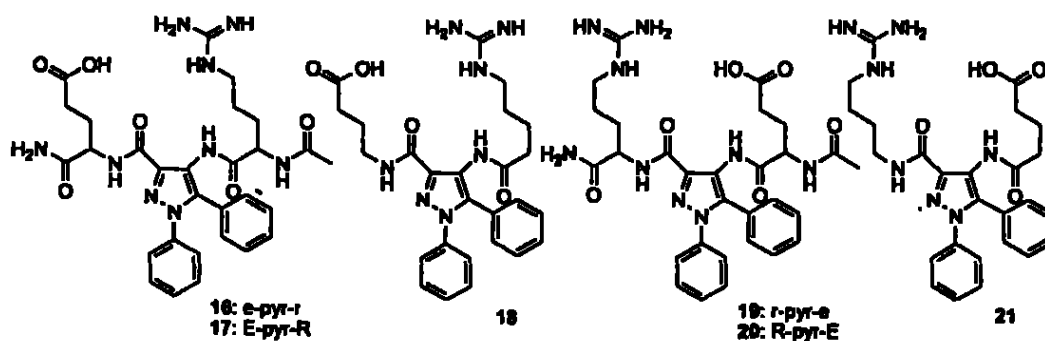


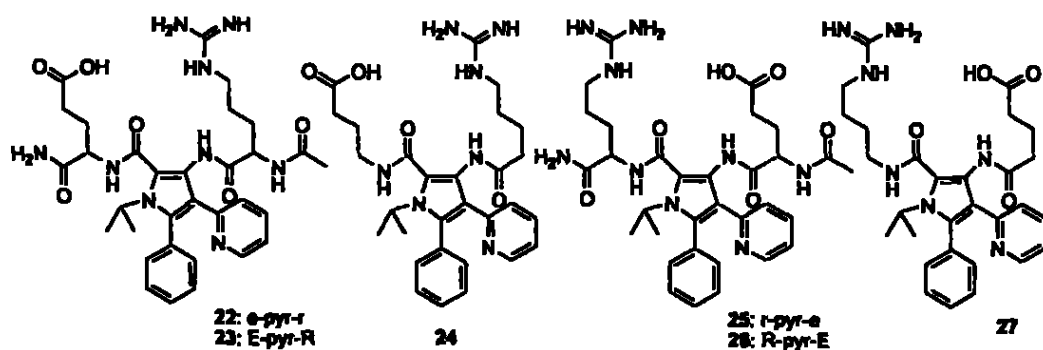
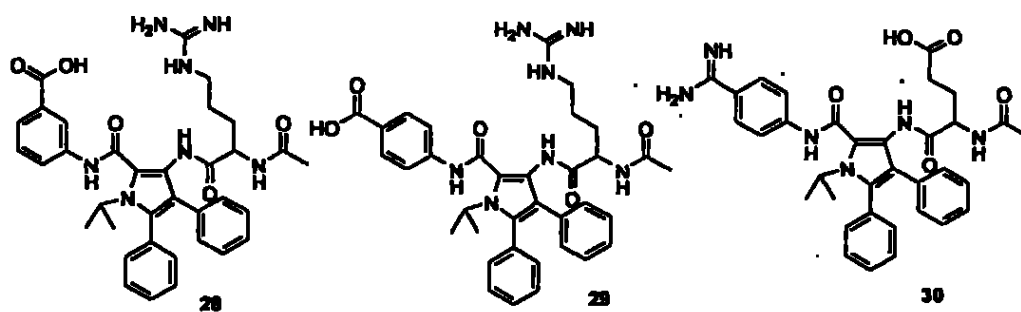
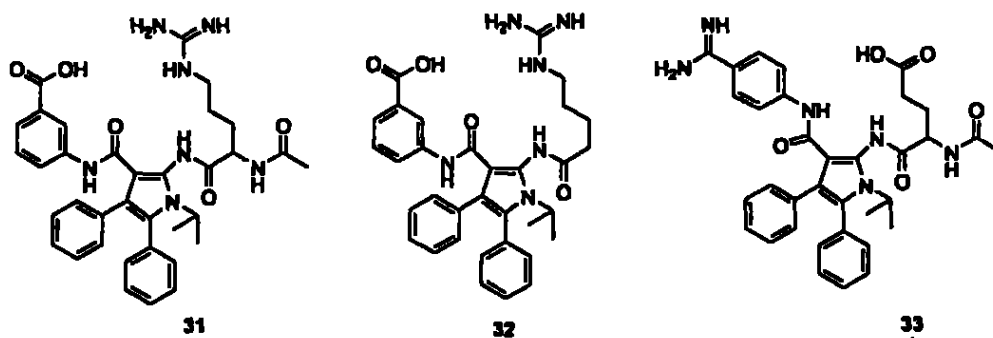
[0087] The D- and L-amino acid derivatives based on atorvastatin can be synthesized. These derivatives further can be denuded partly or fully. The bioisosteric replacement can be done at one of the amino acid residues or both together. The glutamic acid moiety can be replaced, for example, by 3-amino benzoic acid or PABA. These derivatives are shown in the following charts and schemes.

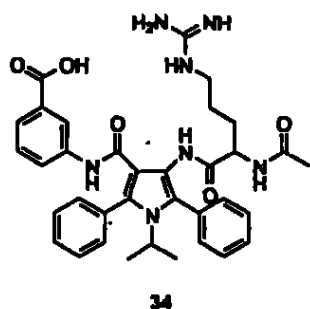
A: From 3-amino-pyrrole-2-carboxylic acid



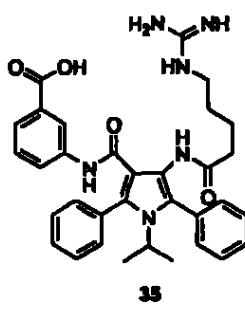
24'

B: From 2-amino-pyrrole-3-carboxylic acid**C: From 4-amino-pyrrole-3-carboxylic acid****D: From 4-amino-pyrazole-3-carboxylic acid**

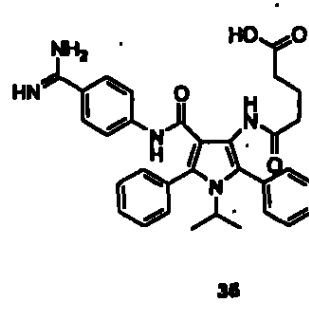
E: From 3-amino-pyrrole-2-carboxylic acid (pyridine ring for phenyl)**F: From 3-amino-pyrrole-2-carboxylic acid (Bioisosteres)****G: From 2-amino-pyrrole-3-carboxylic acid (Bioisosteres)**

H: From 4-amino-pyrrole-3-carboxylic acid (Biotosteres)

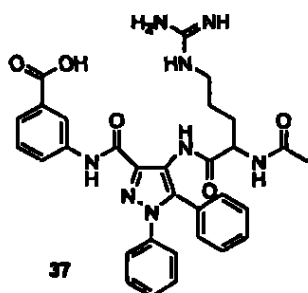
34



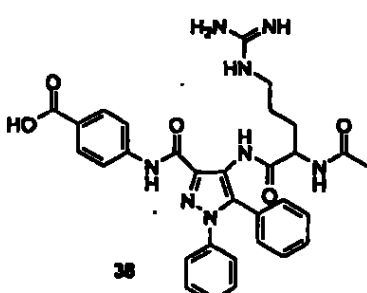
35



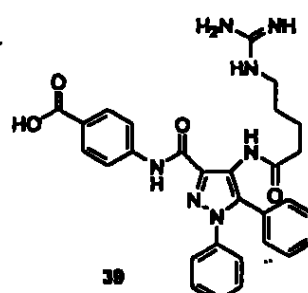
36

I: From 4-amino-pyrazole-3-carboxylic acid (biosteres)

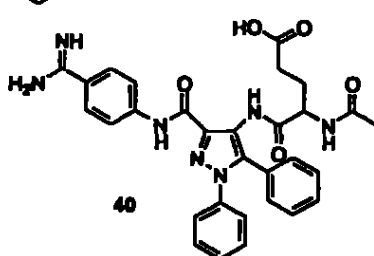
37



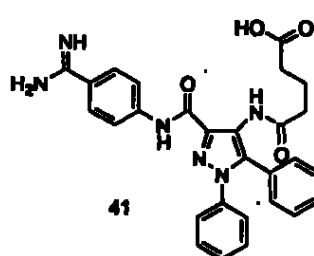
38



39

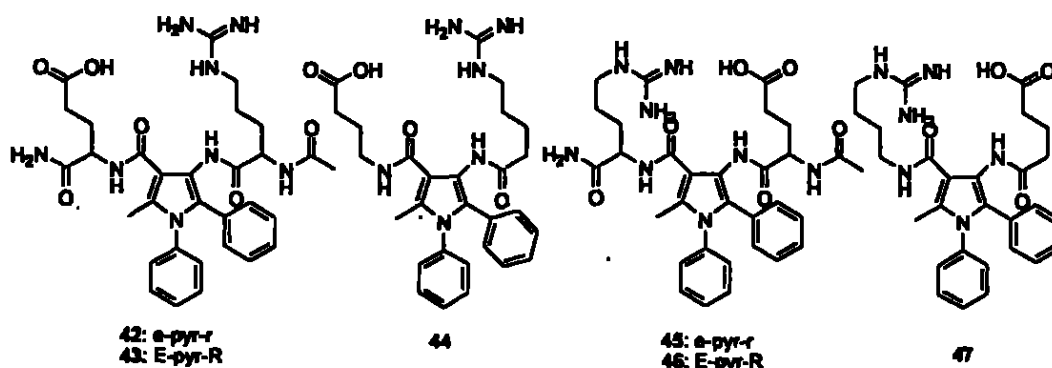


40

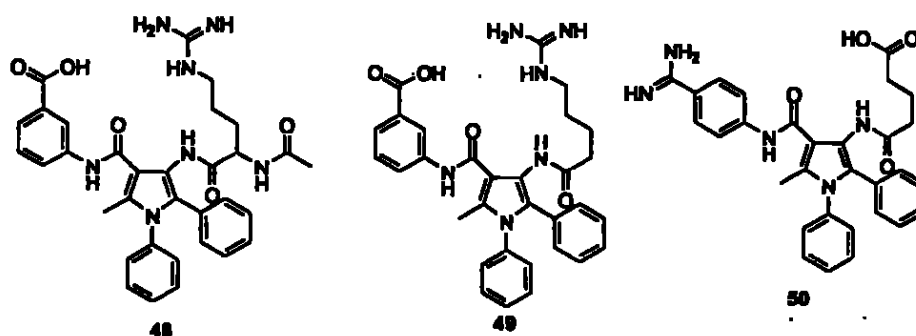


41

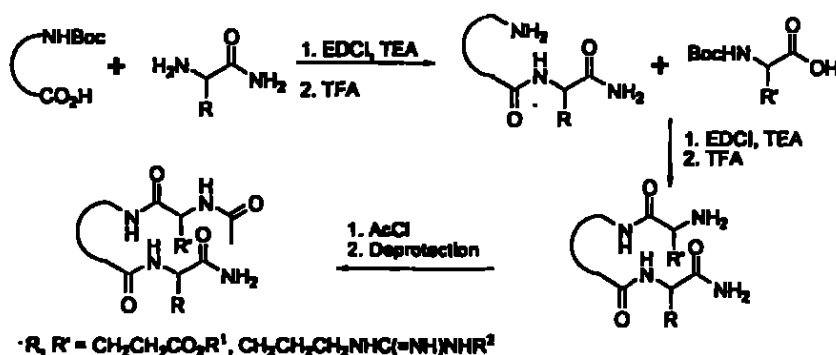
J: Alternative embodiments



K: Alternative embodiments comprising bioisosteres



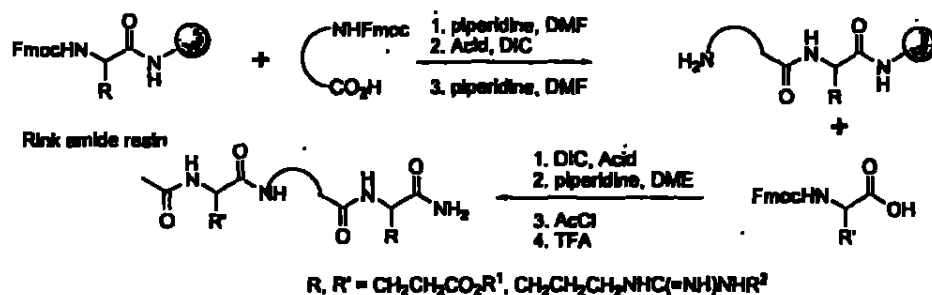
Scheme-1: General Route for the Synthesis in Solution Phase



[0088] The general route for the N-Boc protected amino acids in solution phase peptide synthesis is shown in Scheme 1. First, the acid is reacted with the amine under standard conditions (e.g., EDCI, HOBt, Et₃N) and the resulting product is deprotected (TFA) to the corresponding amine. The latter is coupled with another appropriately protected amino acid under the standard

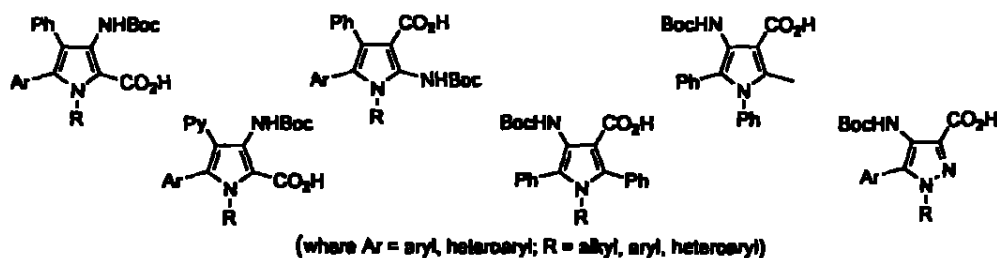
conditions. The N-Boc is removed (TFA) and capped with acid chloride (e.g. AcCl) and the other protecting groups are removed to the desired product.

Scheme-2: General Route for the Synthesis in Solid Phase



[0089] The general route for the N-Boc protected amino acids in solid phase peptide synthesis is shown in Scheme 2. First, the N-Fmoc of the resin (Rink) is deprotected (piperidine, DMF) and then coupled with an N-Fmoc protected amino acid under standard conditions (e.g., DIC, HOBt, Et₃N) and the resulting product is deprotected as above to the resin-bound amido-amino. The latter is coupled with another appropriately protected amino acid under the standard conditions and repeated once more. The N-Fmoc is removed (piperidine, DMF) and capped with acid chloride (e.g. AcCl) and the other protecting groups are removed to the desired product.

The Scaffold Intermediates:

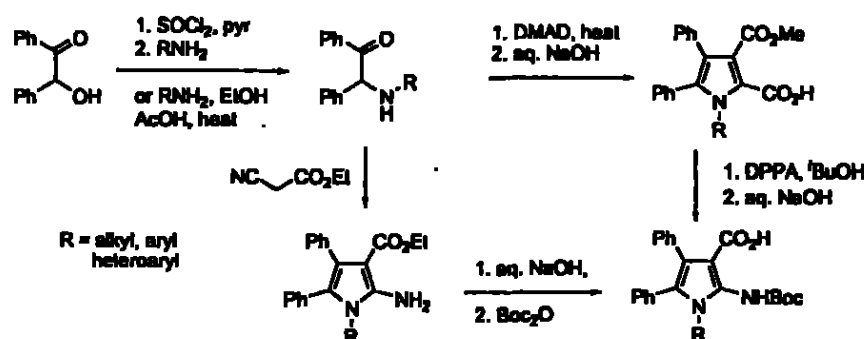


[0090] The scaffold replacements are shown above. Though, the N-Fmoc & N-Cbz derivatives are not shown, prepared as well. The syntheses of the latter intermediates are not depicted in the schemes but prepared in a similar fashion (using FmocCl) as their N-Boc derivatives. The schemes below describe the synthesis of these valuable intermediates.

[0091] The synthesis of 2-amino-pyrrole-3-carboxylic acid derivatives is shown in Scheme 3. Benzoin is reacted with SOCl_2 to the corresponding chloride, and then reacted with amine the alpha-keto amine. Alternatively, the latter is prepared directly from benzoin, when heated the amine in presence of a weaker acid (e. g. AcOH) in alcohol solvent. The amine is not monomer, instead, is oligomeric in nature (from Mass and proton NMR). The alpha-keto amine is reacted with dimethyl acetylenedicarboxylate (DMAD) in MeOH to the pyrrole product in good yield. The ester at 2-position is selectively hydrolyzed with 1 equivalent of aqueous NaOH in MeOH and acidified with dilute HCl. The resulting acid is submitted under Curtius rearrangement [diphenyl phosphoryl azide (DPPA), *tert*-BuOH, heat). The N-Boc protected ester is hydrolyzed (aq. NaOH, heat, then dilute HCl) to the corresponding acid.

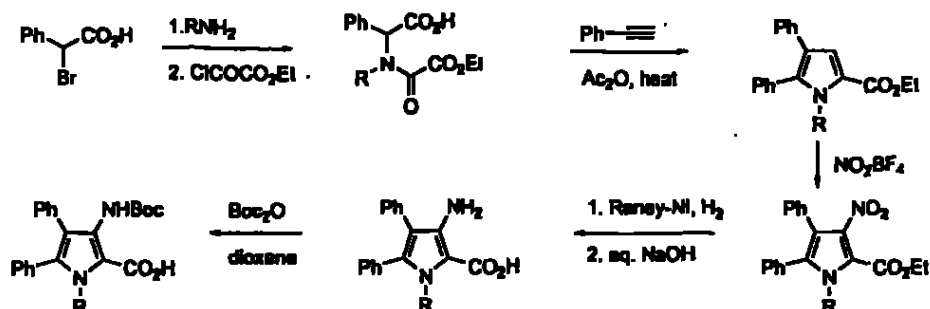
[0092] Alternatively, the alpha-keto amine is reacted with ethyl cyanoacetate to the 2-amino-pyrrole (Scheme-3) and the latter is hydrolyzed and N-Boc protected under standard conditions.

Scheme-3: Synthesis of 2-amino-pyrrole-3-carboxylic acid derivative



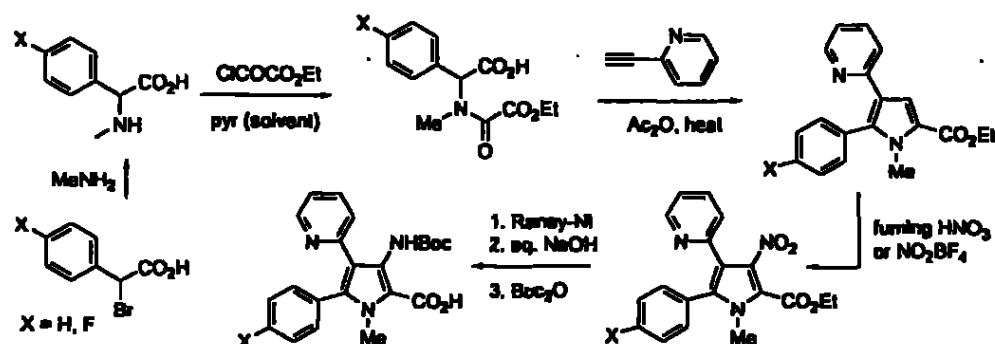
[0093] The syntheses of 3-amino-pyrrole-2-carboxylic acid derivatives are shown in Scheme 4 and Scheme 5. The amine is reacted with alpha-bromo-phenyl acetic acid, followed by treatment with acid chloride. The resulting amido-acid is treated with a dipolarophile (aryl-acetylene) in acetic anhydride to the pyrrole. The latter is successively nitrated (HNO_3 or nitronium salt), reduced (Raney-Nickel, H_2 , EtOH/THF), hydrolyzed (aq. NaOH, heat) and N-protected (Boc_2O , dioxane) to the desired product (Scheme 4).

Scheme-4: Synthesis of 3-amino-pyrrole-2-carboxylic acid derivative



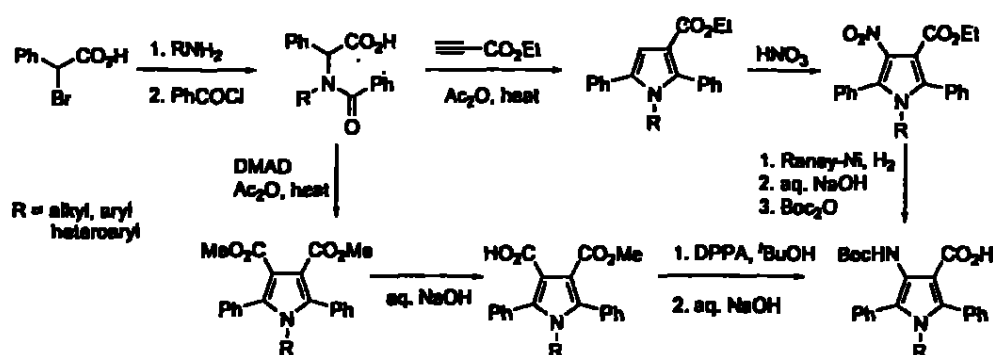
[0094] Scheme 5 shows the synthesis of heteroaryl-tethered pyrrole nucleus. The amido-acid is prepared similarly as shown previously (Scheme 4). The pyrrole nucleus is nitrated (HNO_3 or nitronium salt). The latter is then reduced, hydrolyzed, N-Boc protected as given in Scheme 5.

Scheme-5: Synthesis of 4-(2-pyridyl)-3-amino-pyrrole-2-carboxylic acid derivative

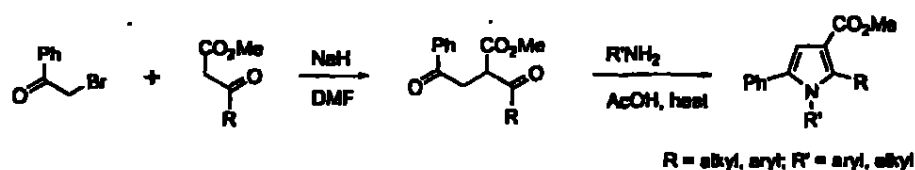


[0095] For the synthesis of the 4-amino-pyrrole-3-carboxylic acid derivatives, two routes are presented, as shown in Scheme 5 and Scheme 6. The alpha-amino acid is reacted with an acid chloride in pyridine to the N-acyl compound, which is heated with dimethyl acetylenedicarboxylate (DMAD) in acetic anhydride to the expected symmetrical pyrrole. The diacid is selectively hydrolyzed (1.0 equivalent aq. NaOH; dilute HCl) to the monoacid. The latter is treated with diphenyl phosphorylazide (DPPA) [benzene, tert-BuOH, heat] and aq. NaOH [heat; dilute HCl] to the desired compound (Scheme 6).

[0096] Alternatively, the amido-acid is reacted with propargyl ester in acetic anhydride, followed by nitration to the nitro-acid (Scheme 6). The nitro group then is reduced (Raney-Nickel, H_2 , EtOH/THF) to the amine, the ester is hydrolyzed (Aq. NaOH) and the amine is protected (Boc_2O , dioxane) according to the Scheme 4.

Scheme-6: Synthesis of 4-amino-pyrrole-3-carboxylic acid derivative

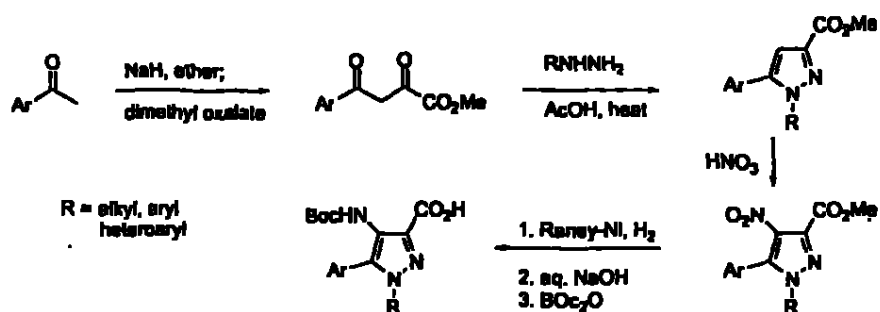
[0097] A completely different approach for the synthesis of the 4-amino-pyrrole-3-carboxylic acid derivatives is sketched in Scheme 7. First, a beta-keto ester is alkylated at the alpha position and the resulting diketo ester is treated with an amine to the pyrrole-3-carboxylate. The latter is converted to the desired product as shown in Scheme 6.

Scheme-7: Synthesis of 4-amino-pyrrole-3-carboxylic acid (continued)

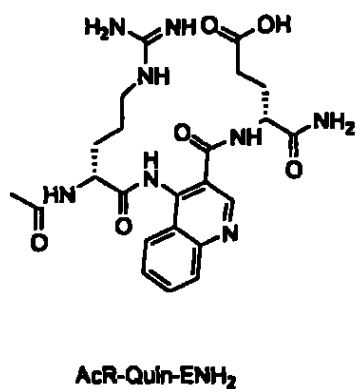
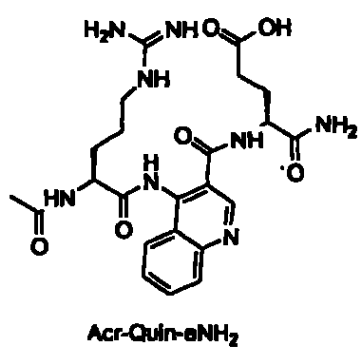
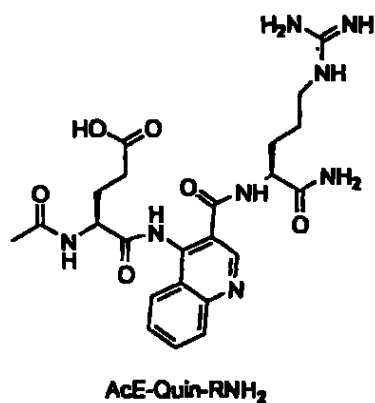
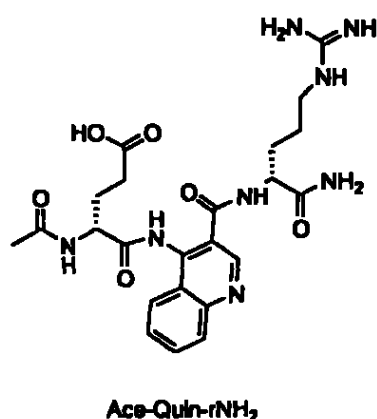
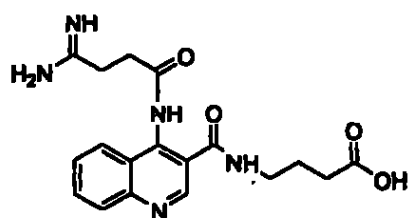
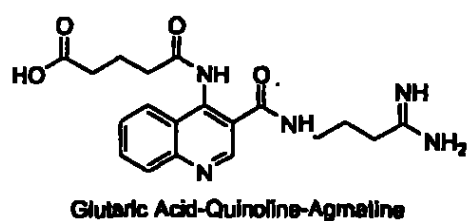
[0098] The synthesis of pyrazole nucleus is outlined in Scheme 8. In presence of base, aryl ketone is reacted with oxalate ester, followed by acidification to the 1,3-diketo-compound. The latter is reacted with a substituted hydrazine to pyrazole-3-carboxylate derivative. Subsequent nitration (HNO_3 or nitronium salt), reduction (Raney-Nickel, H_2), ester hydrolysis (aq. NaOH), and amine protection (Boc_2O) lead to the desired compound.

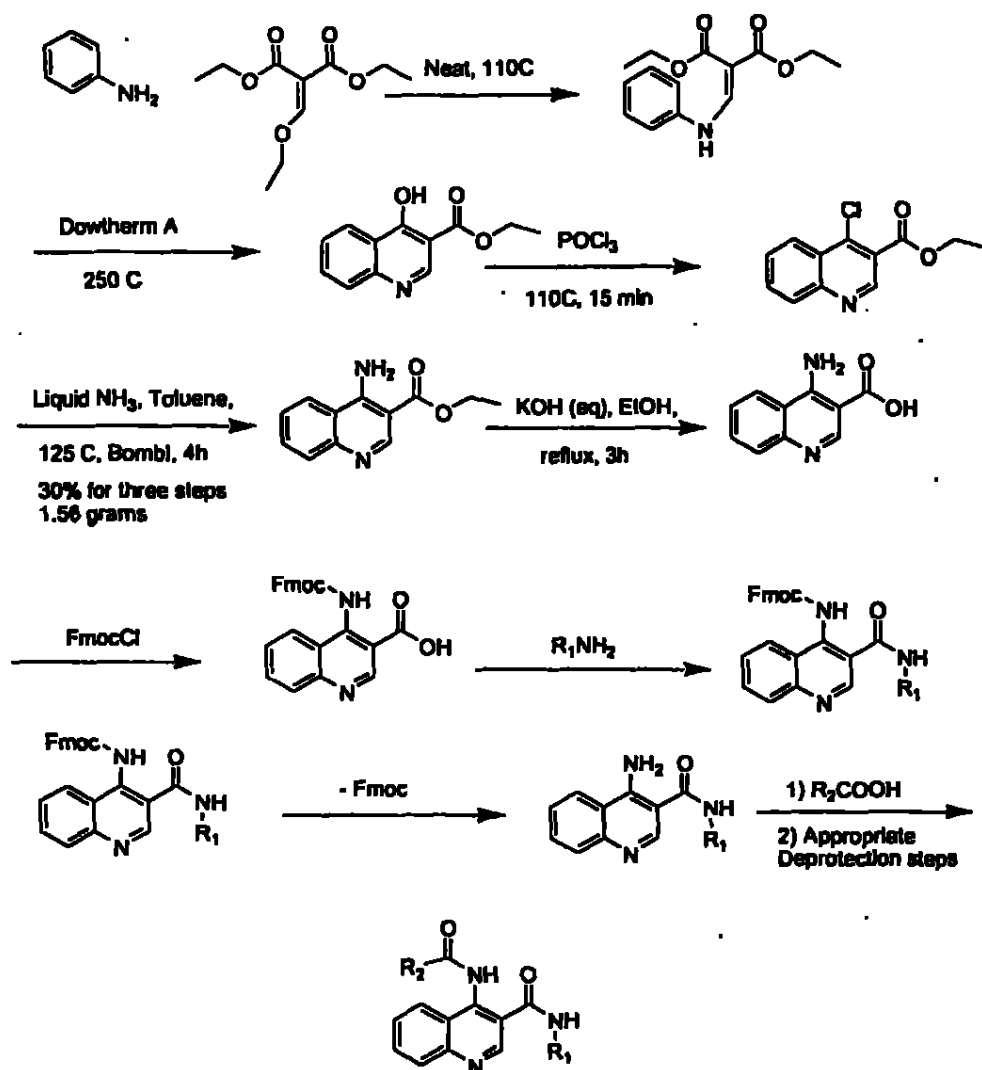
Scheme-8: Synthesis of 4-amino-pyrazole-3-carboxylic acid derivative

28



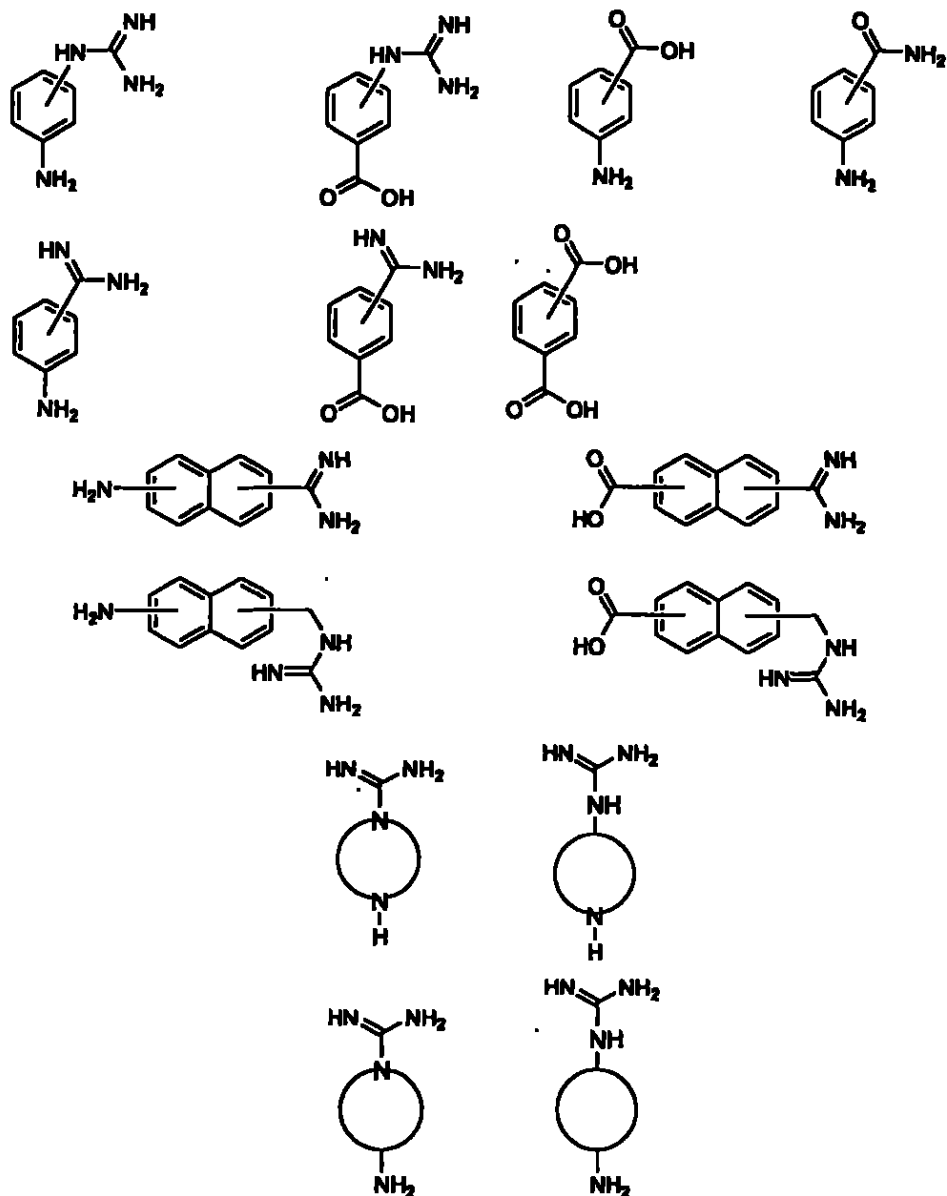
[0099] Another embodiment of the RCT mediators using an HMG CoA reductase scaffold is based on nisvastatin, as shown below. A general scheme to the synthesis of these compounds is also shown.





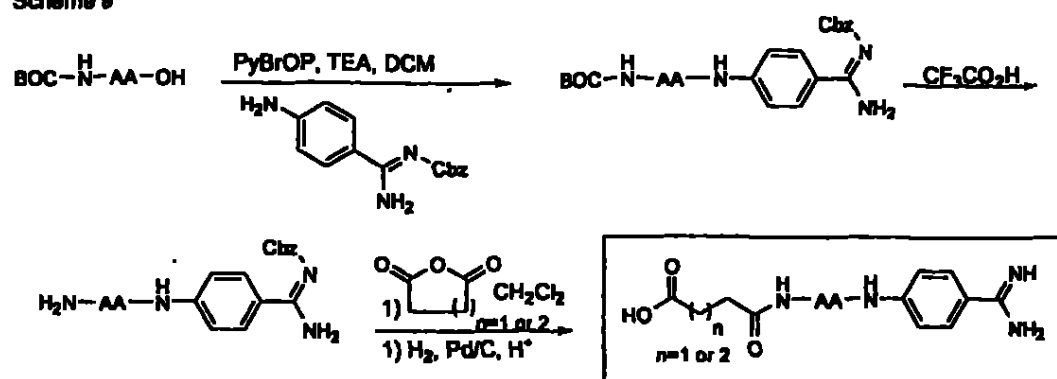
Bioisosteres Used Within the Structures of the Mediators of RCT

[0100] Examples of preferred bioisosteres that can be used within preferred RCT mediators are shown below. Bioisosteres containing a guanidium or amidino group serve to substitute an amino acid, such as arginine. Bioisosteres containing a carboxylic acid serve to substitute an amino acid, such as glutamate. Any other bioisostere that can serve to substitute the basic amino acids, arginine, lysine, or histidine, and the acidic amino acids, glutamate and aspartate are contemplated. Circles represent cyclic structures, including non-aromatic and aromatic structures.

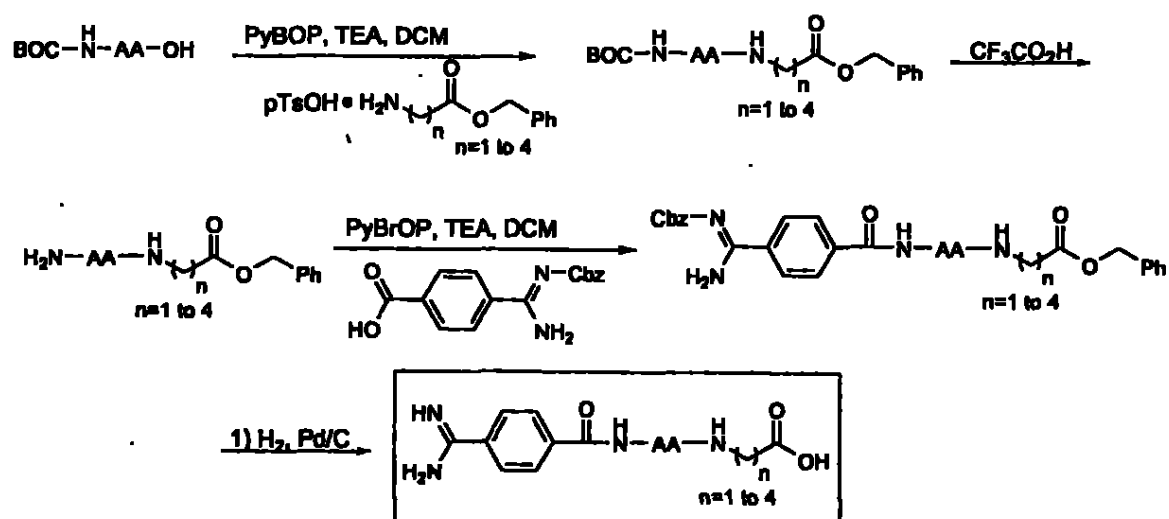


[0101] The synthetic schemes below show examples of methods that can be used to synthesize RCT mediators bearing bioisosteres. The term "AA" can represent a lipophilic scaffold in the schemes.

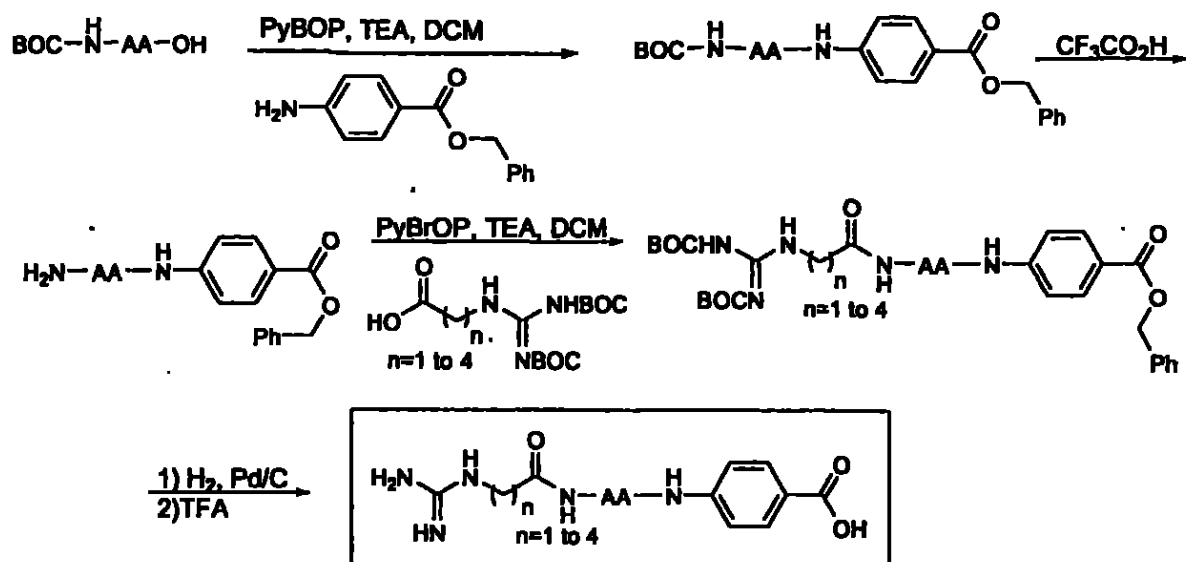
Scheme 9



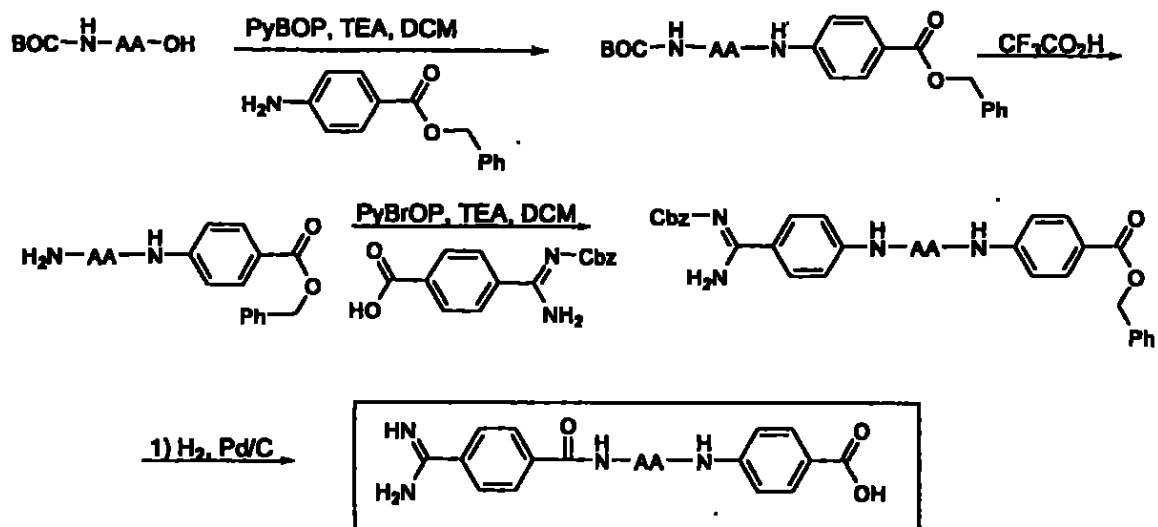
Scheme 10



Scheme 11



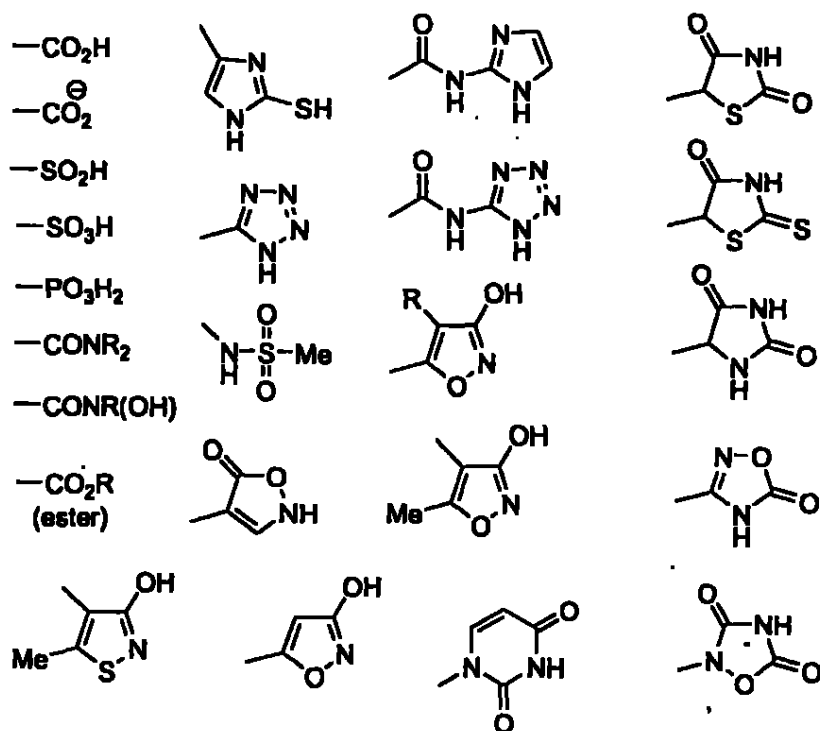
Scheme 12



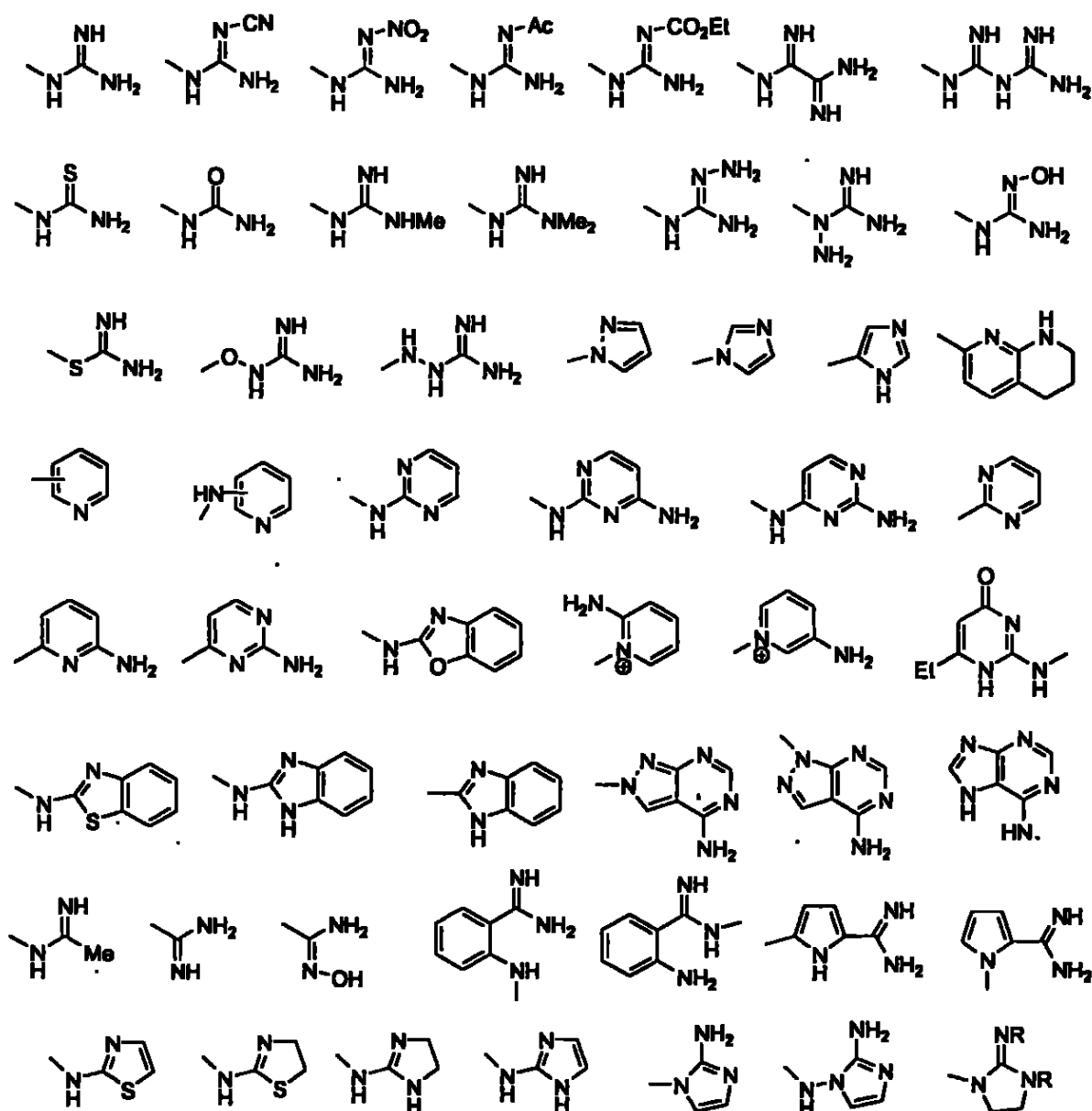
[0102] Examples of bioisosteres for carboxylic acid and guanidine groups are shown below.

32

Carboxylic Acid Biolsosteres (R = H/alkyl).

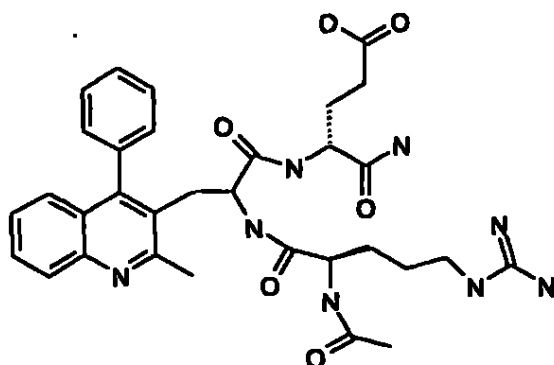


Guanidine Bloisosteres (R = H/alkyl)

Preferred Mediators

[0103] In preferred embodiments, the mediator may be selected from the group consisting of 4-Agmatine-3-amidoGABAquinoline, 4-(1-(4-aminobutylcarbamoyl)-2-(2-methyl-4-phenylquinolin-3-yl)ethylcarbamoyl)butanoic acid, and 4-(5-guanidinopentylamino)quinoline-3-carboxylic acid. Any underivatized amino and/or carboxy terminal amino acid residues in the

above list of preferred compounds are capped with a protecting group. In another preferred embodiment, the mediator has the structure:



Analysis of Structure and Function

[0104] The structure and function of the mediators of RCT of the preferred embodiments, including the multimeric forms described above, can be assayed in order to select active compounds. For example, the mediators can be assayed for their ability to form α -helices, to bind lipids, to form complexes with lipids, to activate LCAT, and to promote cholesterol efflux, etc.

[0105] Methods and assays for analyzing the structure and/or function of the mediators are well-known in the art. Preferred methods are provided in the working examples, *infra*. For example, the circular dichroism (CD) and nuclear magnetic resonance (NMR) assays described, *infra*, can be used to analyze the structure of the mediators—particularly the degree of helicity in the presence of lipids. The ability to bind lipids can be determined using the fluorescence spectroscopy assay described, *infra*. The ability of the mediators to activate LCAT can be readily determined using the LCAT activation described, *infra*. The *in vitro* and *in vivo* assays described, *infra*, can be used to evaluate the half-life, distribution, cholesterol efflux and effects on RCT.

Synthetic Methods

[0106] The preferred embodiments may be prepared using virtually any art-known technique for the preparation of compounds. For example, the compounds may be prepared using conventional step-wise solution or solid phase peptide syntheses.

[0107] The mediators of RCT may be prepared using conventional step-wise solution or solid phase synthesis (see, e.g., *Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins*, Williams et al., Eds., 1997, CRC Press, Boca Raton Fla., and references cited therein; *Solid Phase*

Peptide Synthesis: A Practical Approach, Atherton & Sheppard, Eds., 1989, IRL Press, Oxford, England, and references cited therein).

[0108] In conventional solid-phase synthesis, attachment of the first amino acid or analog thereof entails chemically reacting its carboxyl-terminal (C-terminal) end with derivatized resin to form the carboxyl-terminal end of the oligopeptide. The alpha-amino end of the amino acid is typically blocked with a t-butoxy-carbonyl group (Boc) or with a 9-fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) group to prevent the amino group which could otherwise react from participating in the coupling reaction. The side chain groups of the amino acids or analogs, if reactive, are also blocked (or protected) by various benzyl-derived protecting groups in the form of ethers, thioethers, esters, and carbamates.

[0109] The next step and subsequent repetitive cycles involve deblocking the amino-terminal (N-terminal) resin-bound amino acid (or terminal residue of the peptide chain) to remove the alpha-amino blocking group, followed by chemical addition (coupling) of the next blocked amino acid. This process is repeated for however many cycles are necessary to synthesize the entire molecule of interest. After each of the coupling and deblocking steps, the resin-bound molecule is thoroughly washed to remove any residual reactants before proceeding to the next. The solid support particles facilitate removal of reagents at any given step as the resin and resin-bound peptide can be readily filtered and washed while being held in a column or device with porous openings.

[0110] Synthesized molecules may be released from the resin by acid catalysis (typically with hydrofluoric acid or trifluoroacetic acid), which cleaves the molecule from the resin leaving an amide or carboxyl group on its C-terminal. Acidolytic cleavage also serves to remove the protecting groups from the side chains of the amino acids in the synthesized peptide. Finished peptides can then be purified by any one of a variety of chromatography methods.

[0111] In accordance with a preferred embodiment, the peptides and peptide derivative mediators of RCT were synthesized by solid-phase synthesis methods with N^α-Fmoc chemistry. N^α-Fmoc protected amino acids and Rink amide MBHA resin and Wang resin were purchased from Novabiochem (San Diego, CA) or Chem-Impex Intl (Wood Dale, IL). Other chemicals and solvents were purchased from the following sources: trifluoroacetic acid (TFA), anisole, 1,2-ethanedithiol, thioanisole, piperidine, acetic anhydride, 2-Naphthoic acid and Pivaloic acid (Aldrich, Milwaukee, WI), HOBt and NMP (Chem-Impex Intl, Wood Dale, IL), dichloromethane,

methanol and HPLC grade solvents from Fischer Scientific, Pittsburgh, PA. The purity of the peptides was checked by LC/MS. The purification of the peptides was achieved using Preparative HPLC system (Agilent technologies, 1100 Series) on a C₁₈-bonded silica column (Tosoh Biospec preparative column, ODS-80TM, Dim: 21.5 mm x 30cm). The peptides were eluted with a gradient system [50% to 90% of B solvent (acetonitrile:water 60:40 with 0.1% TFA)].

[0112] All peptides and analogs thereof were synthesized in a stepwise fashion via the solid-phase method, using Rink amide MBHA resin (0.5-0.66 mmol/g) or wang resin (1.2 mmol/g). The side chain's protecting groups were Arg (Pbf), Glu (OtBu) and Asp (OtBu). Each Fmoc-protected amino acid was coupled to this resin using a 1.5 to 3-fold excess of the protected amino acids. The coupling reagents were N-hydroxybenzotriazole (HOBt) and diisopropyl carbodiimide (DIC), and the coupling was monitored by Ninhydrin test. The Fmoc group was removed with 20% piperidine in NMP 30-60 minutes treatment and then successive washes with CH₂Cl₂, 10%TEA in CH₂Cl₂, Methanol and CH₂Cl₂. Coupling steps were followed by acetylation or with other capping groups as necessary.

[0113] A mixture of TFA, thioanisole, ethanedithiol and anisole (90:5:3:2, v/v) was used (4-5 hours at room temperature) to cleave the peptide from the peptide-resin and remove all of the side chain protecting groups. The crude peptide mixture was filtered from the sintered funnel, which was washed with TFA (2-3 times). The filtrate was concentrated into thick syrup and added into cold ether. The peptide precipitated as a white solid after keeping overnight in the freezer and centrifugation. The solution was decanted and the solid was washed thoroughly with ether. The resulting crude peptide was dissolved in buffer (acetonitrile:water 60:40 with 0.1% TFA) and dried. The crude peptide was purified by HPLC using preparative C-18 column (reverse phase) with a gradient system 50 – 90% B in 40 minutes [Buffer A: water containing 0.1% (v/v) TFA, Buffer B: Acetonitrile:water (60:40) containing 0.1% (v/v) TFA]. The pure fractions were concentrated over Speedvac. The yields varied from 5% to 20%.

[0114] Alternatively, the peptides of the preferred embodiments may be prepared by way of segment condensation, i.e., the joining together of small constituent peptide chains to form a larger peptide chain, as described, for example, in Liu et al., 1996, *Tetrahedron Lett.* 37(7):933-936; Baca, et al., 1995, *J. Am. Chem. Soc.* 117:1881-1887; Tam et al., 1995, *Int. J. Peptide Protein Res.* 45:209-216; Schnolzer and Kent, 1992, *Science* 256:221-225; Liu and Tam, 1994, *J. Am. Chem. Soc.* 116(10):4149-4153; Liu and Tam, 1994, *PNAS. USA* 91:6584-6588; Yamashiro and Li,

1988, *Int. J. Peptide Protein Res.* 31:322-334; Nakagawa et al., 1985, *J. Am Chem. Soc.* 107:7087-7083; Nokihara et al., 1989, *Peptides* 1988:166-168; Kneib-Cordonnier et al., 1990, *Int. J. Pept. Protein Res.* 35:527-538; the disclosures of which are incorporated herein in their entirety by reference thereto). Other methods useful for synthesizing the peptides of the preferred embodiments are described in Nakagawa et al., 1985, *J. Am. Chem. Soc.* 107:7087-7092.

[0115] For peptides produced by segment condensation, the coupling efficiency of the condensation step can be significantly increased by increasing the coupling time. Typically, increasing the coupling time results in increased racemization of the product (Sieber et al., 1970, *Helv. Chim. Acta* 53:2135-2150). Mediators of RCT containing N- and/or C-terminal blocking groups can be prepared using standard techniques of organic chemistry. For example, methods for acylating the N-terminus of a peptide or amidating or esterifying the C-terminus of a peptide are well-known in the art. Modes of carrying other modifications at the N- and/or C-terminus will be apparent to those of skill in the art, as will modes of protecting any side-chain functionalities as may be necessary to attach terminal blocking groups.

[0116] Likewise, for example, methods for deprotection of a protecting group on the N-terminus of a peptide or the C-terminus of a peptide are well-known in the art. Modes of carrying other modifications at the N- and/or C-terminus will be apparent to those of skill in the art, as will modes of deprotecting any side-chain functionalities as may be necessary to remove terminal blocking groups.

[0117] Pharmaceutically acceptable salts (counter ions) can be conveniently prepared by ion-exchange chromatography or other methods as are well known in the art.

Pharmaceutical Formulations and Methods of Treatment

[0118] The mediators of RCT of the preferred embodiments can be used to treat any disorder in animals, especially mammals including humans, for which lowering serum cholesterol is beneficial, including without limitation conditions in which increasing serum HDL concentration, activating LCAT, and promoting cholesterol efflux and RCT is beneficial. Such conditions include, but are not limited to hyperlipidemia, and especially hypercholesterolemia, and cardiovascular disease such as atherosclerosis (including treatment and prevention of atherosclerosis) and coronary artery disease; restenosis (e.g., preventing or treating atherosclerotic plaques which develop as a consequence of medical procedures such as balloon angioplasty); and other disorders, such as

ischemia, and endotoxemia, which often results in septic shock. The mediators of RCT can be used alone or in combination therapy with other drugs used to treat the foregoing conditions. Such therapies include, but are not limited to simultaneous or sequential administration of the drugs involved.

[0119] For example, in the treatment of hypercholesterolemia or atherosclerosis, the formulations of molecular mediators of RCT can be administered with any one or more of the cholesterol lowering therapies currently in use; e.g., bile-acid resins, niacin, and/or statins. Such a combined treatment regimen may produce particularly beneficial therapeutic effects since each drug acts on a different target in cholesterol synthesis and transport; i.e., bile-acid resins affect cholesterol recycling, the chylomicron and LDL population; niacin primarily affects the VLDL and LDL population; the statins inhibit cholesterol synthesis, decreasing the LDL population (and perhaps increasing LDL receptor expression); whereas the mediators of RCT affect RCT, increase HDL, increase LCAT activity and promote cholesterol efflux.

[0120] The mediators of RCT may be used in conjunction with fibrates to treat hyperlipidemia, hypercholesterolemia and/or cardiovascular disease such as atherosclerosis.

[0121] The mediators of RCT can be used in combination with the anti-microbials and anti-inflammatory agents currently used to treat septic shock induced by endotoxin.

[0122] The mediators of RCT can be formulated as molecule-based compositions or as molecule-lipid complexes which can be administered to subjects in a variety of ways, preferably via oral administration, to deliver the mediators of RCT to the circulation. Exemplary formulations and treatment regimens are described below.

[0123] In another preferred embodiment, methods are provided for ameliorating and/or preventing one or more symptoms of hypercholesterolemia and/or atherosclerosis. The methods preferably involve administering to an organism, preferably a mammal, more preferably a human one or more of the compounds of the preferred embodiments (or mimetics of such compounds). The compound(s) can be administered, as described herein, according to any of a number of standard methods including, but not limited to injection, suppository, nasal spray, time-release implant, transdermal patch, and the like. In one particularly preferred embodiment, the compound(s) are administered orally (e.g. as a syrup, capsule, or tablet).

[0124] The methods involve the administration of a single compound of the preferred embodiments or the administration of two or more different compounds. The compounds can be

provided as monomers or in dimeric, oligomeric or polymeric forms. In certain embodiments, the multimeric forms may comprise associated monomers (e.g. ionically or hydrophobically linked) while certain other multimeric forms comprise covalently linked monomers (directly linked or through a linker).

[0125] While the preferred embodiments are described with respect to use in humans, it is also suitable for animal, e.g. veterinary use. Thus preferred organisms include, but are not limited to humans, non-human primates, canines, equines, felines, porcines, ungulates, largomorphs, and the like.

[0126] The methods of the preferred embodiments are not limited to humans or non-human animals showing one or more symptom(s) of hypercholesterolemia and/or atherosclerosis (e.g., hypertension, plaque formation and rupture, reduction in clinical events such as heart attack, angina, or stroke, high levels of low density lipoprotein, high levels of very low density lipoprotein, or inflammatory proteins, etc.), but are useful in a prophylactic context. Thus, the compounds of the preferred embodiments (or mimetics thereof) may be administered to organisms to prevent the onset/development of one or more symptoms of hypercholesterolemia and/or atherosclerosis. Particularly preferred subjects in this context are subjects showing one or more risk factors for atherosclerosis (e.g., family history, hypertension, obesity, high alcohol consumption, smoking, high blood cholesterol, high blood triglycerides, elevated blood LDL, VLDL, IDL, or low HDL, diabetes, or a family history of diabetes, high blood lipids, heart attack, angina or stroke, etc.). The preferred embodiments include the pharmaceutical formulations and the use of such preparations in the treatment of hyperlipidemia, hypercholesterolemia, coronary heart disease, atherosclerosis, diabetes, obesity, Alzheimer's Disease, multiple sclerosis, conditions related to hyperlipidemia, such as inflammation, and other conditions such as endotoxemia causing septic shock.

[0127] In one preferred embodiment, the molecular mediators of RCT can be synthesized or manufactured using any technique described herein pertaining to synthesis and purification of the mediators of RCT. Stable preparations which have a long shelf life may be made by lyophilizing the compounds—either to prepare bulk for reformulation, or to prepare individual aliquots or dosage units which can be reconstituted by rehydration with sterile water or an appropriate sterile buffered solution prior to administration to a subject.

[0128] In another preferred embodiment, the mediators of RCT may be formulated and administered in a molecule-lipid complex. This approach has some advantages since the complex

should have an increased half-life in the circulation, particularly when the complex has a similar size and density to HDL, and especially the pre- β -1 or pre- β -2 HDL populations. The molecule-lipid complexes can conveniently be prepared by any of a number of methods described below. Stable preparations having a long shelf life may be made by lyophilization—the co-lyophilization procedure described below being the preferred approach. The lyophilized molecule-lipid complexes can be used to prepare bulk for pharmaceutical reformulation, or to prepare individual aliquots or dosage units which can be reconstituted by rehydration with sterile water or an appropriate buffered solution prior to administration to a subject.

[0129] A variety of methods well known to those skilled in the art can be used to prepare the molecule-lipid vesicles or complexes. To this end, a number of available techniques for preparing liposomes or proteoliposomes may be used. For example, the compound can be cosonicated (using a bath or probe sonicator) with appropriate lipids to form complexes. Alternatively the compound can be combined with preformed lipid vesicles resulting in the spontaneous formation of molecule-lipid complexes. In yet another alternative, the molecule-lipid complexes can be formed by a detergent dialysis method; e.g., a mixture of the compound, lipid and detergent is dialyzed to remove the detergent and reconstitute or form molecule-lipid complexes (e.g., see Jonas et al., 1986, *Methods in Enzymol.* 128:553-582).

[0130] While the foregoing approaches are feasible, each method presents its own peculiar production problems in terms of cost, yield, reproducibility and safety. In accordance with one preferred method, the compound and lipid are combined in a solvent system which co-solubilizes each ingredient and can be completely removed by lyophilization. To this end, solvent pairs should be carefully selected to ensure co-solubility of both the amphipathic compound and the lipid. In one embodiment, compound(s) or derivatives/analogs thereof, to be incorporated into the particles can be dissolved in an aqueous or organic solvent or mixture of solvents (solvent 1). The (phospho)lipid component is dissolved in an aqueous or organic solvent or mixture of solvents (solvent 2) which is miscible with solvent 1, and the two solutions are mixed. Alternatively, the compound and lipid can be incorporated into a co-solvent system; i.e., a mixture of the miscible solvents. A suitable proportion of compound to lipids is first determined empirically so that the resulting complexes possess the appropriate physical and chemical properties; i.e., usually (but not necessarily) similar in size to HDL. The resulting mixture is frozen and lyophilized to dryness.

Sometimes an additional solvent must be added to the mixture to facilitate lyophilization. This lyophilized product can be stored for long periods and will remain stable.

[0131] The lyophilized product can be reconstituted in order to obtain a solution or suspension of the molecule-lipid complex. To this end, the lyophilized powder may be rehydrated with an aqueous solution to a suitable volume (often 5 mgs compound/ml which is convenient for intravenous injection). In a preferred embodiment the lyophilized powder is rehydrated with phosphate buffered saline or a physiological saline solution. The mixture may have to be agitated or vortexed to facilitate rehydration, and in most cases, the reconstitution step should be conducted at a temperature equal to or greater than the phase transition temperature of the lipid component of the complexes. Within minutes, a clear preparation of reconstituted lipid-protein complexes results.

[0132] An aliquot of the resulting reconstituted preparation can be characterized to confirm that the complexes in the preparation have the desired size distribution; e.g., the size distribution of HDL. Gel filtration chromatography can be used to this end. For example, a Pharmacia Superose 6 FPLC gel filtration chromatography system can be used. The buffer used contains 150 mM NaCl in 50 mM phosphate buffer, pH 7.4. A typical sample volume is 20 to 200 microliters of complexes containing 5 mgs compound/ml. The column flow rate is 0.5 mls/min. A series of proteins of known molecular weight and Stokes' diameter as well as human HDL are preferably used as standards to calibrate the column. The proteins and lipoprotein complexes are monitored by absorbance or scattering of light of wavelength 254 or 280 nm.

[0133] The mediators of RCT of the preferred embodiments can be complexed with a variety of lipids, including saturated, unsaturated, natural and synthetic lipids and/or phospholipids. Suitable lipids include, but are not limited to, small alkyl chain phospholipids, egg phosphatidylcholine, soybean phosphatidylcholine, dipalmitoylphosphatidylcholine, dimyristoylphosphatidylcholine, distearoylphosphatidylcholine, 1-myristoyl-2-palmitoylphosphatidylcholine, 1-palmitoyl-2-myristoylphosphatidylcholine, 1-palmitoyl-2-stearoylphosphatidylcholine, 1-stearoyl-2-palmitoylphosphatidylcholine, dioleoylphosphatidylcholine, dioleophosphatidylethanolamine, dilauroylphosphatidylglycerol, phosphatidylcholine, phosphatidylserine, phosphatidylethanolamine, phosphatidylinositol, sphingomyelin, sphingolipids, phosphatidylglycerol, diphosphatidylglycerol, dimyristoylphosphatidylglycerol, dipalmitoylphosphatidylglycerol, distearoylphosphatidylglycerol, dioleoylphosphatidylglycerol, dimyristoylphosphatidic acid, dipalmitoylphosphatidic acid,

dimyristoylphosphatidylethanolamine, dipalmitoylphosphatidylethanolamine, dimyristoylphosphatidylserine, dipalmitoylphosphatidylserine, brain phosphatidylserine, brain sphingomyelin, dipalmitoylsphingomyelin, distearoylsphingomyelin, phosphatidic acid, galactocerebroside, gangliosides, cerebroside, dilaurylphosphatidylcholine, (1,3)-D-mannosyl-(1,3)diglyceride, aminophenylglycoside, 3-cholesteryl-6'-(glycosylthio)hexyl ether glycolipids, and cholesterol and its derivatives.

[0134] The pharmaceutical formulation of the preferred embodiments contain the molecular mediators of RCT or the molecule-lipid complex as the active ingredient in a pharmaceutically acceptable carrier suitable for administration and delivery *in vivo*. As the compounds may contain acidic and/or basic termini and/or side chains, the compounds can be included in the formulations in either the form of free acids or bases, or in the form of pharmaceutically acceptable salts.

[0135] Injectable preparations include sterile suspensions, solutions or emulsions of the active ingredient in aqueous or oily vehicles. The compositions may also contain formulating agents, such as suspending, stabilizing and/or dispersing agent. The formulations for injection may be presented in unit dosage form, e.g., in ampules or in multidose containers, and may contain added preservatives.

[0136] Alternatively, the injectable formulation may be provided in powder form for reconstitution with a suitable vehicle, including but not limited to sterile pyrogen free water, buffer, dextrose solution, etc., before use. To this end, the mediators of RCT may be lyophilized, or the co-lyophilized molecule-lipid complex may be prepared. The stored preparations can be supplied in unit dosage forms and reconstituted prior to use *in vivo*.

[0137] For prolonged delivery, the active ingredient can be formulated as a depot preparation, for administration by implantation; e.g., subcutaneous, intradermal, or intramuscular injection. Thus, for example, the active ingredient may be formulated with suitable polymeric or hydrophobic materials (e.g., as an emulsion in an acceptable oil) or ion exchange resins, or as sparingly soluble derivatives; e.g., as a sparingly soluble salt form of the mediators of RCT.

[0138] Alternatively, transdermal delivery systems manufactured as an adhesive disc or patch which slowly releases the active ingredient for percutaneous absorption may be used. To this end, permeation enhancers may be used to facilitate transdermal penetration of the active ingredient. A particular benefit may be achieved by incorporating the mediators of RCT of the

preferred embodiments or the molecule-lipid complex into a nitroglycerin patch for use in patients with ischemic heart disease and hypercholesterolemia.

[0139] For oral administration, the pharmaceutical compositions may take the form of, for example, tablets or capsules prepared by conventional means with pharmaceutically acceptable excipients such as binding agents (e.g., pregelatinised maize starch, polyvinylpyrrolidone or hydroxypropyl methylcellulose); fillers (e.g., lactose, microcrystalline cellulose or calcium hydrogen phosphate); lubricants (e.g., magnesium stearate, talc or silica); disintegrants (e.g., potato starch or sodium starch glycolate); or wetting agents (e.g., sodium lauryl sulfate). The tablets may be coated by methods well known in the art. Liquid preparations for oral administration may take the form of, for example, solutions, syrups or suspensions, or they may be presented as a dry product for constitution with water or other suitable vehicle before use. Such liquid preparations may be prepared by conventional means with pharmaceutically acceptable additives such as suspending agents (e.g., sorbitol syrup, cellulose derivatives or hydrogenated edible fats); emulsifying agents (e.g., lecithin or acacia); non-aqueous vehicles (e.g., almond oil, oily esters, ethyl alcohol or fractionated vegetable oils); and preservatives (e.g., methyl or propyl-p-hydroxybenzoates or sorbic acid). The preparations may also contain buffer salts, flavoring, coloring and sweetening agents as appropriate. Preparations for oral administration may be suitably formulated to give controlled release of the active compound.

[0140] For buccal administration, the compositions may take the form of tablets or lozenges formulated in conventional manner. For rectal and vaginal routes of administration, the active ingredient may be formulated as solutions (for retention enemas) suppositories or ointments.

[0141] For administration by inhalation, the active ingredient can be conveniently delivered in the form of an aerosol spray presentation from pressurized packs or a nebulizer, with the use of a suitable propellant, e.g., dichlorodifluoromethane, trichlorofluoromethane, dichlorotetrafluoroethane, carbon dioxide or other suitable gas. In the case of a pressurized aerosol the dosage unit may be determined by providing a valve to deliver a metered amount. Capsules and cartridges of e.g. gelatin for use in an inhaler or insufflator may be formulated containing a powder mix of the compound and a suitable powder base such as lactose or starch.

[0142] The compositions may, if desired, be presented in a pack or dispenser device which may contain one or more unit dosage forms containing the active ingredient. The pack may

2/37

for example comprise metal or plastic foil, such as a blister pack. The pack or dispenser device may be accompanied by instructions for administration.

[0143] The molecule mediators of RCT and/or molecule-lipid complexes of the preferred embodiments may be administered by any suitable route that ensures bioavailability in the circulation. This can be achieved by parenteral routes of administration, including intravenous (IV), intramuscular (IM), intradermal, subcutaneous (SC) and intraperitoneal (IP) injections. However, other routes of administration may be used. For example, absorption through the gastrointestinal tract can be accomplished by oral routes of administration (including but not limited to ingestion, buccal and sublingual routes) provided appropriate formulations (e.g., enteric coatings) are used to avoid or minimize degradation of the active ingredient, e.g., in the harsh environments of the oral mucosa, stomach and/or small intestine. Oral administration has the advantage of easy of use and therefore enhanced compliance. Alternatively, administration via mucosal tissue such as vaginal and rectal modes of administration may be utilized to avoid or minimize degradation in the gastrointestinal tract. In yet another alternative, the formulations of the preferred embodiments can be administered transcutaneously (e.g., transdermally), or by inhalation. It will be appreciated that the preferred route may vary with the condition, age and compliance of the recipient.

[0144] The actual dose of molecular mediators of RCT or molecule-lipid complex used will vary with the route of administration, and should be adjusted to achieve circulating plasma concentrations of 1.0 mg/l to 2 g/l. Data obtained in animal model systems described herein show that the ApoA-I agonists of the preferred embodiments associate with the HDL component, and have a projected half-life in humans of about five days. Thus, in one embodiment, the mediators of RCT can be administered by injection at a dose between 0.5 mg/kg to 100 mg/kg once a week. In another embodiment, desirable serum levels may be maintained by continuous infusion or by intermittent infusion providing about 0.1 mg/kg/hr to 100 mg/kg/hr.

[0145] Toxicity and therapeutic efficacy of the various mediators of RCT can be determined using standard pharmaceutical procedures in cell culture or experimental animals for determining the LD₅₀ (the dose lethal to 50% of the population) and the ED₅₀ (the dose therapeutically effective in 50% of the population). The dose ratio between toxic and therapeutic effects is the therapeutic index and it can be expressed as the ratio LD₅₀/ED₅₀. ApoA-I molecular agonists which exhibit large therapeutic indices are preferred.

Other Uses

[0146] The mediators of RCT agonists of the preferred embodiments can be used in assays *in vitro* to measure serum HDL, e.g., for diagnostic purposes. Because the mediators of RCT associate with the HDL and LDL component of serum, the agonists can be used as "markers" for the HDL and LDL population. Moreover, the agonists can be used as markers for the subpopulation of HDL that are effective in RCT. To this end, the agonist can be added to or mixed with a patient serum sample; after an appropriate incubation time, the HDL component can be assayed by detecting the incorporated mediators of RCT. This can be accomplished using labeled agonist (e.g., radiolabels, fluorescent labels, enzyme labels, dyes, etc.), or by immunoassays using antibodies (or antibody fragments) specific for the agonist.

[0147] Alternatively, labeled agonist can be used in imaging procedures (e.g., CAT scans, MRI scans) to visualize the circulatory system, or to monitor RCT, or to visualize accumulation of HDL at fatty streaks, atherosclerotic lesions, etc. (where the HDL should be active in cholesterol efflux).

Assays For Analysis of Mediators of Reverse Cholesterol Transport

LCAT Activation Assay

[0148] The mediators of RCT in accordance with preferred embodiments can be evaluated for potential clinical efficacy by various *in vitro* assays, for example, by their ability to activate LCAT *in vitro*. In the LCAT assay, substrate vesicles (small unilamellar vesicles or "SUVs") composed of egg phosphatidylcholine (EPC) or 1-palmitoyl-2-oleyl-phosphatidyl-choline (POPC) and radiolabelled cholesterol are preincubated with equivalent masses either of compound or ApoA-I (isolated from human plasma). The reaction is initiated by addition of LCAT (purified from human plasma). Native ApoA-I, which was used as positive control, represents 100% activation activity. "Specific activity" (i.e., units of activity (LCAT activation)/unit of mass) of the molecular mediators can be calculated as the concentration of mediator that achieves maximum LCAT activation. For example, a series of concentrations of the compound (e.g., a limiting dilution) can be assayed to determine the "specific activity" for the compound—the concentration which achieves maximal LCAT activation (i.e., percentage conversion of cholesterol to cholesterol ester) at a specific timepoint in the assay (e.g., 1 hr.). When plotting percentage conversion of

cholesterol at, e.g., 1 hr., against the concentration of compound used, the "specific activity" can be identified as the concentration of compound that achieves a plateau on the plotted curve.

Preparation of Substrate Vesicles

[0149] The vesicles used in the LCAT assay are SUVs composed of egg phosphatidylcholine (EPC) or 1-palmitoyl-2-oleyl-phosphatidylcholine (POPC) and cholesterol with a molar ratio of 20:1. To prepare a vesicle stock solution sufficient for 40 assays, 7.7 mg EPC (or 7.6 mg POPC; 10 μ mol), 78 μ g (0.2 μ mol) 4-¹⁴C-cholesterol, 116 μ g cholesterol (0.3 μ mol) are dissolved in 5 ml xylene and lyophilized. Thereafter 4 ml of assay buffer is added to the dry powder and sonicated under nitrogen atmosphere at 4°C. Sonication conditions: Branson 250 sonicator, 10 mm tip, 6×5 minutes; Assay buffer: 10 mM Tris, 0.14 M NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.4. The sonicated mixture is centrifuged 6 times for 5 minutes each time at 14,000 rpm (16,000×g) to remove titanium particles. The resulting clear solution is used for the enzyme assay.

Purification of LCAT

[0150] For the LCAT purification, dextran sulfate/Mg²⁺ treatment of human plasma is used to obtain lipoprotein deficient serum (LPDS), which is sequentially chromatographed on Phenylsepharose, Affigelblue, ConcanavalinA sepharose and anti-ApoA-I affinity chromatography.

Preparation of LPDS

[0151] To prepare LPDS, 500 ml plasma is added to 50 ml dextran sulfate (MW=500,000) solution. Stir 20 minutes. Centrifuge for 30 minutes at 3000 rpm (16,000×g) at 4°C. Use supernatant (LPDS) for further purification (ca. 500 ml).

Phenylsepharose Chromatography

[0152] The following materials and conditions were used for the phenylsepharose chromatography. Solid phase: phenylsepharose fast flow, high subst. grade, Pharmacia column: XK26/40, gel bed height: 33 cm, V = ca, 175 ml flow rates: 200 ml/hr (sample) wash: 200 ml/hr (buffer) elution: 80 ml/hr (distilled water) buffer: 10 mM Tris, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 7.4, 0.01% sodium azide.

[0153] Equilibrate the column in Tris-buffer, add 29 g NaCl to 500 ml LPDS and apply to the column., Wash with several volumes of Tris buffer until the absorption at 280 nm wavelength is approximately at the baseline, then start the elution with distilled water. The fractions containing protein are pooled (pool size: 180 ml) and used for Affigelblue chromatography.

Affigelblue Chromatography

[0154] The phenylsepharose pool is dialyzed overnight at 4°C against 20 mM Tris-HCl, pH7.4, 0.01% sodium azide. The pool volume is reduced by ultrafiltration (Amicon YM30) to 50-60 ml and loaded on an Affigelblue column. Solid phase: Affigelblue, Biorad, 153-7301 column, XK26/20, gel bed height: ca. 13 cm; column volume: approx. 70 ml. Flow rates: loading: 15 ml/h wash: 50 ml/h. Equilibrate column in Tris-buffer. Apply phenylsepharose pool to column. Start in parallel to collect fractions. Wash with Tris-buffer. The pooled fractions (170 ml) were used for ConA chromatography.

ConA Chromatography

[0155] The Affigelblue pool was reduced via Amicon (YM30) to 30-40 ml and dialyzed against ConA starting buffer (1 mM Tris HCl pH7.4; 1 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂, 1 mM CaCl₂, 0.01% sodium azide) overnight at 4°C. Solid phase: ConA sepharose (Pharmacia) column: XK26/20, gel bed height: 14 cm (75 ml). Flow rates: loading 40 ml/h washing (with starting buffer): 90 ml/h elution: 50 ml/h, 0.2M Methyl- α -D-mannoside in 1 mM Tris, pH 7.4. The protein fractions of the mannoside elutions were collected (110 ml), and the volume was reduced by ultrafiltration (YM30) to 44 ml. The ConA pool was divided in 2 ml aliquots, which are stored at -20°C.

Anti-ApoA-I Affinity Chromatography

[0156] Anti-ApoA-I affinity chromatography was performed on Affigel-Hz material (Biorad), to which the anti-ApoA-I abs have been coupled covalently. Column: XK16/20, V = 16 ml. The column was equilibrated with PBS pH 7.4. Two ml of the ConA pool was dialyzed for 2 hours against PBS before loading onto the column. Flow rates: loading: 15 ml/hour washing (PBS) 40 ml/hour. The pooled protein fractions (V=14 ml) are used for LCAT assays. The column is regenerated with 0.1 M. Citrate buffer (pH 4.5) to elute bound A-I (100 ml), and immediately after this procedure reequilibrated with PBS.

Pharmacokinetics of the Mediators of RCT

[0157] The following experimental protocols can be used to demonstrate that the mediators of RCT are stable in the circulation and associate with the HDL component of plasma.

Synthesis and/or Radiolabeling of Compound Agonists

[0158] The ¹²⁵I-labeled LDL was prepared by the iodine monochloride procedure to a specific activity of 500-900 cpm/ng (Goldstein and Brown 1974 *J. Biol. Chem.* 249:5153-5162).

Binding and degradation of low density lipoproteins by cultured human fibroblasts were determined at final specific activities of 500-900 cpm/ng as described (Goldstein and Brown 1974 *J. Biol. Chem.* 249:5153-5162). In every case, >99% radioactivity was precipitable by incubation of the lipoproteins at 4°C with 10% (wt/vol) trichloroacetic acid (TCA). The Tyr residue was attached to N-Terminus of each compound to enable its radioiodination. The compounds were radioiodinated with Na¹²⁵I (ICN), using Iodo-Beads (Pierce Chemicals) and following the manufacturer's protocol, to a specific activity of 800-1000 cpm/ng. After dialysis, the precipitable radioactivity (10% TCA) of the compounds was always >97%.

[0159] Alternatively, radiolabeled compounds could be synthesized by coupling ¹⁴C-labeled Fmoc-Pro as the N-terminal amino acid. L-[U-¹⁴C]X, specific activity 9.25 GBq/mmol, can be used for the synthesis of labeled agonists containing X. The synthesis may be carried out according to Lapatsanis, *Synthesis*, 1983, 671-173. Briefly, 250 μM (29.6 mg) of unlabeled L-X is dissolved in 225 μl of a 9% Na₂CO₃ solution and added to a solution (9% Na₂CO₃) of 9.25 MBq (250 μM) ¹⁴C-labeled L-X. The liquid is cooled down to 0° C, mixed with 600 μM (202 mg) 9-fluorenylmethyl-N-succinimidylcarbonate (Fmoc-OSu) in 0.75 ml DMF and shaken at room temperature for 4 hr. Thereafter, the mixture is extracted with Diethylether (2×5ml) and chloroform (1×5ml), the remaining aqueous phase is acidified with 30% HCl and extracted with chloroform (5×8 ml). The organic phase is dried over Na₂SO₄, filtered off and the volume is reduced under nitrogen flow to 5 ml. The purity was estimated by TLC (CHCl₃:MeOH:Hac, 9:1:0.1 v/v/v, stationary phase HPTLC silicagel 60, Merck, Germany) with UV detection, e.g., radiochemical purity:Linear Analyzer, Berthold, Germany; reaction yields may be approximately 90% (as determined by LSC).

[0160] The chloroform solution containing ¹⁴C-compound X is used directly for synthesis. A resin containing amino acids 2-22, can be synthesized automatically as described above and used for the synthesis. The sequence of the peptide is determined by Edman degradation. The coupling is performed as previously described except that HATU (O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphate) is preferably used instead of TBTU. A second coupling with unlabeled Fmoc-L-X is carried out manually.

Pharmacokinetics in Mice

[0161] In each experiment, 300 – 500 μg/kg (0.3 – 0.5 mg/kg) [or more such as 2.5 mg/kg] radiolabeled compound may be injected intraperitoneally into mice which were fed normal

mouse chow or the atherogenic Thomas-Harcroft modified diet (resulting in severely elevated VLDL and IDL cholesterol). Blood samples are taken at multiple time intervals for assessment of radioactivity in plasma.

Stability in Human Serum

[0162] 100 µg of labeled compound may be mixed with 2 ml of fresh human plasma (at 37°C) and delipidated either immediately (control sample) or after 8 days of incubation at 37°C (test sample). Delipidation is carried out by extracting the lipids with an equal volume of 2:1 (v/v) chloroform:methanol. The samples are loaded onto a reverse-phase C₁₈ HPLC column and eluted with a linear gradient (25-58% over 33 min) of acetonitrile (containing 0.1% w TFA). Elution profiles are followed by absorbance (220 nm) and radioactivity.

Formation of Pre-β Like Particles

[0163] Human HDL may be isolated by KBr density ultra centrifugation at density $d = 1.21$ g/ml to obtain top fraction followed by Superose 6 gel filtration chromatography to separate HDL from other lipoproteins. Isolated HDL is adjusted to a final concentration of 1.0 mg/ml with physiological saline based on protein content determined by Bradford protein assay. An aliquot of 300 µl is removed from the isolated HDL preparation and incubated with 100 µl labeled compound (0.2-1.0 µg/µl) for two hours at 37°C. Multiple separate incubations are analyzed including a blank containing 100 µl physiological saline and four dilutions of labeled compound. For example: (i) 0.20 µg/µl compound:HDL ratio = 1:15; (ii) 0.30 µg/µl compound:HDL ratio = 1:10; (iii) 0.60 µg/µl compound:HDL ratio = 1:5; and (iv) 1.00 µg/µl compound:HDL ratio = 1:3. Following the two hour incubation, a 200 µl aliquot of the sample (total volume = 400 µl) is loaded onto a Superose 6 gel filtration column for lipoprotein separation and analysis and 100 µl is used to determine total radioactivity loaded.

Association of Mediators With Human Lipoproteins

[0164] The association of molecular mediators with human lipoprotein fractions can be determined by incubating labeled compound with each lipoprotein class (HDL, LDL and VLDL) and a mixture of the different lipoprotein classes. HDL, LDL and VLDL are isolated by KBr density gradient ultracentrifugation at $d = 1.21$ g/ml and purified by FPLC on a Superose 6B column size exclusion column (chromatography is carried out with a flow rate of 0.7 ml/min and a running buffer of 1 mM Tris (pH 8), 115 mM NaCl, 2 mM EDTA and 0.0% NaN₃). Labeled compound is incubated with HDL, LDL and VLDL at a compound:phospholipid ratio of 1:5 (mass

ratio) for 2 h at 37° C. The required amount of lipoprotein (volumes based on amount needed to yield 1000 µg) is mixed with 0.2 ml of compound stock solution (1 mg/ml) and the solution is brought up to 2.2 ml using 0.9% of NaCl.

[0165] After incubating for 2 hr at 37°C, an aliquot (0.1 ml) is removed for determination of the total radioactivity (e.g., by liquid scintillation counting or gamma counting depending on labeling isotope), the density of the remaining incubation mixture is adjusted to 1.21 g/ml with KBr, and the samples centrifuged at 100,000 rpm (300,000 g) for 24 hours at 4° C in a TLA 100.3 rotor using a Beckman tabletop ultracentrifuge. The resulting supernatant is fractionated by removing 0.3 ml aliquots from the top of each sample for a total of 5 fractions, and 0.05 ml of each fraction is used for counting. The top two fractions contain the floating lipoproteins, the other fractions (3-5) correspond to compound in solution.

Selective Binding to HDL Lipids

[0166] Human plasma (2 ml) is incubated with 20, 40, 60, 80, and 100 µg of labeled compound for 2 hr at 37°C. The lipoproteins are separated by adjusting the density to 1.21 g/ml and centrifugation in TLA 100.3 rotor at 100,000 rpm (300,000 g) for 36 hr at 4° C. The top 900 µl (in 300 µl fractions) is taken for the analysis. 50 µl from each 300 µl fraction is counted for radioactivity and 200 µl from each fraction is analyzed by FPLC (Superose 6/Superose 12 combination column).

Use of the Mediators of Reverse Cholesterol Transport in Animal Model Systems

[0167] The efficacy of the mediators of RCT of the preferred embodiments can be demonstrated in rabbits or other suitable animal models.

Preparation of the Phospholipid/Compound Complexes

[0168] Small discoidal particles consisting of phospholipid (DPPC) and compound are prepared following the cholate dialysis method. The phospholipid is dissolved in chloroform and dried under a stream of nitrogen. The compound is dissolved in buffer (saline) at a concentration of 1-2 mg/ml. The lipid film is redissolved in buffer containing cholate (43°C) and the compound solution is added at a 3:1 phospholipid/compound weight ratio. The mixture is incubated overnight at 43° C and dialyzed at 43°C (24 hr), room temperature (24 hr) and 4°C (24 hr), with three changes of buffer (large volumes) at temperature point. The complexes may be filter sterilized (0.22 µm) for injection and storage at 4°C.

Isolation and Characterization of the Compound/Phospholipid Particles

[0169] The particles may be separated on a gel filtration column (Superose 6 HR). The position of the peak containing the particles is identified by measuring the phospholipid concentration in each fraction. From the elution volume, the Stokes radius can be determined. The concentration of compound in the complex is determined by measuring the phenylalanine content (by HPLC) following a 16 hr acid hydrolysis.

Injection in the Rabbit

[0170] Male New Zealand White rabbits (2.5-3 kg) are injected intravenously with a dose of phospholipid/compound complex (5 or 10 mg/kg bodyweight, expressed as compound) in a single bolus injection not exceeding 10-15 ml. The animals are slightly sedated before the manipulations. Blood samples (collected on EDTA) are taken before and 5, 15, 30, 60, 240 and 1440 minutes after injection. The hematocrit (Hct) is determined for each sample. Samples are aliquoted and stored at -20°C before analysis.

Analysis of the Rabbit Sera

[0171] The total plasma cholesterol, plasma triglycerides and plasma phospholipids are determined enzymatically using commercially available assays, for example, according to the manufacturer's protocols (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany and Biomerieux, 69280, Marcy-L'etoile, France).

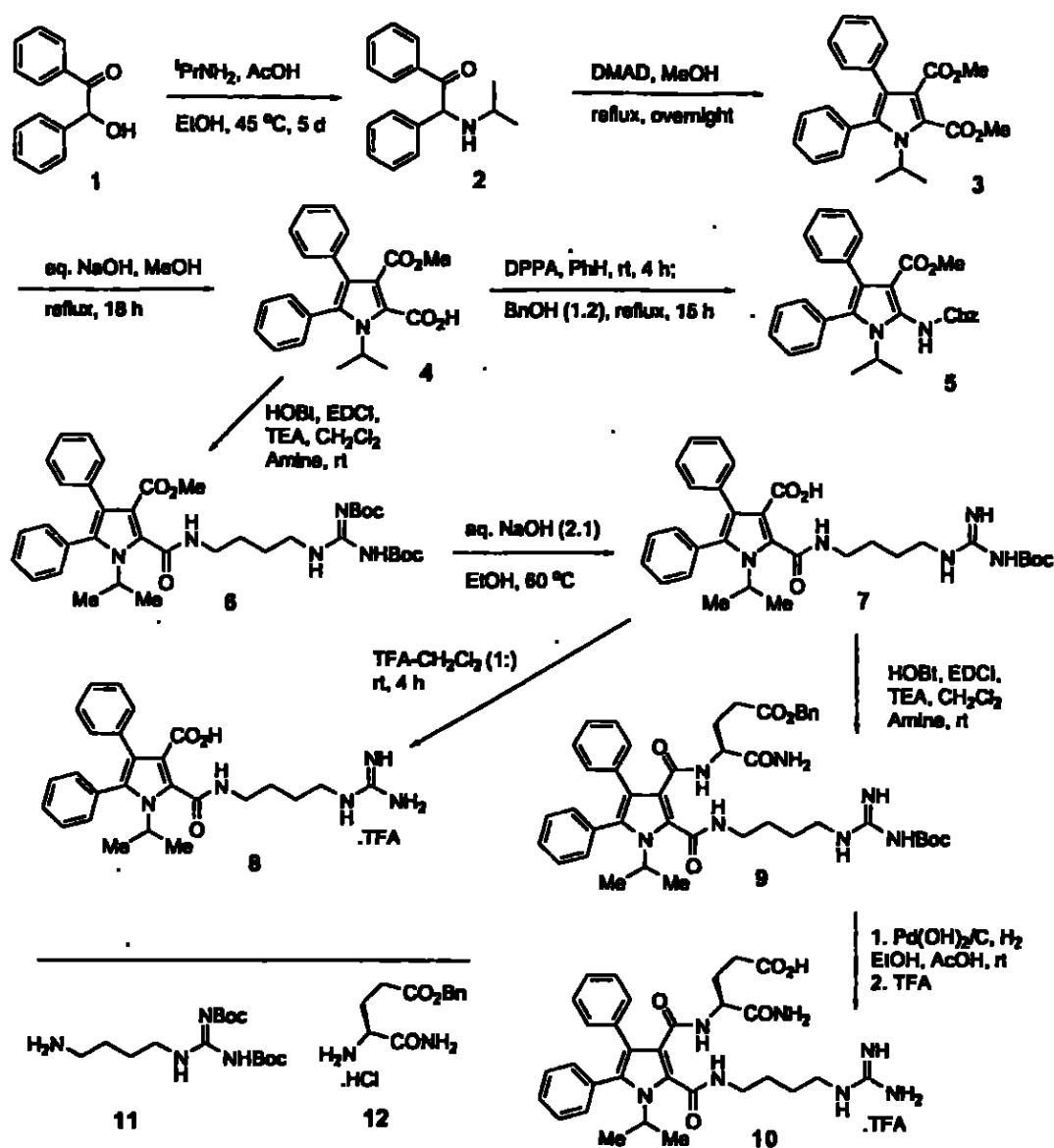
[0172] The plasma lipoprotein profiles of the fractions obtained after the separation of the plasma into its lipoprotein fractions may be determined by spinning in a sucrose density gradient. For example, fractions are collected and the levels of phospholipid and cholesterol can be measured by conventional enzymatic analysis in the fractions corresponding to the VLDL, ILDL, LDL and HDL lipoprotein densities.

Synthesis of RCT Mediators Bearing Modified Amino Acids or Molecular Group Bioisosteres or Functional Group Bioisosteres**Synthesis of Lipophilic Group Modified Peptide Sequence Based on Atorvastatin****General Analytical Methods.**

[0173] All reagents were of commercial quality. Solvents were dried and purified by standard methods. Amino acid derivatives were obtained from commercial sources. Analytical TLC was performed on aluminum sheets coated with a 0.2 mm layer of silica gel 60 F₂₅₄, Merck, and preparative TLC was performed on 20 cm × 20 cm glass plates coated with a 2 mm layer of

silica gel PF₂₅₄, Merck. Silica gel 60 (230-400 mesh), Merck, was used for flash chromatography. Melting points were taken on a micro-hot-stage apparatus and are uncorrected. ¹H NMR spectra were recorded with Bruker 400 spectrometer, operating at 400 MHz, using TMS or solvent as reference. Elemental analyses were carried out at NuMega Resonance Laboratories, San Diego. Preparative reverse-phase HPLC (Glison) of the final products was performed on a Phenomenex Luna 5μ C₁₈ (2) (60 mm × 21.2 mm) column with a flow rate of 15 mL/min, using a tunable UV detector set at 254 nm. Mixtures of CH₃CN and H₂O were used as mobile phases in gradient mode (CH₃CN = 5 % - 95 %). Analysis by LC/UV/ELSD/MS was performed using an API 150 EX instrument from PE Sciex. ESI-MS experiments were performed, in positive mode.

Scheme 12



2-(Isopropylamino)-1,2-diphenylethanone (2)

[0174] To a solution of benzoin (8.0 g, 37.7 mmol) in EtOH (150 mL) was added isopropylamine (2.45 g, 41.5 mmol), followed by glacial AcOH (few drops). The reaction was heated at 45°C for 5 d. The volatile materials were removed in a rotary evaporator and dried in vacuo. The crude material was used in the following reaction.

Dimethyl 1-isopropyl-4,5-diphenyl-1H-pyrrole-2,3-dicarboxylate (3)

43 42

[0175] Dimethyl acetylenedicarboxylate (DMAD, 7.0 g, 57 mmol) was added to the above amine 2 (8.0 g, 32 mmol) in MeOH (100 mL) and the reaction was heated at reflux overnight under argon. The reaction mixture was cooled in an ice-bath and filtered. The solids were washed with cold MeOH (20 mL) and dried to furnish pyrrole 3 as white powder (9.8 g, 82%).

3-(Methoxycarbonyl)-1-isopropyl-4,5-diphenyl-1H-pyrrole-2-carboxylic acid (4)

[0176] To the diester 2 (6.12 g, 16.1 mmol) were added MeOH (100 mL) and 1 M NaOH (aq., 17.05 mL). The mixture was heated at reflux for 18 h. The volatiles were removed in rotary evaporator. The residue was taken up in water (100 mL) and extracted with ether (2 x 50 mL) and kept aside to obtain unreacted starting material. The aqueous phase was acidified with 4 M HCl to pH ~3 and extracted with ether (3 x 60 mL), washed with water (50 mL) and dried (Na₂SO₄). After evaporation and drying, the monoacid 4 was obtained (5.02 g, 85%) as white solid.

Benzyl 3-(methoxycarbonyl)-1-isopropyl-4,5-diphenyl-1H-pyrrol-2-ylcarbamate (5)

[0177] To a solution of the above monoacid 4 (0.1 g, 0.27 mmol) in benzene (3 mL), triethylamine (45 μ L, 0.33 mmol) and diphenylphosphorylazide (DPPA, 0.091 g, 0.33 mmol) were added and stirred at rt for 4 h. Then benzyl alcohol (35 μ L, 33 mmol) was added and heated the reaction mixture at reflux for 15 h. The reaction was allowed to cool to rt and 5 % NaHCO₃ (5 mL) was added and extracted with ether (2 x 10 mL). Upon concentration, it gave the carbamate 5.

Methyl 2-(4-(N, N'-di(Boc)guanidiny)butylcarbamoyl)-1-isopropyl-4,5-diphenyl-1H-pyrrole-3-carboxylate (6)

[0178] To a solution of the acid 4 (0.1 g, 0.27 mmol) in CH₂Cl₂ (3 mL), EDCI (0.053 g, 0.27 mmol), HOBt (0.037 g, 0.27 mmol), Et₃N (38 μ L, 0.27 mmol) and amine 11 (0.086 g, 0.26 mmol) were added in that order and stirred at rt overnight. The reaction was diluted with CH₂Cl₂ (10 mL) and washed with satd. NaHCO₃ (5 mL), brine (5 mL) and dried (Na₂SO₄) to obtain amide 6 (0.165 g, 88.8%) as white solid.

2-(4-(N(Boc)guanidiny)butylcarbamoyl)-1-isopropyl-4,5-diphenyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (7)

[0179] To the ester 6 (0.16 g, 0.237 mmol) were added MeOH (10 mL) and 1 M NaOH (aq., 1.0 mL). The mixture was heated at reflux for 18 h. The volatiles were removed in rotary evaporator. The residue was taken up in water (10 mL) acidified with 4 M HCl to pH ~3 and

extracted with ether (3 x 10 mL), washed with water (10 mL) and dried (Na₂SO₄). After evaporation and drying, the acid 7 was obtained (0.121 g, 91%).

2-(4-(Guanidinyl)butylcarbamoyl)-1-isopropyl-4,5-diphenyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid.TFA (8)

[0180] To a solution of the above Boc-protected compound 7 (0.10 g, 0.178 mmol) in CH₂Cl₂ (3 mL) was added trifluoroacetic acid (3 mL) and stirred at rt for 4 h. The volatiles were removed in a rotary evaporator. Reverse-phase chromatography (CH₃CN-H₂O/0.1 % TFA) of the crude gave the desired product 8 (0.075 g, 91 %) as trifluoroacetic acid salt.

(S)- (4-(N3-(1-carbamoyl-3-carbobenzyloxypropyl)-1-isopropyl-4,5-diphenyl-1H-pyrrole-2,3-dicarboxamido)butyl)-N-(Boc)guanidine (9)

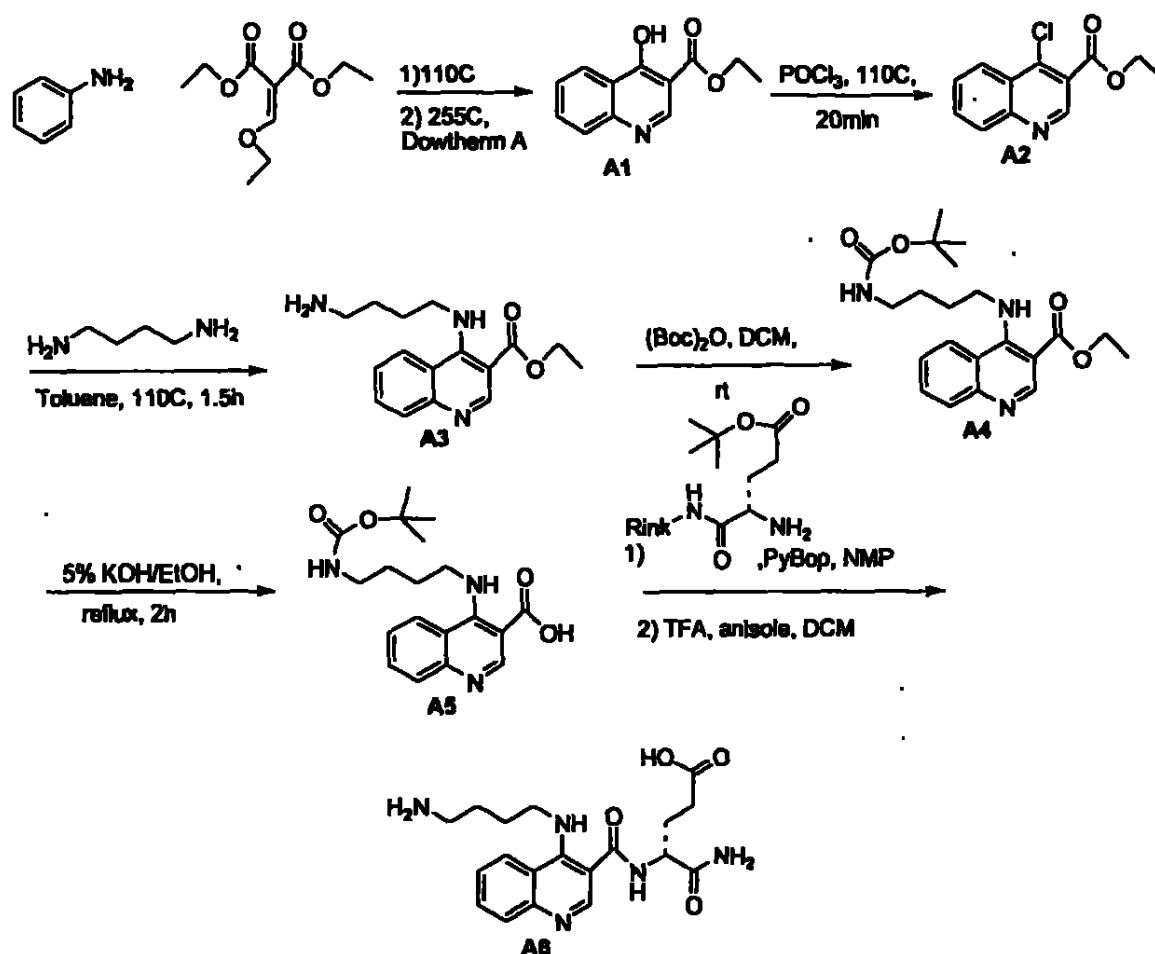
[0181] To a solution of the acid 7 (0.132 g, 0.23 mmol) in CH₂Cl₂ (10 mL), EDCI (0.051 g, 0.23 mmol), HOBt (0.032 g, 0.23 mmol), Et₃N (65 µL, 0.23 mmol) and amine 12 (0.061 g, 0.22 mol) were added in that order and stirred at rt overnight. The reaction was diluted with CH₂Cl₂ (10 mL) and washed with satd. NaHCO₃ (5 mL), brine (5 mL) and dried (Na₂SO₄) to obtain the white solid amide 6 (0.127 g, 69 %).

(S)- (4-(N3-(1-carbamoyl-3-carboxypropyl)-1-isopropyl-4,5-diphenyl-1H-pyrrole-2,3-dicarboxamido)butyl)guanidine.TFA (10)

[0182] To a solution of the benzyl ester 9 (0.02 g, 0.025 mmol) in EtOH (10 mL), acetic acid (0.1 mL) and 10 % Pd(OH)₂/C (0.01 g) were added and stirred at rt under hydrogen (balloon). After overnight stirring, the reaction was filtered, washed with EtOH and evaporated to obtain crude, which was taken in TFA (2 mL) and stirred at rt for 4 h. Upon evaporation and purification by reverse-phase chromatography (CH₃CN-H₂O/0.1 % TFA) the desired product was obtained as trifluoroacetic acid salt.

Synthesis of Lipophilic Group Modified Peptide Sequence Based on Nisvastatin

Scheme A

**Scheme A****Ethyl 4-hydroxyquinoline-3-carboxylate (A1)**

[0183] Aniline (2.15g, 23mmol) and diethyl ethoxymethylene malonate (5g, 23mmol) were mixed neat and heated at 110°C for 2h then cooled and allowed to stand at room temperature for 15h. During this time the reaction mixture crystallized.

[0184] Dowtherm A (70 mL) was heated to 255°C and the melted crystals were added and the mixture heated at 255°C for 20 min. The mixture was then poured into a stainless steel container cooled to 0°C with an ice bath. Hexanes were added to the cold solution to precipitate the product which was collected by filtration and rinsed with another portion of hexanes. The product

was recrystallized from EtOH to give the product as a white solid. (1.6g, 7.3mmol, 32%, M.P. 309C) that was used without further purification in the next step.

Ethyl 4-chloroquinoline-3-carboxylate (A2)

[0185] To solid ethyl 4-hydroxyquinoline-3-carboxylate (A1) (1.5g, 7mmol) was added POCl₃ (2.2g, 1.3mL, 14mmol) and the mixture heated at 110°C for 20 min. The mixture was poured into NH₃ (aq, 28-30%) and ice and then stirred until granular. The melted ice mixture was extracted with ether (3x40mL) and the combined organic layers dried (MgSO₄), filtered, and concentrated to give the product as an oil that crystallized on standing (1.44g, 6mmol, 87%) that was used as is without further purification.

Ethyl 4-(4-aminobutylamino)quinoline-3-carboxylate (A3)

[0186] To a solution of ethyl 4-chloroquinoline-3-carboxylate (A2) (0.5g, 2.1mmol) in toluene (10mL) was added diaminobutane (10x, 1.85g, 21mmol) and the mixture heated at 110°C for 1.5h. During this time a salt formed that was removed by filtration while hot and the filtrate concentrated under reduced pressure to give an oil. Water was added and the mixture extracted with DCM (2x25mL). The combined organic layers were dried (MgSO₄), filtered and concentrated to give an oil that crystallized on standing (476mg, 1.66mmol, 79%) that was used in subsequent steps without further purification.

tert-Butyl 4-(3-(ethoxycarbonyl)quinolin-4-ylamino)butylcarbamate (A4)

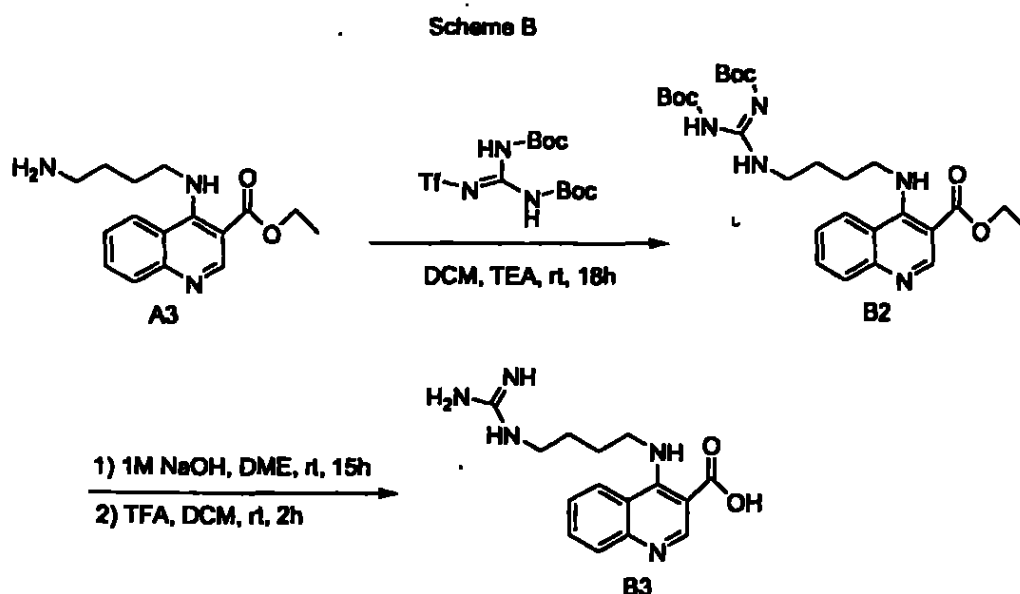
[0187] To a solution of ethyl 4-(4-aminobutylamino)quinoline-3-carboxylate (A3) in DCM (60mL) was added di-tert-butyl dicarbonate and the mixture stirred at room temperature for 8h. The mixture was washed with 2M Na₂CO₃ (20mL), water (20mL), sat. NaCl (20mL), dried (MgSO₄), filtered, and concentrated to give the product as a yellow oil (4g) that was used as is in the subsequent step.

4-(4-tert-Butoxycarbonylamino-butylamino)-quinoline-3-carboxylic acid (A5)

[0188] A solution of tert-Butyl 4-(3-(ethoxycarbonyl)quinolin-4-ylamino)butylcarbamate (A4) in ethanolic KOH (5%, 100mL) was refluxed for 2h and then concentrated under reduced pressure. The residue was dissolved in water (25mL) and HCl (20%) used to adjust the resulting mixture to pH-8. A solid appeared and was collected by filtration and the resulting cake washed with water and dried under vacuum to give the product as a white powder (2.763g) that was used in the next step.

4-([4-(4-Aminobutylamino)-quinoline-3-carbonyl]-amino)-4-carbamoyl-butyric acid (A6)

[0189] D-Glutamic acid tertbutyl ester bound to rink amide MBHA resin (2g, 1.32mmol), 4-(4-tert-Butoxycarbonylamine-butylamino)-quinoline-3-carboxylic acid (A5) (2eq; 950mg, 2.64mmol), and PyBop (1.4g, 2.64mmol) were added to a flame dried 50mL round bottomed flask. NMP (25mL) was added and the solution stirred for 18h at room temperature. The mixture was filtered and rinsed successively with DCM, MeOH alternating 3x each and air dried. The resulting beads were suspended in TFA (10mL) and anisole added (0.2mL) and stirred at room temperature for 1h. The solid was filtered off and the filtrate concentrated under reduced pressure to give an oil. Purification using reverse phase HPLC using ACN/H₂O/0.1%TFA (gradient from 5% to 95% ACN) gave the product as a white solid after lyophilization (127mg, 0.33mmol, 13%). MP 108°C, ¹H NMR (400MHz) δ 8.96 (d, J=7.6Hz, 1H), 8.72 (br s, 1H), 8.58 (d, J=8.4Hz, 1H), 7.94 (m, 2H), 7.71 (m, 4H), 7.63 (s, 1H), 7.18 (s, 1H), 4.35 (m, 1H), 2.81 (br s, 2H), 2.37 (m, 2H), 2.07-2.00 (series of m, 2H), 1.75 (m, 2H), 1.60 (m, 2H) EIMS *m/z* M⁺ 388.7. Anal. C₁₉H₂₅N₅O₄ + 2 TFA + 2 H₂O



Scheme B

4-(4-Bis-boc-guanidino-butylamine)-quinoline-3-carboxylic acid ethyl ester (B2)

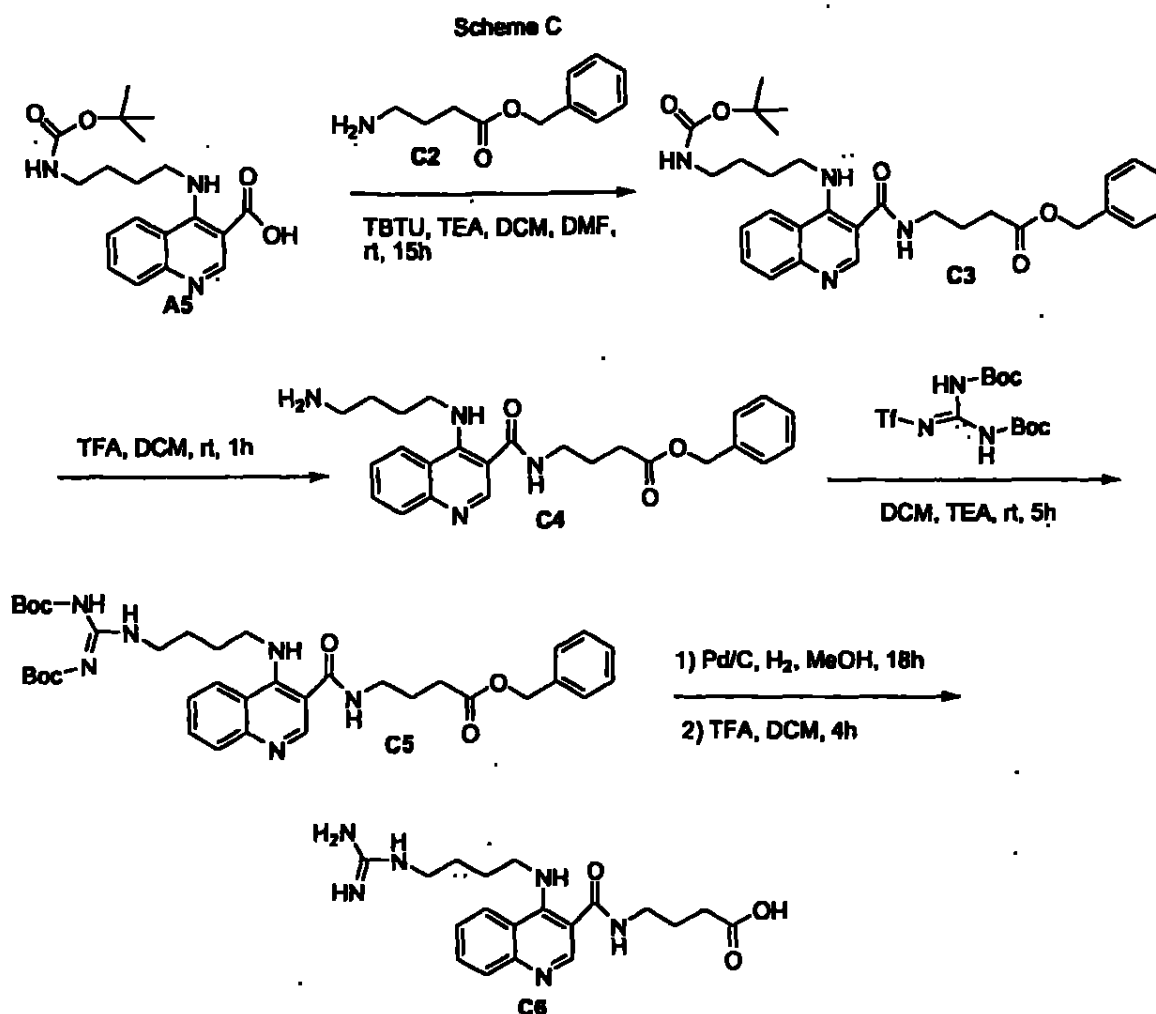
[0190] To a solution of 1,3-Di-boc-2-(trifluoromethylsulfonyl)guanidine (391mg, 1mmol) in dry DCM (4mL) was added ethyl 4-(4-aminobutylamino)quinoline-3-carboxylate (A3).

(0.3g, 1.05mmol) neat and the mixture stirred at room temperature for 15h. The mixture was diluted with DCM and washed with 2M NaHSO₄ (20mL), Sat. NaHCO₃ (20mL), Sat. NaCl (20mL), dried (MgSO₄), filtered and concentrated to give the product as a white foam (225mg) that was used as is in the subsequent step.

4-(4-guanidino-butylamine)-quinoline-3-carboxylic acid (B3)

[0191] To a solution of 4-(4-Bis-boc-guanidino-butylamine)-quinoline-3-carboxylic acid ethyl ester (B2) (255mg, 0.43mmol) in DME (2mL) was added 1M NaOH (2mL) and the solution stirred at room temperature for 6h. To this solution was added 2 drops of 20% KOH solution and stirring continued for 15h. The solution was concentrated to 1/3 the volume and the pH was adjusted to pH-6 with 1M HCl and the resulting white ppt collected by filtration and dried to give the product as a white solid. (0.132g, 0.26mmol, 61%)

[0192] To a solution of the white solid (152mg, 0.27mmol) in DCM (2mL) was added TFA (2mL) and the mixture stirred at room temperature for 2h. The mixture was concentrated under reduced pressure and the resulting residue was purified by reverse phase HPLC, H₂O/ACN/0.1%TFA (5% -95%ACN) and the resulting fractions concentrated by lyophilization to give the product as a white solid (43mg, 0.1mmol, 34%). MP-98°C, ¹H NMR (400MHz) δ8.82 (s, 1H), 8.49 (d, J=8.4Hz, 1H), 8.08 (s, 1H), 7.86 (m, 2H), 7.56 (t, J=7.6, 7.2Hz, 4H), 7.31 (br s, 4H), 3.98 (s, 2H), 3.20 (d, J=5.6Hz, 3H), 1.75 (dd, J=6.4,36.4Hz, ELMS m/z M⁺ 302.3. Anal. C₁₅H₁₉N₅O₂ + 1 TFA +2 H₂O

**Scheme C****4-([4-(4-tert-Butoxycarbonylamino-butylamino)-quinoline-3-carbonyl]-amino)-butyric acid benzyl ester (C3)**

[0193] To a suspension of 4-(4-tert-Butoxycarbonylamino-butylamino)-quinoline-3-carboxylic acid (A5) (0.5g, 1.4mmol) in DCM (20mL) was added TBTU (1.1eq, 1.53mmol, 482mg) and the solution stirred and DMF (20mL) was added after 8h. After 28h of continuous stirring the solution went clear and TEA (155mg, 0.213mL, 1.53mmol) was added followed by benzyl 4-aminobutanoate (C2) (1.1eq, 0.559g, 1.53mmol) and the mixture stirred for 15h. The DCM was removed under reduced pressure and the remainder diluted with water. This aqueous solution was extracted with ether (3x50mL) and then DCM (3x50mL). The organic layers were combined, dried (MgSO₄), filtered, and concentrated. The residue was purified by flash

chromatography over silica using DCM/MeOH (9:1) to give the product as an oil (0.484g) of sufficient purity for use in following steps.

4-([4-(4-Amino-butylamino)-quinoline-3-carbonyl]-amino)-butyric acid benzyl ester (C4)

[0194] To a solution of 4{[4-(4-tert-Butoxycarbonylamino-butylamino)-quinoline-3-carbonyl]-amino}-butyric acid benzyl ester (C3) (0.454mg, 0.9mmol) in DCM (10mL) was added TFA (4mL) and the mixture was stirred for 1h. The solution was concentrated, neutralized with saturated NaHCO₃, and extracted with DCM. The organic layers were combined, dried (MgSO₄), filtered, and concentrated under reduced pressure to give the product as a clear oil (227mg, 0.52mmol).

4-([4-(4-bis-Boc-guanidino-butylamino)-quinoline-3-carbonyl]-amino)-butyric acid benzyl ester (C5)

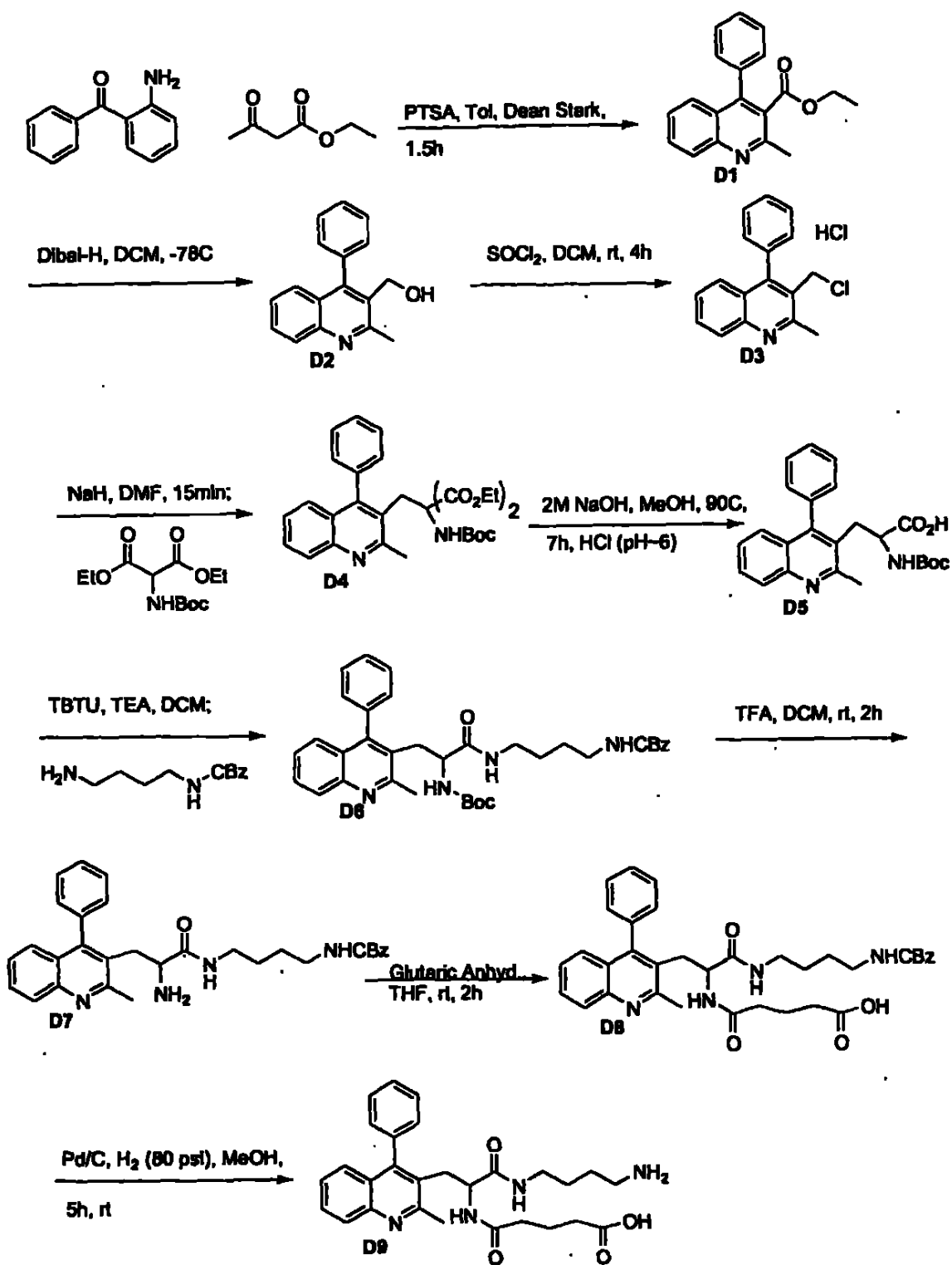
[0195] To a solution of 4{[4-(4-Amino-butylamino)-quinoline-3-carbonyl]-amino}-butyric acid benzyl ester (C4) (227mg, 0.52mmol) in DCM (7mL) was added TEA (53mg, 0.72mL) followed by 1,3-Di-boc-2-(trifluoromethylsulfonyl)guanidine (204mg, 0.52mmol) and the mixture stirred at room temperature for 5h. The organic solution was diluted with more DCM washed with 2M NaHSO₄ (25mL), NaHCO₃ (25mL), dried (MgSO₄), filtered and concentrated under reduced pressure to give the product as a white foam (305mg) that was used as is.

4-([4-(4-Guanidino-butylamino)-quinolin-3-carbonyl]-amino)-butyric acid (C6)

[0196] To a solution of 4-([4-(4-bis-Boc-guanidino-butylamino)-quinoline-3-carbonyl]-amino)-butyric acid benzyl ester (C5) (305mg) in MeOH (10mL) was added Pd/C (10wt%, 10 %wt/wt, 30mg) and the mixture vacuum purged 5x with H₂ gas and stirred under H₂ for 18h. The Pd/C was removed by filtration through celite and the filtrate concentrated under reduced pressure to give a white foam residue.

[0197] The above residue was dissolved in DCM (5mL) and TFA (5mL) was added and the mixture stirred at room temperature for 4h. The solvents were removed under reduced pressure and the residue triturated with ether. The resulting oil was purified by reverse phase HPLC using ACN/H₂O/TFA (0.1%) as eluent (gradient from 5%-95% ACN) to give the product as a white hygroscopic solid (70mg, 0.018mmol). MP-not determined, ¹H NMR (400MHz) 89.86 (br s, 1H), 8.92 (t, J=5.2, 5.6Hz, 1H), 8.56 (d, J=8.8Hz, 1H), 7.91 (m, 2H), 7.76 (t, J=5.6, 5.6Hz, 1H), 7.68 (m, 1H), 7.37-7.06 (br m, 4H), 3.29 (m, 6H), 3.12 (q, J=6.4, 12.8Hz), 2.33 (t, J=7.2, 7.2Hz, 2H), 1.76 (m, 4H), 1.54 (m, 2). EIMS m/z M⁺ 387.5. Anal. Not determined.

Scheme D



Scheme D**Ethyl 2-methyl-4-phenylquinolin-3-carboxylate (D1)**

[0198] To a solution of 2-aminobenzophenone (10g, 51mmol) and ethylacetoacetate (5.3g, 63.8mmol, 8mL) in toluene (100mL) was added PTSA (0.3g) and the reaction mixture heated at reflux using a Dean Stark apparatus for 1.5h when no more water was apparent. The solvent was removed under reduced pressure and the residue recrystallized from EtOH to give the product as light yellow crystals. (8.14g, 28mmol)

(2-Methyl-4-phenylquinolin-3-yl)methanol (D2)

[0199] To a solution of ethyl 2-methyl-4-phenylquinolin-3-carboxylate (D1) (5g, 17.2mmol) in DCM (50mL) at -78°C was added 1M Dibal-H (2.5eq, 43mmol, 43mL) in DCM dropwise and stirring continued at this temperature for 1.5h. A solution of Na₂SO₄ (6.1g, 43mmol) in water (10mL) was added carefully at -78°C and the mixture allowed to warm to room temperature and stirred for 1h. The solid was filtered off and rinsed with hot EtOAc. The filtrates were combined and concentrated under reduced pressure to give the product as a yellow solid residue (3.62g, 14.5mmol)

3-(Chloromethyl)-2-methyl-4-phenylquinoline (D3)

[0200] To a solution of (2-Methyl-4-phenylquinolin-3-yl)methanol (D2) in DCM (50mL) was added SOCl₂ (10.4mL, 17g, 140mmol) and the mixture stirred at room temperature for 4h. The mixture was concentrated under reduced pressure to give the HCl salt of the chloride as a yellow solid (2.266g). The product was stored as the HCl salt and converted to the free base by treating with saturated NaHCO₃ and extracting with ether.

tert-Butyl 1,1-di(ethoxycarbonyl)-2-(2-methyl-4-phenylquinolin-3-yl)ethylcarbamate (D4)

[0201] To a solution of 3-(Chloromethyl)-2-methyl-4-phenylquinoline (D3) (0.958g, 3.6mmol) as the free base in DMF (12mL) was added a DMF (40mL) solution of tert-butyl di(ethoxycarbonyl)methylcarbamate (4.32mmol, 1.19g) that had been deprotonated by treating with NaH (4.32mmol, 104mg) for 15min. This mixture was stirred overnight and then concentrated under reduced pressure, dissolved in H₂O and the solution extracted with ether (3x50mL). The extracts were combined, dried (MgSO₄), filtered, concentrated under reduced pressure to give the product as a brown oil that was used as is.

2-tert-Butoxycarbonylamino-3-(2-methyl-4-phenyl-quinolin-3-yl)-propionic acid (D5)

[0202] To a solution of tert-butyl 1,1-di(ethoxycarbonyl)-2-(2-methyl-4-phenylquinolin-3-yl)ethylcarbamate (D4) (0.85g, 1.7mmol) in MeOH (10mL) was added 2M NaOH (2.1eq, 1.8mL) and the mixture heated at 90°C for 7h. The solvent was removed under reduced pressure and the residue diluted with water. The resulting mixture was adjusted to pH-5.5 using 20% aqueous HCl and the milky white solution extracted with EtOAc (3x50mL), dried (MgSO₄), filtered, and concentrated to give the product as a brown foam solid (0.404g, 1mmol) that was used as is.

{3-[2-tert-Butoxycarbonylamino-3-(2-methyl-4-phenyl-quinolin-3-yl)-propionylamino]-propyl}-carbamic acid phenyl ester (D6).

[0203] To a solution of 2-tert-Butoxycarbonylamino-3-(2-methyl-4-phenyl-quinolin-3-yl)-propionic acid (D5) (200mg, 0.5mmol) in DCM (15mL) was added TBTU (1.1eq, 174mg, 0.54mmol) and TEA (2eq, 1.08mmol, 110mg, 150uL) and the mixture allowed to stir at room temperature for 10min. To this mixture was added phenyl 4-aminobutylcarbamate (1.1eq, 0.54mmol, 140mg) and the mixture stirred at room temperature for 4h. Water was added and the organic layer separated, dried (MgSO₄), filtered, and concentrated to give a yellow residue. The residue was purified over silica using first 2%DCM/MeOH, then 4%DCM/MeOH, then 8%DCM/MeOH, 250mL ca. to give the product as a yellow oil (228mg).

{3-[-Amino-3-(2-methyl-4-phenyl-quinolin-3-yl)-proionylamino]-butyl}-carbamic acid phenyl ester (D7).

[0204] To a solution of {3-[2-tert-Butoxycarbonylamino-3-(2-methyl-4-phenyl-quinolin-3-yl)-propionylamino]-propyl}-carbamic acid phenyl ester (D6) (220mg, 0.36mmol) in DCM (5mL) and a mixture of TFA/DCM (3.5mL/5mL) was added and the mixture stirred at room temperature for 2h. The solvent was removed under reduced pressure and the residue taken up in EtOAc (50mL) and washed with saturated NaHCO₃ (35mL), water (2x25mL), dried (MgSO₄), filtered, and concentrated to give the product as a clear yellow oil (161mg, 0.32mmol, 88%).

4-[2-(2-Methyl-4-phenyl-quinolin-3-yl)-1-(4-phenoxy carbonyl amino-butyl carbamoyl)-ethyl carbamoyl]-butyric acid (D8)

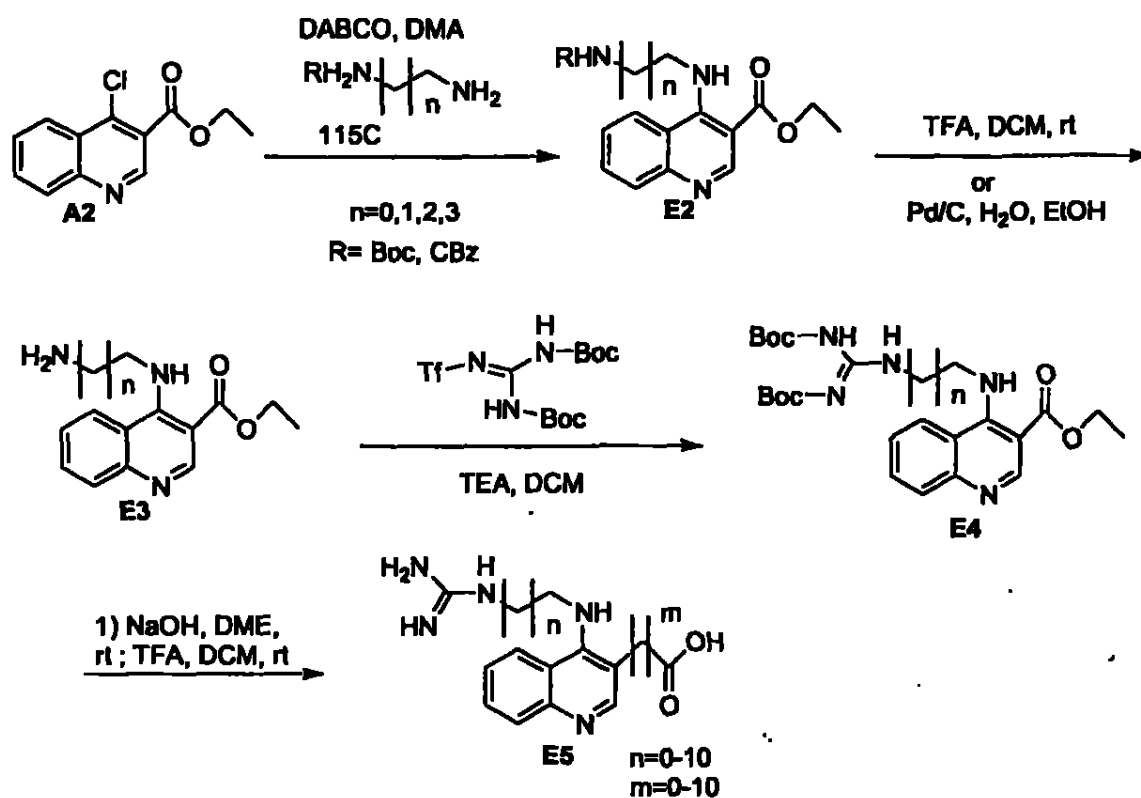
[0205] To a solution of {3-[-Amino-3-(2-methyl-4-phenyl-quinolin-3-yl)-proionylamino]-butyl}-carbamic acid phenyl ester (D7) (161mg, 0.32mmol) in THF was added glutaric anhydride (1.5eq, 0.5mmol, 57mg) and the solution stirred at room temperature for 2h. The solvent was removed under reduced pressure and the residue taken up in EtOAc (25mL) and

washed with water, dried (MgSO_4), filtered, and concentrated to give the product as a clear orange oil that slowly solidified (213mg) that was used as is without further characterization.

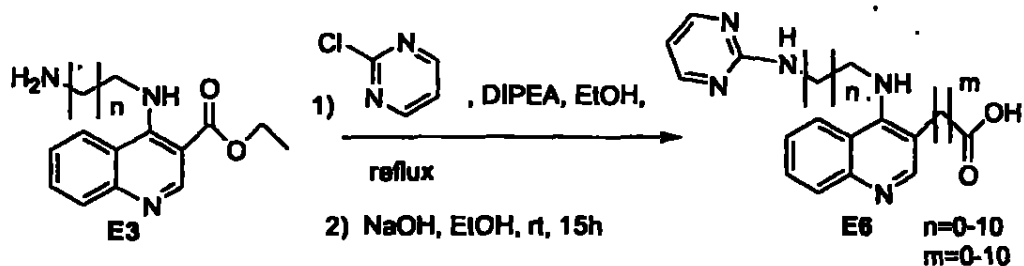
4-[1-(4-Amino-butylcarbamoyl)-2-(2-methyl-4-phenyl-quinolin-3-yl)-ethyl carbamoyl]-butyric acid (D9)

[0206] To a solution of 4-[2-(2-Methyl-4-phenyl-quinolin-3-yl)-1-(4-phenoxy-carbonyl amino-butyl carbamoyl)-ethyl carbamoyl]-butyric acid (D8) (213mg, 0.34mmol) in MeOH (10mL) and THF (5mL) was added Pd/C and placed on a Parr shaker at 80 psi H_2 gas for 5h. The Pd/C was removed by filtration through celite and concentrated. The resulting residue was purified using reverse phase HPLC using $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ (5-95%ACN) giving the product as a white solid after lyophilization (13.3mg). MP 129°C , ^1H NMR (400MHz) δ 7.91 (m, 2H), 7.64 (m, 2H), 7.54 (m, 4H), 7.36 (m, 2H), 7.26 (d, $J=6.4\text{Hz}$, 1H), 7.08 (d, $J=8\text{Hz}$, 1H), 4.352 (m, 1H), 3.1-2.6 (series of m, 8H), 2.03 (m, 4H), 1.55 (m, 2H), 1.22 (m, 4H). EIMS m/z M^{+1} 491.7. Anal. $\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{O}_4 + 3\text{H}_2\text{O}$

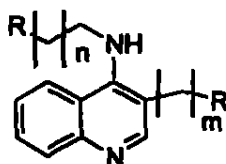
Scheme E



Pyrimidines



Proposed synthetic modifications

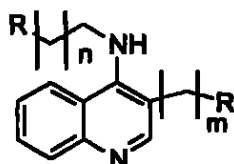


R= Basic groups or Acidic groups,
 Bioisosteres thereof, amines or amides.
 $n=0,1,2,3,4\ldots\text{etc.}$
 $m=0,1,2,3,4\ldots\text{etc.}$

Scheme E**4-(5-Benzyloxycarbonylamino-pentylamino)-quinoline-3-carboxylic acid ethyl ester (E2, n=4)**

[0207] To a solution of ethyl 4-chloroquinoline-3-carboxylate (A2) (1g, 4.26mmol) in DMA (20mL) was added N-CBz-diaminopentane (1.4g, 5.1mmol) and DABCO (1.4g, 13mmol) and the solution heated at 115°C for 2.5h. The DMA was removed under reduced pressure and the residue suspended in water and extracted with ether (3x25mL), dried (MgSO₄), filtered, and concentrated to give the product as a clear brown oil (1.88g, 4.3mmol) that was used as is.

Proposed synthetic modifications



R= Basic groups or Acidic groups,
Bioisosteres thereof, amines or amides.
n=0,1,2,3,4...etc.
m=0,1,2,3,4....etc.

4-(5-Amino-pentylamino)-quinoline-3-carboxylic acid ethyl ester (E3, n=4)

[0208] To a solution of 4-(5-Benzyloxycarbonylamino-pentylamino)-quinoline-3-carboxylic acid ethyl ester (E2, n=4) (1.88g, 4.3mmol) in EtOH (30mL) was added Pd/C (180mg, 10%ww Pd) and the mixture stirred under H₂ gas for 3d refilling the balloon as necessary. The catalyst was removed by filtering through celite and concentrated to give the product as a honey colored oil (1.3g, 4.2mmol) that was used without further purification.

4-(5-Bis-Boc-guanidino-pentylamino)-quinoline-3-carboxylic acid ethyl ester (E4, n=4)

[0209] To a solution 4-(5-Amino-pentylamino)-quinoline-3-carboxylic acid ethyl ester (E3, n=4) (0.64g, 2.1mmol) in dry DCM (10mL) was added TEA (322ul, 233mg) and 1,3-Di-boc-2-(trifluoromethylsulfonyl)guanidine (1.1eq, 0.9g, 2.31mmol) and the mixture stirred at room temperature for 2.5h. The solution was diluted with more DCM and washed with 2M NaHSO₃ (20mL), saturated NaHCO₃ (20mL), saturated NaCl, dried (Na₂SO₄), filtered and concentrated to give the product as white foam (1.2g, 2.1mmol) that was used as is.

4-(5-Guanidino-pentylamino)-quinoline-3-carboxylic acid (E5, n=4)

[0210] To a solution of 4-(5-Bis-Boc-guanidino-pentylamino)-quinoline-3-carboxylic acid ethyl ester (E4, n=4) (1.2g, 2.1mmol) in DME (20mL) was added 1M NaOH (15mL) and the mixture stirred at room temperature for 2d. The mixture was concentrated to remove the DME and

the remaining aqueous mixture adjusted to pH~5-6 with HCl (20% aqueous). The resulting solid was collected by filtration and air dried.

[0211] The crude solid was suspended in DCM (15mL) and TFA (3.5mL) was added and the mixture at room temperature for 2.5h. More TFA was added and the solution stirred for 3.5h and then concentrated. The residue was suspended in water and 2M Na₂CO₃ added to adjust to pH~7-8 and the resulting solid collected by filtration and dried in under vacuum. The crude was purified by reverse phase HPLC over C18 using H₂O/ACN/0.5%TFA to give the compound as a white solid after lyophilization (40mg, 0.09mmol) as the mono TFA salt. MP 72°C, ¹H NMR (400MHz) δ8.79 (s, 1H), 8.48 (d, J=8.8Hz, 1H), 7.86 (m, 2H), 7.78 (m, 1H), 7.55 (m, 1H), 7.24 (br s, 4H), 3.94 (m, 3H), 3.14 (d, J=6.4, 6.8Hz, 2H), 1.77 (m, 2H), 1.55 (m, 4H) EIMS *m/z* M⁺ 316.3. Anal. C₁₆H₂₁N₅O₂ + 2H₂O + 1TFA

4-(3-Guanidino-propylamino)-quinoline-3-carboxylic acid (E5, n=2)

[0212] This compound was made in a manner similar to 4-(5-Guanidino-pentylamino)-quinoline-3-carboxylic acid (E5, n=4) using n-(3-aminopropyl)-carbamic acid t-butyl ester and deprotecting with TFA. MP 231°C, ¹H NMR (400MHz) δ10.48 (m, 1H), 9.52(br s, 1H), 9.00 (s, 1H), 8.20 (d, J=8.4Hz, 1H), 7.75 (d, J=8.4Hz, 1H), 7.60 (t, J=6.8, 8.4Hz, 2H), 7.35 (t, J=7.6, 8Hz, 2H), 3.75 (m, 3H), 3.22 (t, J=7.2, 7.2Hz, 2H), 1.90 (m, 2H) EIMS *m/z* M⁺ 288.4. Anal. C₁₄H₁₇N₅O₂ + 2H₂O

4-(2-Guanidino-ethylamino)-quinoline-3-carboxylic acid (E5, n=1)

[0213] This compound was made in a manner similar to 4-(5-Guanidino-pentylamino)-quinoline-3-carboxylic acid (E5, n=4) using n-Boc-ethylene diamine and deprotecting with TFA. MP 267°C, ¹H NMR (400MHz) δ8.77 (s, 1H), 8.42 (d, J=8.4Hz, 1H), 7.84 (m, 3H), 7.57 (t, J=8.4Hz, 7.2Hz 1H), 7.28 (br s, 3H), 4.08 (br s, 2H). EIMS *m/z* M⁺ 274.5. Anal. C₁₃H₁₅N₅O₂ + 2H₂O + 1TFA

Pyrimidines

4-[3-(Pyrimidin-2-yl-amino)-propylamino]-quinoline-3-carboxylic acid (E6, n=2, R=H)

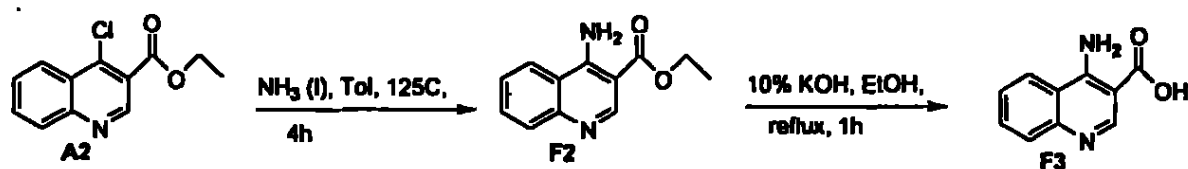
[0214] To a solution of 4-(3-Amino-propylamino)-quinoline-3-carboxylic acid ethyl ester (E3, n=2, 177mg, 0.65mmol) in EtOH (35mL) was added DIPEA (1mmol, 129mg, 173uL) and 2-chloropyrimidine (90mg, 0.78mmol) and the mixture heated at reflux for 15h. The solution was concentrated and taken up in EtOH (15mL) and 1M NaOH (5mL) added and the solution stirred for 15h. The mixture was concentrated and the residue adjusted to pH~5 using 20% HCl.

The resulting solid was collected and purified on reverse phase HPLC, ACN/H₂O 5-95% on C18 to give the product as a white solid after lyophilization (135mg). MP 269°C. ¹H NMR (400MHz) δ 8.47 (d, J=8.8Hz, 1H), 8.19 (d, J=4.8Hz, 2H), 7.80 (m, 2H), 7.50 (m, 1H), 7.26(m, 1H), 6.52 (t, J=4.4, 5.2Hz, 1H), 3.99 (m, 2H) 2.00 (m, 2H). EIMS m/z M⁺ 324.5. Anal. C₁₇H₁₇N₃O₂ + 1H₂O + 1TFA

4-[5-(Pyrimidin-2-ylamino)-pentylamino]-quinoline-3-carboxylic acid ethyl ester (E6, n=4, R=CH₂CH₃)

[0215] To a solution of 4-(5-Amino-pentylamino)-quinoline-3-carboxylic acid ethyl ester (E3, n=4, 505mg, 1.7mmol) in EtOH (20mL) was added DIPEA (323mg, 2.5mmol, 435uL) and 2-chloropyrimidine (231mg, 2mmol) and the mixture heated at reflux for 15h. The mixture was concentrated and the residue purified by reverse phase HPLC, C18, ACN/H₂O, 5-95% to give the product as an off white yellowish solid (135mg, 0.36mmol, 21%). MP 108°C ¹H NMR (400MHz) δ 8.92 (m, 1H), 8.83 (s, 1H), 8.34 (d, J=8.4Hz, 1H), 8.19 (d, J=4.8Hz, 2H), 7.8 (m, 1H), 7.71 (m, 1H), 7.44 (m, 1H), 7.09 (t, J=6, 5.6Hz, 1H), 6.50 (t, J=4.8, 4.8Hz, 1H), 3.68 (m, 2H), 3.22 (q, J=6.8, 12.8Hz, 2H), 1.68 (m, 2H), 1.52 (m, 2H), 1.41 (m, 2H). EIMS m/z M⁺ 380.5. Anal. C₂₁H₂₅N₅O₂

Scheme F



Scheme F

4-Amino-quinoline-3-carboxylic acid ethyl ester (F2)

[0216] To a solution of ethyl-4-chloro quinoline-3-carboxylate (A2, 1.44g, 0.6mmol) in toluene (10mL) was added condensed NH₃ and the mixture sealed in a steel bomb and heated at

125°C for 4h. The bomb was cooled and the resulting white solid was collected by vacuum filtration and dried to give the product (1.5g).

4-Amino-quinoline-3-carboxylic acid (F3)

[0217] To a solution of 4-Amino-quinoline-3-carboxylic acid ethyl ester (F2) (250mg, 1.2mmol) in EtOH (5mL) was added 20% KOH (10mL) and the mixture heated at reflux for 1h. The EtOH was removed under reduced pressure and the aqueous solution adjusted to pH~6.5-7 using 20%HCl. The white solid was collected and dried to give the product. (161mg). The product was crystallized from EtOH and dried. MP 305°C. ¹H NMR (400MHz) δ8.89 (s, 1H), 8.42 (d, J=8.4Hz, 1H), 7.83 (m, 2H), 7.60 (m, 1H). EIMS *m/z* M⁺ 189.4. Anal. C₁₀H₈N₂O₂ + 0.5 H₂O

[0218] Many modifications and variations of the embodiments described herein may be made without parting from the scope, as is apparent to those skilled in the art. The specific embodiments described herein are offered by way of example only.

REFERENCES CITED (and incorporated herein by reference thereto):

- Alam et al. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 15641-15649
Anantharamaiah et al. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 10248-10255
Anantharamaiah et al. (1987) *J. Lipid Res.* 29, 309-318
Anantharamaiah et al. (1990) *Arteriosclerosis*, 10, 95-105
Arai et al. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 2366-2371
Argaves et al. (1997) *J. Clin. Invest.* 100, 2170-2181
Austin et al. (1988) *JAMA*, 260, 1917-1921
Austin et al. (1990) *Circulation*, 82, 495-506
Banka et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 10288-10297
Barbaras et al. (1987) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 142, 63-69
Barter P (2000) *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.* 20, 2029
Berneis and Krauss (2002) *J. Lipid Res.* 43, 1363-1379
Bhatnagar A. (1999) in *Lipoproteins and Health Disease*, pp. 737-752, Arnold, Loudon
Bolibar et al. (2000) *Thromb. Haemost.* 84, 955-961
Boren et al. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 9214-9218
Brouillette and Anantharamaiah (1995) *Biochim. Biophys. Acta.* 1256, 103-129
Brunzell JD (1995) in *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disorders*, pp. 1913-1932, McGraw-Hill, Inc., New York
Buchko et al. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 3039-3045
Camejo et al. (1985) *Atherosclerosis*, 55, 93-105
Campos et al. (1992) *Arteriosclerosis Thrombosis*, 12, 187-193
Canner et al. (1986) *JACC*, 8, 1245-1255
Cao et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 39561-39565
Castelli et al. (1986) *JAMA*, 256, 2835-2838
Castro and Fielding (1998) *Biochemistry*, 27, 25-29
Chait et al. (1993) *Am. J. Med.* 94, 350-356
Chambenoit et al. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 9955-9960;
Chang et al. (1997) *Annu Rev Biochem.* 66, 613-638
Chapman et al. (1998) *Eur Heart J*, Suppl A: A24-30
Chen and Albers (1985) *Biochim Biophys. Acta*, 836, 275-285
Chen et al. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 30794-30800
Cohen et al. (1999) *Curr Opin Lipidol.* 10, 259-268
Collet et al. (1997) *J. Lipid Res.* 38, 634-644
Collet et al. (1999) *J. Lipid Res.* 40, 1185-1193
Curtiss and Boisvert (2000) *Curr. Opin. Lipidol.* 11, 243-251
Datta et al. (2001) *J. Lipid Res.* 42, 1096-1104
Davis et al. (2002) *J. Lipid Res.* 43, 533-543
de Graaf et al. (1993) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 76, 197-202
Downs et al. (1998) *JAMA*, 279, 1615-1622
Duverger et al. (1996) *Circulation*, 94, 713-717
Ehnholm et al. (1998) *J. Lipid Res.* 39, 1248-1253
Epand et al. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 9389-9396
Eriksson et al. (1999) *Circulation*, 100, 594-598
Fan et al. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 40071-40079
Fidge NH (1999) *J. Lipid Res.* 40, 187-201

- Fielding et al. (1994) *Biochemistry*, 33, 6981-6985
Fitch WM (1977) *Genetics*, 86, 623-644
Fogelman et al. (2003) United States Patent Application Publication, US 2003/0045460 A1
Föger et al. (1996) *Arterioscler Thromb Vasc Biology*, 16, 1430-1436
Foger et al. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 36912-36920
Frank and Marcel (2000) *J. Lipid Res.* 41, 853-872
Frick et al. (1987) *N. England J. Medicine*, 317, 1237-1245
Fuskushima et al. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 10651-10657
Gamble et al. (1978) *J. Lipid Res.* 16, 1068-1070
Garber et al. (1992) *Arteriosclerosis and Thrombosis*, 12, 886-894
Garber et al. (2001) *J. Lipid Res.* 42, 545-552
Garcia et al. (1996) *Biochemistry*, 35, 13064-13071
Genest et al. (1991) *Am J Cardiol.* 67, 1185-1189
Genest et al. (1992) *Circulation*, 85, 2025-2033
Genest et al. (1999) *J. Invest. Med.* 47, 31-42
Gibbons et al. (1995) *Am. J. Med.* 99, 378-385
Gillotte et al. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 2021-2028
Glomset JA (1968) *J. Lipid Res.* 9, 155-167
Goldberg I. (1996) *J. Lipid Res.* 37, 693-707
Golder-Novoselsky et al. (1995) *Biochim. Biophys. Acta*, 1254, 217-220
Goldstein and Brown (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 5153-5162
Gordon et al. (1989) *N Engl. J. Med.* 321, 1311-1315
Gotto AM (2001) *Circulation*, 103, 2213
Griffin et al. (1994) *Atherosclerosis*, 106, 241-253
Groen et al. (2001) *J. Clin. Invest.* 108, 843-850
Hajjar and Haberland (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 22975-22978
Hara and Yokoyama (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 3080-3086
Hedrick et al. (2001) *J. Lipid Res.* 42, 563-570
Huang et al. (1995) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biology*, 15, 1412-1418
Huang et al. (1997) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17, 2010-2015
Hulley et al. (1998) *JAMA*, 280, 605-613
Huuskonen and Ehnholm (2000) *Curr. Opin. Lipidol.* 11, 285-289
Huuskonen et al. (2000) *Atherosclerosis*, 151, 451-461
Ikewaki et al. (1993) *J. Clin. Invest.* 92, 1650-1658
Ikewaki et al. (1995) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biology*, 15, 306-312
Ishigami et al. (1994) *J. Biochem. (Tokyo)* 116, 257-262
Jaakkola et al. (1993) *Coron. Artery Dis.* 4, 379-385
Jauhianen et al. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 4032-4036
Jiang et al. (1996) *J. Clin. Invest.* 98, 2373-2380
Jiang et al. (1999) *J. Clin. Invest.* 103, 907-914
Jonas A (1991) *Biochim. Biophys. Acta*, 1084, 205-220
Jones et al. (1998) *Am. J. Cardiol.* 81, 582-587
Kaiser and Kēzdy (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 1137-1140
Kanellis et al. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 11464-11472
Kawano et al. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 29477-29481
Kozarsky et al. (2000) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biology*, 20, 721-727
Krauss and Burke (1981) *J. Lipid Res.* 23, 97-104

- Krieger M. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95, 4077-4080
- La Belle and Krauss (1990) *J Lipid Res.* 31, 1577-1588
- Lindholm et al. (1998) *Biochemistry*, 37, 4863-4868
- Liu and Krieger (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 34125-34135
- Lund-Katz et al. (1993) In *"Peptides: Chemistry and Biology"* (R. Haughten, ed.) ESCOM Press; Leiden, The Netherlands
- Lusa et al. (1996) *Biochem. J.* 313, 275-282
- Main et al. (1996) *Biochim Biophys Acta*, 29, 17-24
- Marotti et al. (1993) *Nature*, 364, 73-75
- Martin-Jadraque et al. (1996) *Arch. Intern. Med.* 156, 1081-1088
- Marzal-Casacuberta et al. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 6720-6728
- Matsumoto et al. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 16778-16782
- McLachlan AD (1977) *Nature*, 267, 465-466
- McLean et al. (1991) *Biochemistry*, 30, 31-37
- McManus et al. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 5043-5051
- Mendez et al. (1994) *J. Clin. Invest.* 94, 1698-1705
- Meng et al. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 8588-8596
- Merkel et al. (2002) *J. Lipid Res.* 43, 1997-2006
- Miccoli et al. (1997) *J. Lipid Res.* 38, 1242-1253
- Miettinen et al. (1997) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biology*, 17, 3021-3032
- Miller et al. (1987) *Am Heart J.* 113, 589-597
- Milner et al. (1991) *Biochim Biophys Acta*, 26, 1082, 71-78
- Mishra et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 7185-7191
- Mishra et al. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 1602-1611
- Mishra et al. (1998) *Biochemistry*, 37, 10313-10324
- Morton RE (1999) *Curr Opin Lipidol.* 10, 321-327
- Nagano et al. (2002) *J. Lipid Res.* 43, 1011-1018
- Naito HK (1985) *Ann. NY Acad. Sci.* 454, 230-238
- Nakagawa et al. (1985) *J. Am. Chem. Soc.* 107, 7087-7092
- Ohnishi and Yokoyama (1993) *Biochemistry*, 32 (19), 5029-5035
- Oka et al. (2000) *Clin. Chem.* 46, 1357-1364
- Oka et al. (2000) *J. Lipid Res.* 41, 1651-1657
- Oka et al. (2002) *J. Lipid Res.* 43, 1236-1243
- Okamoto et al. (2000) *Nature*, 13, 406 (6792): 203-7
- Oram and Lawn (2001) *J. Lipid Res.* 42, 1173-1179
- Oram and Yokoyama (1997) *J Lipid Res.* 37, 2473-2491
- Packard and Shepherd (1997) *Arteriosclerosis, Thromb, Vasc. Biology*, 17, 3542-3556
- Palgunachari et al. (1996) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16, 328-338
- Plump et al. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 9607-9611
- Ponsin et al. (1986a) *J. Biol. Chem.* 261, 9202-9205
- Ponsin et al. (1986b) *J. Clin. Invest.* 77, 559-567
- Pownall et al. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77(6), 3154-3158
- Pownall et al. (1985) *Biochim. Biophys. Acta*, 833, 456-462
- Puchois et al. (1987) *Atherosclerosis*, 68, 35-40
- Pussinen et al. (1997) *J. Lipid Res.* 38, 12-21
- Pussinen et al. (1998) *J. Lipid Res.* 39, 152-161
- Qin et al. (2000) *J. Lipid Res.* 41, 269-276

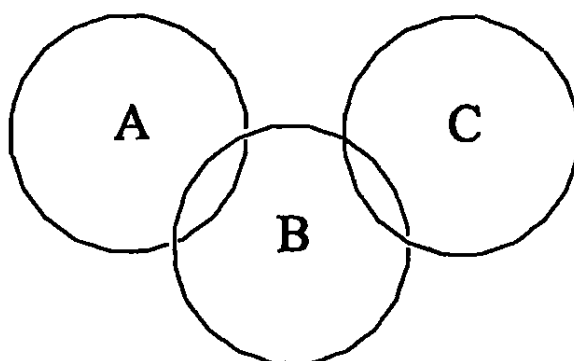
- Ramsamy et al. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 33480-33486
Remaley et al. (1997) *Arterioscler Thromb. Vasc. Biology*, 17, 1813-1821
Reschly et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 9645-9654
Riemens et al. (1998) *Atherosclerosis*, 140, 71-79
Riemens et al. (1999) *J. Lipid Res.* 40, 1459-1466
Rinninger et al. (1998) *J. Lipid Res.* 39, 1335-1348
Ross R. (1993) *Nature*, 362, 801-809
Rothblat et al. (1999) *J. Lipid Res.* 40, 781-796
Rubin et al. (1991) *Nature*, 353, 265-267
Rubins, et al. (1999) *N. Engl. J. Med.* 341, 410-418
Santamarina-Fojo and Dugi (1994) *Curr. Opin. Lipidol.* 5, 117-125
Santamarina-Fojo et al. (2000) *Curr. Opin. Lipidol.* 11, 267-275
Schissel et al. (1996) *J. Clin. Invest.* 98, 1455-1464
Second Report of the Expert Panel (1994) *Circulation*, 89, 1329-1445
Segrest et al. (1983) *Journal Biol Chem.* 258, 2290-2295
Segrest et al. (1994) *Advances in Protein Chem.* 45, 303-369
Segrest et al. (2001) *J. Lipid Res.* 42, 1346-1367
Segrest JP (1974) *FEBS Lett.* 38, 247-253
Settasation et al. (2000) *J. Biol. Chem.* 276, 26898-26905
Shaefer EJ (1994) *Eur. J. Clin. Invest.* 24, 441-443
Shatara et al. (2000) *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 78, 367-371
Shepherd et al. (1995) *N. Engl. J. Med.* 333, 1301-1307
Sorci-Thomas et al. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 2665-2670
Sorci-Thomas et al. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 12156-12163
Sparks et al. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 25839-25847
Sparrow et al. (1981) In: "Peptides: Synthesis-Structure-Function," Roch and Gross, Eds., Pierce Chem. Co., Rockford, IL. 253-256
Sparrow et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 10021-10027
Srinivas et al. (1990) *Virology*, 176, 48-57
Stein and Stein (1999) *Atherosclerosis*, 144, 285-303
Steiner et al. (1987) *Circulation*, 75, 124-130
Steinmetz and Utermann (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 2258-2264
Sviridov et al. (1996) *Biochemistry*, 35, 189-196
Sviridov et al. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 19707-19712
Sviridov et al. (2000) *J. Lipid Res.* 41, 1872-1882
Swinkels et al. (1989) *Arteriosclerosis*, 9, 604-613
Tall and Wang (2000) *J. Clin. Invest.* 106, 1205-1207
Tall et al. (2000) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20, 1185-1188
Tall et al. (2001) *J. Clin. Invest.* 108, 1273-1275
Tall et al. (2001) *J. Clin. Invest.* 108, 1273-1275
Tangirala et al. (1999) *Circulation*, 100, 1816-1822
Temel et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 26565-26572
The BIP study group (2000) *Circulation*, 102, 21-27
The International Task Force for Prevention of Coronary Heart Disease (1998) *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 8, 205-271
Thuahnai et al. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 43801-43808
Tribble et al. (1992) *Atherosclerosis*, 93, 189-199

- Trigatti et al. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 9322-9327
Tu et al. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 23098-23105
Utermann et al. (1984) *Eur. J. Biochem.* 144, 325-331
Vakkilainen et al. (2002) *J. Lipid Res.* 43, 598-603
van Eck et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99, 6298-6303
Venkatachalapathi et al. (1993) *Proteins*, 15, 349-359
von Eckardstein A. (1996) *Curr Opin Lipidol.* 7, 308-319
von Eckardstein and Assmann (2000) *Curr Opin Lipidol.* 11, 627-637
von Eckardstein et al. (1995) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15, 690-701
von Eckardstein et al. (1996) *Biochim. Biophys. Acta*, 1301, 255-262
von Eckardstein et al. (2001) *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.* 21, 13
Webb et al. (2002) *J. Lipid Res.* 43, 1890-1898
Whayne et al. (1981) *Atherosclerosis*, 39, 411-424
Yamashita et al. (1991) *Metabolism*, 40, 756-763
Yamazaki et al. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 5847-5853
Zhong et al. (1994) *Peptide Research*, 7(2): 99-106
(1984) *JAMA*, 251, 365-374

54 53

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A mediator of reverse cholesterol transport, comprising the structure:



wherein A, B, and C may be in any order, and wherein:

A comprises an acidic moiety, comprising an acidic group or a bioisostere thereof;

B comprises an aromatic or lipophilic moiety comprising at least a portion of HMG CoA reductase inhibitor or analog thereof; and

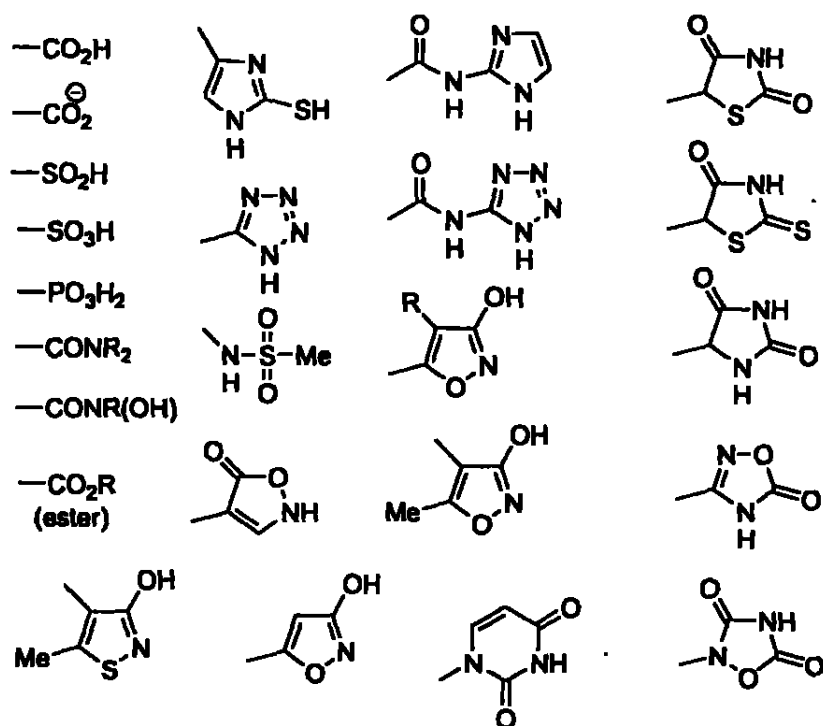
C comprises a basic moiety, comprising a basic group or a bioisostere thereof.

2. The mediator of Claim 1, wherein at least one of the alpha amino or alpha carboxy groups have been removed from their respective amino or carboxy terminal moieties.

3. The mediator of Claim 1 or 2, wherein if not removed, the alpha amino group is capped with a protecting group selected from the group consisting of formyl, acetyl, phenylacetyl, benzoyl, pivoyl, 9-fluorenylmethyloxycarbonyl, 2-naphthyl, nicotinic acid, a $\text{CH}_3\text{---}(\text{CH}_2)_n\text{---CO---}$ where n ranges from 1 to 20, di-tert-butyl-4-hydroxy-phenyl, naphthyl, substituted naphthyl, Fmoc, biphenyl, substituted phenyl, substituted heterocycles, alkyl, aryl, substituted aryl, cycloalkyl, fused cycloalkyl, saturated heteroaryl, and substituted saturated heteroaryl.

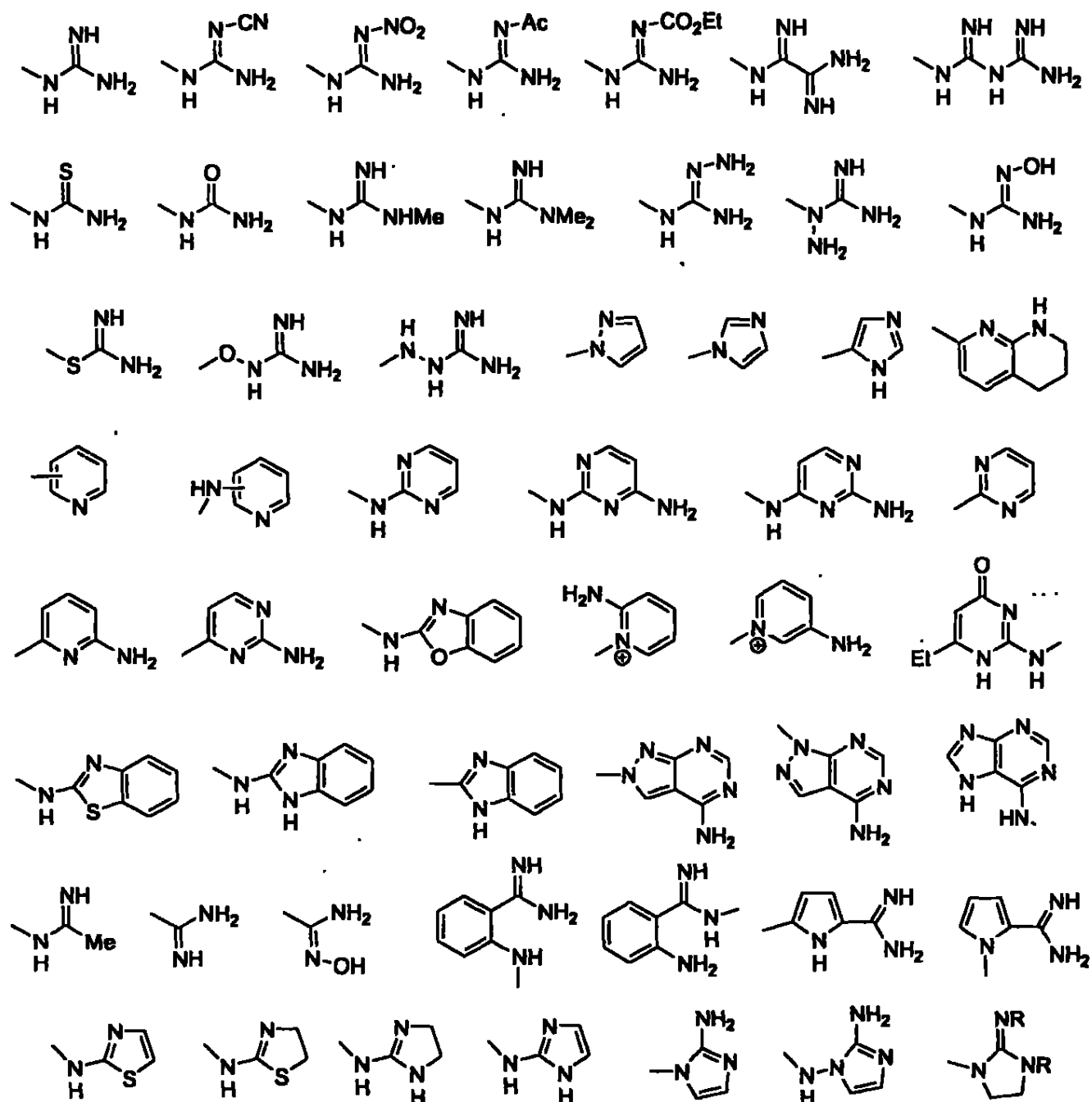
4. The mediator of Claim 1 or 2, wherein if not removed, the alpha carboxy group is capped with a protecting group selected from the group consisting of an amine, such as RNH_2 where R = H, di-tert-butyl-4-hydroxy-phenyl, naphthyl, substituted naphthyl, Fmoc, biphenyl, substituted phenyl, substituted heterocycles, alkyl, aryl, substituted aryl, cycloalkyl, fused cycloalkyl, saturated heteroaryl, and substituted saturated heteroaryl.

5. The mediator of Claim 1, wherein the bioisostere of the acidic group is selected from the group consisting of:

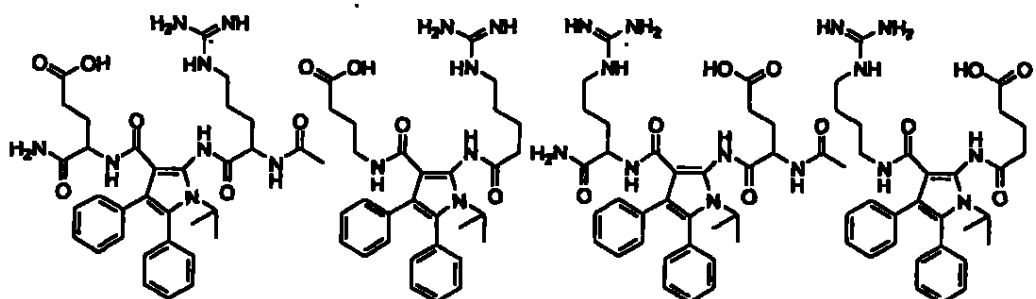
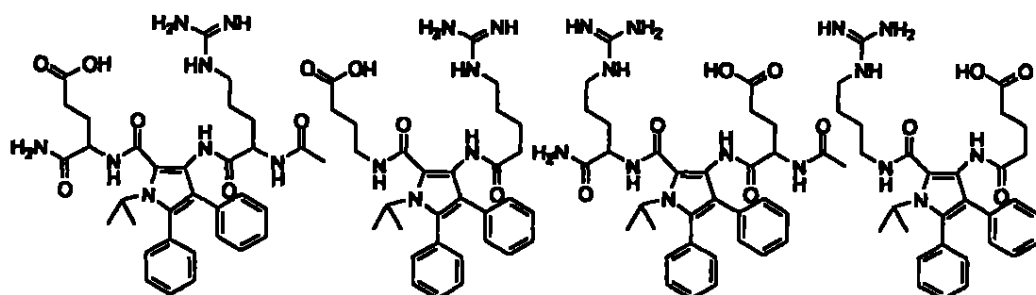
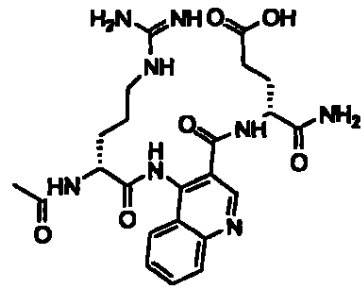
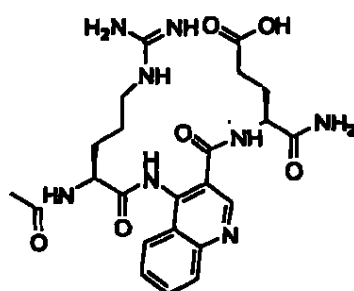
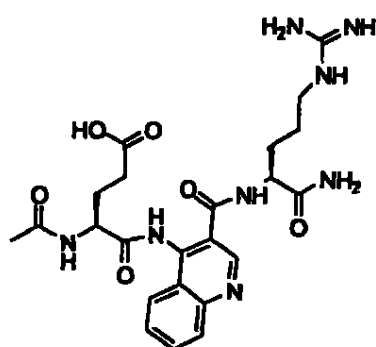
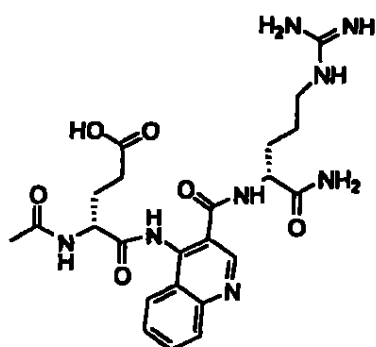
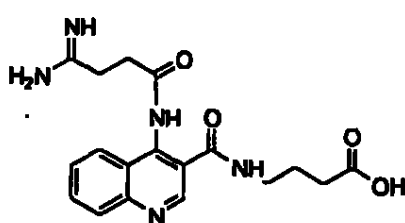
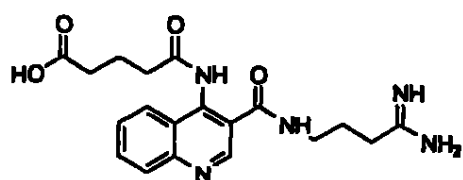


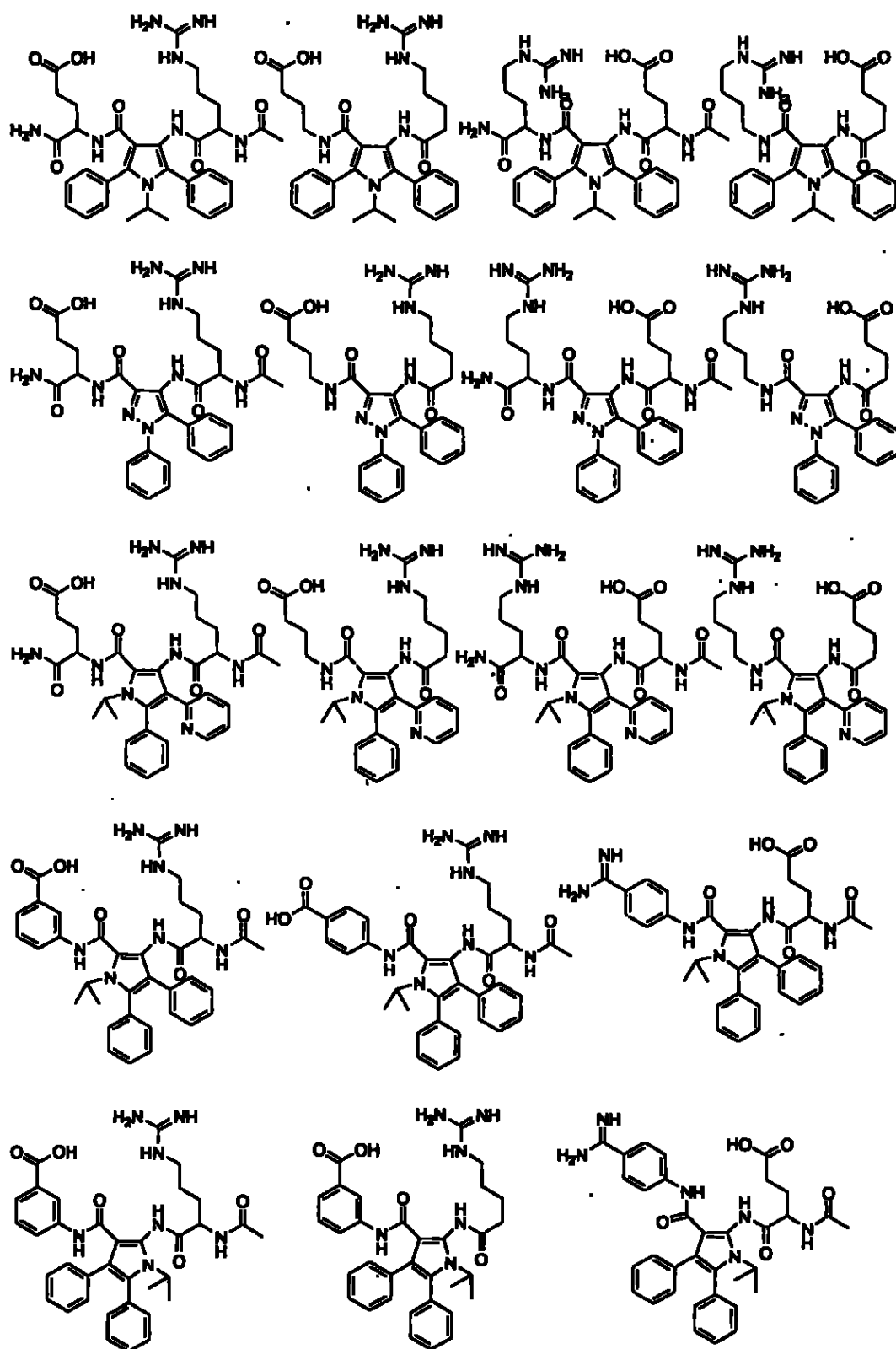
6. The mediator of Claim 1, wherein the bioisostere of the basic group is selected from the group consisting of:

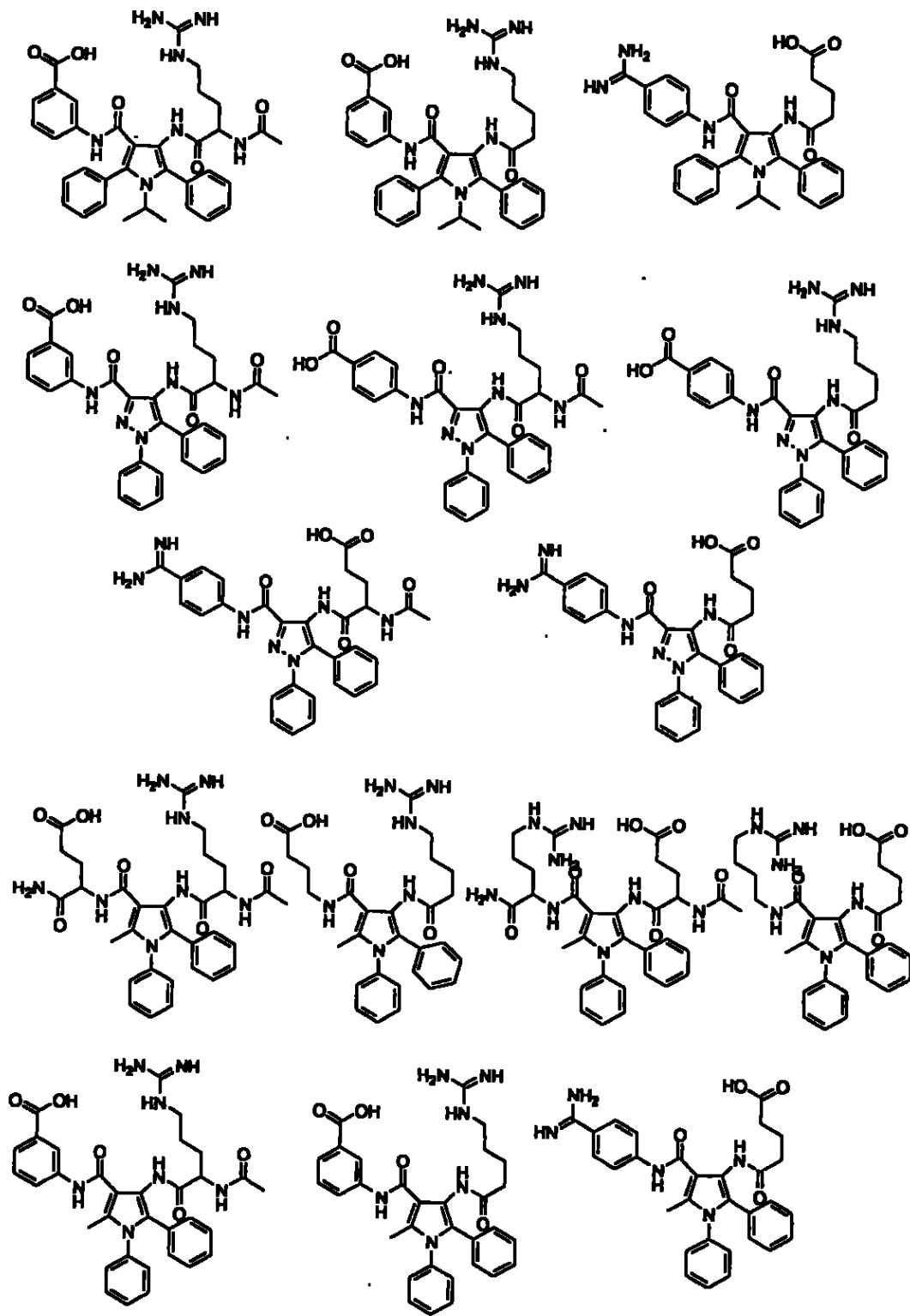
54

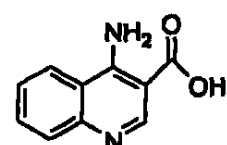
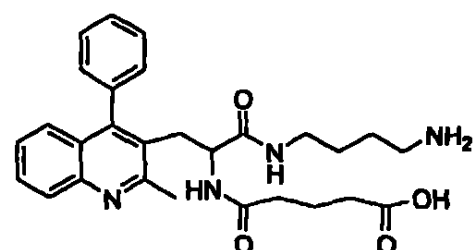
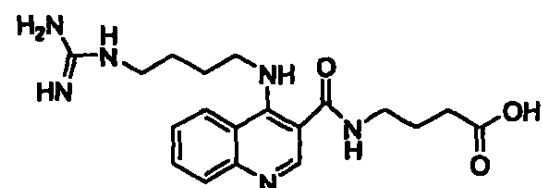
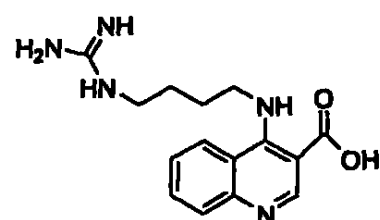
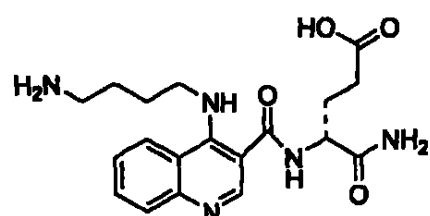
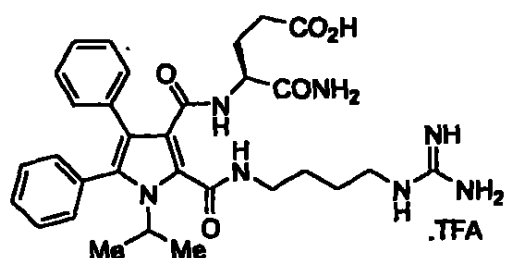


7. The mediator of Claim 1, wherein the mediator is selected from the group consisting of:





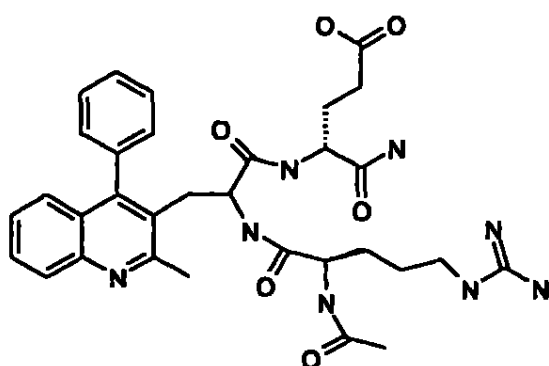




8. The compound 4-Agmatine-3-amidoGABAquinoline.

9. The compound 4-(1-(4-aminobutylcarbamoyl)-2-(2-methyl-4-phenylquinolin-3-yl)ethylcarbamoyl)butanoic acid

10. The compound:



11. The compound 4-(5-guanidinopentylamino)quinoline-3-carboxylic acid.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. nat. Application No.
PCT/US2005/020668

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07D215/54 C07D207/34 C07D231/14 C07D401/04 A61K31/4706
A61K31/40 A61K31/415 A61P3/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C07D A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, PAJ, CHEM ABS Data, WPI Data, EMBASE, BEILSTEIN Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SCHAEFER H ET AL: "ZUR SYNTHESE VON 4-AMINOCHINOLINEN DURCH INTRAMOLEKULARE FRIEDEL-CRAFTS-REAKTION" MONATSHEFTE FUR CHEMIE, SPRINGER VERLAG. WIEN, AT, vol. 109, no. 3, 1978, pages 527-535, XP000945286 ISSN: 0026-9247 compound 7A	1-7
A	EP 1 419 770 A (SHIONOGI & CO., LTD) 19 May 2004 (2004-05-19) paragraph '0012!	1-11
	-/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 October 2005

Date of mailing of the international search report

11/10/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5016 Patentkan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Usue111, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No
PCT/US2005/020660

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 1999, no. 03, 31 March 1999 (1999-03-31) & JP 10 316641 A (SANKYO CO LTD), 2 December 1998 (1998-12-02) abstract	1-11
P,A	US 2004/235888 A1 (YAMAMORI TERUO ET AL) 25 November 2004 (2004-11-25) paragraph '0188! - paragraph '0194!; claim 1	1-11
P,A	WO 2004/094471 A (AVANIR PHARMACEUTICALS; SIRCAR, JAGADISH, C; ALISALA, KASHINATHAM; NIK) 4 November 2004 (2004-11-04) claim 1	1-11
X	BOLTON G L ET AL: "Synthesis of Conformationally Constrained Macrocyclic Analogues of the Potent and Selective CCK-B Antagonist CI-988" TETRAHEDRON, vol. 49, no. 3, 1993, pages 525-535, XP002346854 compounds 10A-D	1
X	ALTMAN J ET AL: "Synthesis of Pyridine Derivatives of L-Phenylalanine as Antisickling Reagents" J. MED. CHEM., vol. 27, 1984, pages 596-600, XP002346853 compound 4	1
X	DATABASE BEILSTEIN BEILSTEIN INSTITUTE FOR ORGANIC CHEMISTRY, FRANKFURT-MAIN, DE; XP002347034 Database accession no. BRN: 7669359. abstract & BIOORG. MED. CHEM. LETT., vol. 6, no. 13, 1996, pages 1601-1606,	1
X	DATABASE BEILSTEIN BEILSTEIN INSTITUTE FOR ORGANIC CHEMISTRY, FRANKFURT-MAIN, DE; XP002347033 Database accession no. BRN:3631250 abstract & SYNTH. COMMUN., vol. 20, no. 5, 1990, pages 773-781,	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No.
PCT/US2005/020660

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1419770	A	19-05-2004	US 2004248950 A1	09-12-2004
JP 10316641	A	02-12-1998	NONE	
US 2004235888	A1	25-11-2004	NONE	
WO 2004094471	A	04-11-2004	NONE	

184483
59
(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA BAJO EL TRATADO DE COOPERACIÓN INTERNACIONAL
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de Propiedad
Intelectual
Oficina Internacional



(43) Fecha de Publicación Internacional
29 de diciembre de 2005 (29.12.2005)

(10) Número de Publicación Internacional
PCT WO 2005/123686 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes: C07D 215/54, 207/34, 231/14, 401/04, A61K 31/4706, 31/40, 31/415, A61P 3/00

(74) Agente: DELANEY, Karoline, A.; Knobbs, Martens, Olson & Bear, LLP, 2040 Main Street, 14th Floor, Irvine, CA 92614 (US).

(21) No. Solicitud Internacional: PCT/US2005/020660

(81) Países designados (a menos que se indique lo contrario para cada clase de protección disponible): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) Fecha de Presentación Internacional:
9 de junio de 2005 (09.06.2005)

(25) Idioma de Presentación: Inglés

(26) Idioma de Publicación: Inglés

(30) Datos relativos a la Prioridad:
80/678,227 9 de junio de 2004 (09.06.2004) US

(84) Países designados (a menos que se indique lo contrario para cada clase de protección disponible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasia (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Solicitante (para todos los países destinatarios con excepción de USA): AVANIR PHARMACEUTICALS [US/US]; 11388 Sorrento Valley Road, Suite 200, San Diego, CA 92121 (US).

(72) Inventores, a

(75) Inventores/Solicitantes (para USA únicamente): SIRCAR, Jagadiah, C. [US/US]; 4832 Riding Ridge Road, San Diego, CA 92130 (US). THOMAS, Richard, J. [US/US]; 12827 Sarsaparilla Street, San Diego, CA 92129 (US). KHATUYA, Haripada [IN/US]; 13624 Via Cima Bella, San Diego, CA 92129 (US). NIKOULIN, Igor [RU/US]; 3845 Elijah Court, #835, San Diego, CA 92130 (US).

Publicado:

— con informe internacional de búsqueda

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, remítase a las "Notas Guía sobre Códigos y Abreviaturas" que aparece al comienzo de cada edición regular del Boletín Oficial PCT.

(54) Título: DERIVADOS HETEROCICLICOS PARA TRATAMIENTO DE HIPERLIPIDEMIA Y ENFERMEDADES ASOCIADAS

(57) Extracto: La presente invención provee composiciones adaptadas para mejorar el transporte inverso de colesterol en mamíferos. Las composiciones son apropiadas para administración oral y son útiles en el tratamiento y/o prevención de hipercolesterolemia, aterosclerosis y enfermedades cardiovasculares asociadas.

WO 2005/123686 A1

DERIVADOS HETEROCÍCLICOS PARA TRATAMIENTO DE HIPERLIPIDEMIA Y ENFERMEDADES RELACIONADAS

Referencia Cruzada a una Solicitud Relacionada

[0001] Esta solicitud reivindica prioridad bajo 35 U.S.C. § 119(e) a la Solicitud Provisional de los Estados Unidos No. 60/578,227, presentada el 9 de junio de 2004, la cual se incorpora aquí por referencia.

Antecedentes de la Invención

Campo de la Invención

[0002] La invención se refiere a mediadores de molécula pequeña de transporte inverso de colesterol (RCT) para tratar hipercolesterolemia y enfermedades cardiovasculares asociadas y otras enfermedades.

Descripción del Arte Relacionado

[0003] Actualmente está bien establecido que el colesterol elevado en el suero ("hipercolesterolemia") es un factor causal en el desarrollo de aterosclerosis, una acumulación progresiva de colesterol en las paredes arteriales. La hipercolesterolemia y la aterosclerosis son causas principales de enfermedades cardiovasculares, inclusive hipertensión, arteriopatía coronaria, infarto del miocardio y apoplejía. Sólo en los Estados Unidos cerca de 1.1 millones de individuos sufren cada año de infarto del miocardio, cuyos costos se calcula que sobrepasan los US\$117.000 millones. Aunque existen numerosas estrategias farmacéuticas para bajar los niveles de colesterol en la sangre, muchas de éstas tienen efectos secundarios indeseables y han planteado preocupaciones de seguridad. Más aún, ninguna de las terapias con medicamentos disponibles en el comercio estimula adecuadamente el transporte inverso de colesterol, una ruta metabólica importante que elimina colesterol del cuerpo.

[0004] El colesterol en circulación es transportado por lipoproteínas en el plasma— partículas de composición compleja lípido y proteína, que transportan lípidos en la sangre. Las lipoproteínas de baja densidad (LDLs), y las lipoproteínas de alta densidad (HDLs) son los principales transportadores de colesterol. Se cree que las LDLs son

responsables del suministro de colesterol desde hígado (donde se sintetiza u obtiene de recursos del régimen alimenticio) a los tejidos extrahepáticos en el cuerpo. El término "transporte inverso de colesterol" describe el transporte de colesterol desde los tejidos extrahepáticos al hígado donde se cataboliza e elimina. Se cree que las partículas HDL en el plasma desempeñan un papel importante en el proceso de transporte inverso, actuando como barredores de colesterol.

[0005] Pruebas contundentes sustentan la noción de que los lípidos depositados en las lesiones arterioscleróticas se derivan principalmente de la LDL en el plasma; por consiguiente, las LDLs se han vuelto popularmente conocidas como el colesterol "malo". En contraste, los niveles de HDL en el plasma se correlacionan inversamente con la cardiopatía coronaria— de hecho, niveles elevados en el plasma de HDL se consideran un factor de riesgo negativo. Se ha planteado la hipótesis de que concentraciones elevadas de HDL en el plasma no sólo protegen contra la arteriopatía coronaria, sino que pueden inducir realmente regresión de las placas arterioscleróticas (véase, por ejemplo, Badimon *et al.*, 1992, *Circulation* 86 (Suppl. III) 86-94). Por consiguiente, las HDLs se han vuelto popularmente conocidas como el colesterol "bueno".

[0006] La cantidad de colesterol intracelular liberado de las LDLs controla el metabolismo del colesterol celular. La acumulación del colesterol celular derivado de LDLs controla tres procesos: (1) reduce la síntesis del colesterol celular desactivando la síntesis de HMGCoA reductasa, una enzima clave en la ruta biosintética del colesterol; (2) el colesterol que entra, derivado de LDL, promueve el almacenamiento de colesterol activando LCAT, la enzima celular que convierte el colesterol en colesterol ésteres, los cuales se depositan en gotículas de almacenamiento; y (3) la acumulación de colesterol en las células pone en marcha un mecanismo de retroalimentación que inhibe la síntesis celular de nuevos receptores LDL. Por lo tanto, las células ajustan su complemento de receptores LDL, de manera que se introduzca suficiente colesterol para satisfacer sus necesidades metabólicas, sin sobrecarga. (Para una reseña,

véase Brown & Goldstein, En: The Pharmacological Basis Of Therapeutics, 8th Ed., Goodman & Gilman, Pergamon Press, NY, 1990, Ch. 36, pp. 874-896).

[0007] El transporte inverso de colesterol (RCT) es la ruta mediante la cual el colesterol de las células periféricas puede devolverse al hígado para reciclarlo a los tejidos extrahepáticos, o excretarse en el intestino como bilis. La ruta RCT representa el único medio de eliminar colesterol de la mayoría de los tejidos extrahepáticos. El RCT consta principalmente de tres pasos: (1) descarga de colesterol, la eliminación inicial de colesterol de las células periféricas; (2) esterificación del colesterol por la acción de la lecitina:colesterol aciltransferasa (LCAT), que previene el re-ingreso del colesterol descargado en las células periféricas; y (3) captación/suministro de HDL colesterol éster a las células hepáticas. LCAT es la enzima clave en la ruta RCT y se produce principalmente en el hígado y circula en el plasma asociada con la fracción HDL. LCAT convierte colesterol derivado de las células en colesterol ésteres, los cuales se barren en HDL destinada a eliminación. La ruta RCT es mediada por HDLs.

[0008] HDL es un término genérico para partículas de lipoproteína que se caracterizan por su alta densidad. Los principales constituyentes lipídicos de los complejos HDL son varios fosfolípidos, colesterol (éster) y triglicéridos. Los componentes de apolipoproteína más destacados son A-I y A-II, que determinan las características funcionales de HDL.

[0009] Cada partícula HDL contiene por lo menos una copia (y, usualmente, dos a cuatro copias) de apolipoproteína A-I (ApoA-I). ApoA-I se sintetiza por el hígado y el intestino delgado como preproapolipoproteína, la cual se secreta como una proproteína que se disocia rápidamente para proporcionar un polipéptido maduro con 243 residuos de aminoácido. ApoA-I consta principalmente de 6 a 8 diferentes repeticiones de 22 aminoácidos distanciadas por una fracción conectora que es a menudo prolina, y en algunos casos consta de un tramo conformado por varios residuos. ApoA-I forma tres tipos de complejos estables con lípidos:

complejos pequeños, deficientes en lípidos denominados pre-beta-1 HDL, partículas discoides aplanadas que contienen lípidos polares (fosfolípido y colesterol) denominadas pre-beta-2 HDL; partículas esféricas que contienen lípidos polares y no polares, denominadas HDL esférica o madura (HDL3 y HDL2). Aunque la mayor parte de la HDL en circulación contiene tanto ApoA-I como ApoA-II, la fracción de HDL, que contiene únicamente ApoA-I (AI-HDL), parece ser más efectiva en RCT. Estudios epidemiológicos sustentan la hipótesis de que AI-HDL es anti-aterógena. (Parra *et al*, 1992, *Arterioscler. Thromb.* 12:701-707; Decossin *et al*, 1997, *Eur. J. Clin. Invest.* 27:299-307).

[0010] Varias líneas de evidencia basadas en datos obtenidos *in vivo* implican la HDL y su principal componente de proteína, ApoA-I, en la prevención de lesiones arterioscleróticas y, potencialmente, la regresión de placas – haciendo de éstas blancos atractivos para intervención terapéutica. Primero, existe una correlación inversa entre la concentración de ApoA-I (HDL) en el suero y la aterogénesis en el hombre (Gordon & Rifkind, 1989, *N. Eng. J. Med.* 321:1311-1316; Gordon *et al*, 1989, *Circulation* 79:8- 15). En efecto, subpoblaciones específicas de HDL se han asociado con un riesgo reducido de aterosclerosis en humanos (Miller, 1987, *Amer. Heart* 113:589-597; Cheung *et al*, 1991, *Lipid Res.* 32:383-394); Fruchart & Ailhaud, 1992, *Clin. Chem.* 38:79).

[0011] Segundo, estudios con animales sustentan el papel protector de ApoA-I (HDL). El tratamiento, con ApoA-I o HDL, de conejos alimentados con colesterol redujo el desarrollo y evolución de placa (estrías grasas) en ratones alimentados con colesterol (Koizumi *et al*, 1988, *J. Lipid Res.* 29:1405-1415; Badimon *et al*, 1989, *Lab. Invest.* 60:455-461; Badimon *et al*, 1990, *J. Clin. Invest.* 85:1234-1241). No obstante, la eficacia variaba dependiendo de la fuente de HDL (Beitz *et al*, 1992, *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 47:149-152; Mezdoor *et al*, 1995, *Atherosclerosis* 113:237-246).

[0012] Tercero, se obtuvieron pruebas directas del papel de la ApoA-I de experimentos que implicaban animales transgénicos. La

expresión del gen humano para ApoA-I, transferido a ratones genéticamente predispuestos a aterosclerosis inducida por la dieta, protegió contra el desarrollo de lesiones aórticas (Rubin *et al.*, 1991, *Nature* 353:265-267). Se demostró asimismo que el transgén de ApoA-I suprimía la aterosclerosis en ratones con deficiencia de ApoE y en ratones transgénicos Apo(a) (Paszty *et al.*, 1994, *J Clin. Invest.* 94:899-903; Plump *et al.*, 1994, *PNAS. USA* 91:9607-9611; Liu *et al.*, 1994, *J. Lipid Res.* 35:2263-2266). Resultados similares se observaron en conejos transgénicos que expresaban ApoA-I humana (Duverger, 1996, *Circulation* 94:713-717; Duverger *et al.*, 1996, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16:1424-1429), y en ratas transgénicas donde concentraciones elevadas de ApoA-I humana protegieron contra aterosclerosis e inhibieron la recurrencia de estenosis luego de la angioplastia con globo (Burkey *et al.*, 1992, *Circulation*, Supplement I, 86:I-472, Abstract No. 1876; Burkey *et al.*, 1995, *J. Lipid Res.* 36:1463-1473).

Tratamientos Actuales de Hipercolesterolemia y Otras Dislipidemias

[0013] En las dos últimas décadas más o menos, la separación de compuestos colesterolémicos en reguladores de HDL y LDL, y el reconocimiento de la deseabilidad de disminuir los niveles de LDL en la sangre ha conducido al desarrollo de un número de medicamentos. Sin embargo, muchos de estos fármacos poseen efectos colaterales indeseables y/o son contraindicados en ciertos pacientes, particularmente cuando se administran en combinación con otros medicamentos. Estos fármacos y estrategias terapéuticas incluyen:

- (1) resinas barredoras de ácido biliar, que interrumpen la reconversión de ácidos biliares del intestino al hígado [por ejemplo, colestiramina (QUESTRAN LIGHT, Bristol-Myers Squibb), y clorhidrato de colestipol (COLESTID, Pharmacia & Upjohn Company)];
- (2) estatinas, que inhiben la síntesis del colesterol bloqueando HMGC_oA reductasa – la enzima clave comprometida en la biosíntesis del colesterol [por ejemplo, lovastatina (MEVACOR, Merck & Co.,

65

Inc.), un producto natural derivado de una cepa de *Aspergillus*, pravastatina (PRAVACHOL, Bristol-Myers Squibb Co.), y atorvastatina (LIPITOR, Warner Lambert)];

(3) niacina es un complejo de vitamina B, soluble en agua, que disminuye la producción de VLDL y es efectivo en reducir la LDL;

(4) fibratos que se utilizan para bajar los triglicéridos en el suero, reduciendo la fracción VLDL y puede, en algunas poblaciones de pacientes, dar lugar a reducciones modestas de colesterol en el plasma mediante el mismo mecanismo [por ejemplo, clofibrato (ATROMID-S, Wyeth-Ayerst Laboratories), y gemfibrozil (LOPID, Parke-Davis)];

(5) terapia de sustitución de estrógeno puede disminuir las concentraciones de colesterol en mujeres pos-menopáusicas;

(6) se ha informado que los ácidos alfa, omega-dicarboxílicos de cadena larga reducen los triglicéridos y el colesterol en el suero (véase, por ejemplo, Bisgaier *et al.*, 1998, *J. Lipid Res.* 39:17-30; WO 98/30530; Patente de los Estados Unidos No. 4,689,344; WO 99/00116; Patente de los Estados Unidos No. 5,756,344; Patente de los Estados Unidos No. 3,773,946; Patente de los Estados Unidos No. 4,689,344; Patente de los Estados Unidos No. 4,689,344; Patente de los Estados Unidos No. 4,689,344; y Patente de los Estados Unidos No. 3,930,024);

(7) otros compuestos incluidos éteres (véase, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos No. 4,711,896; Patente de los Estados Unidos No. 5,756,544; Patente de los Estados Unidos No. 6,506,799), fosfatos de dolicol (Patente de los Estados Unidos No. 4,613,593), y derivados de azolidinadiona (Patente de los Estados Unidos No. 4,287,200) se divulgan como reductores de las concentraciones de triglicéridos y colesterol en el suero.

[0014] Ninguno de estos medicamentos actualmente disponibles para disminuir el colesterol elevan en forma segura los niveles de HDL y estimulan el RCT. En efecto, la mayoría de estas estrategias actuales de

C60

tratamiento parecen operar sobre la ruta de transporte del colesterol, modulando la ingesta dietética, reconversión, síntesis del colesterol y la población de VLDL.

Agonistas ApoA-I para el Tratamiento de Hipercolesterolemia

[0015] En vista del papel potencial de HDL, es decir, tanto ApoA-I y su fosfolípido asociado, en la protección contra enfermedad arteriosclerótica, se iniciaron análisis clínicos humanos que utilizan ApoA-I producida en forma recombinante, se descontinuaron y, aparentemente, se re-comenzaron por UCB Bélgica (Pharmaprojects, Oct. 27, 1995; IMS R&D Focus, Jun. 30, 1997; Drug Status Update, 1997, *Atherosclerosis* 2(6):261-265); véase también M. Eriksson at Congress, "The Role of HDL in Disease Prevention," Nov. 7-9, 1996, Fort Worth; Lacko & Miller, 1997, *J. Lip. Res.* 38:1267- 1273; y WO 94/13819) y se iniciaron y descontinuaron por Bio-Tech (Pharmaprojects, Apr. 7, 1989). Se han ensayado además estudios clínicos usando ApoA-I para tratar choque septicémico (Opal, "Reconstituted HDL as a Treatment Strategy for Sepsis," IBCs 7th International Conference on Sepsis, Apr. 28-30, 1997, Washington, D.C.; Gouni *et al.*, 1993, *J. Lipid Res.* 94:139-146; Levine, WO 96/04916). No obstante, existen muchos escollos asociados con la producción y uso de ApoA-I, que la hacen menos que ideal como medicamento; por ejemplo, ApoA-I es una proteína de gran tamaño que es difícil y costosa de producir; tienen que superarse problemas significativos de fabricación y reproducibilidad con respecto a la estabilidad durante el almacenamiento, administración de un producto activo y semivida *in vivo*.

[0016] En vista de estas desventajas, se han hecho intentos para preparar péptidos que imiten ApoA-I. Puesto que las actividades claves de ApoA-I se han atribuido a la presencia de repeticiones múltiples de una característica estructural secundaria única en la proteína - una α -hélice anfipática de clase A (Segrest, 1974, *FEBS Lett.* 38:247-253; Segrest *et al.*, 1990, *PROTEINS: Structure, Function and Genetics* 8:103-117), la mayoría de los esfuerzos para diseñar péptidos, que imiten la actividad de ApoA-I, se han centrado en diseñar péptidos que formen α -hélices anfipáticas tipo

clase A (véase, por ejemplo, Discusiones de Antecedentes en la Patente de los Estados Unidos No. 6,376,464 y 6,506,799; incorporadas aquí por referencia en su integridad).

[0017] En un estudio, Fukushima *et al.* sintetizaron un péptido de 22 residuos, compuesto enteramente de residuos Glu, Lys y Leu dispuestos periódicamente de manera que formen una α -hélice anfipática con caras iguales hidrófilas e hidrófobas ("péptido ELK") (Fukushima *et al.*, 1979, *J. Amer. Chem. Soc.* 101(13):3703-3704; Fukushima *et al.*, 1980, *J. Biol. Chem.* 255:10651-10657). El péptido ELK comparte el 41% de homología de secuencia con el fragmento 198-219 de ApoA-I. Se demostró que el péptido ELK se asociaba efectivamente con fosfolípidos e imitaba algunas de las propiedades físicas y químicas de ApoA-I (Kaiser *et al.*, 1983, *PNAS USA* 80:1137-1140; Kaiser *et al.*, 1984, *Science* 223:249-255; Fukushima *et al.*, 1980, más arriba; Nakagawa *et al.*, 1985, *J. Am. Chem. Soc.* 107:7087-7092). Más tarde se descubrió que un dímero de este péptido de 22 residuos imitaba más estrechamente ApoA-I que el monómero; con base en estos resultados, se sugirió que el 44-mero, que está interrumpido en el centro por un disruptor de hélice (Gly o Pro), representaba el dominio funcional mínimo en ApoA-I (Nakagawa *et al.*, 1985, más arriba).

[0018] Otro estudio involucraba péptidos anfipáticos modelo denominados "péptidos LAP" (Pownall *et al.*, 1980, *PNAS USA* 77(6):3154-3158; Sparrow *et al.*, 1981, En: *Peptides: Synthesis- Structure-Function*, Roch and Gross, Eds., Pierce Chem. Co., Rockford, IL, 253-256). Basándose en estudios de unión de lípidos con fragmentos de apolipoproteínas nativas, se diseñaron varios péptidos LAP, denominados LAP-16, LAP-20 y LAP-24 (que contenían 16, 20 y 24 residuos de aminoácido, respectivamente). Estos péptidos anfipáticos modelo no comparten homología de secuencia con las apolipoproteínas y se diseñaron para tener caras hidrófilas organizadas en una manera distinta a los dominios helicoidales anfipáticos tipo clase A, asociados con apolipoproteínas (Segrest *et al.*, 1992, *J. Lipid Res.* 33:141-166). A partir de estos estudios, los autores concluyeron que es necesaria una longitud

mínima de 20 residuos para conferir propiedades de unión de lípido a péptidos anfipáticos modelo.

[0019] Estudios con mutantes de LAP20, que contenían un residuo de prolina en diferentes posiciones en la secuencia, indicaron que existe una relación directa entre la unión de lípido y la activación de LCAT, pero que el potencial helicoidal de un péptido solo no lleva a la activación de LCAT (Ponsin *et al.*, 1986, *J. Biol. Chem.* 261(20):9202-9205). Más aún, la presencia de este disruptor de hélice (Pro) cercano al centro del péptido redujo su afinidad para superficies de fosfolípido, así como su capacidad de activar LCAT. Aunque se demostró que algunos de los péptidos LAP unen fosfolípidos (Sparrow *et al.*, más arriba), existe controversia en cuanto a la medida en que los péptidos LAP son helicoidales en la presencia de lípidos (Buchko *et al.*, 1996, *J. Biol. Chem.* 271(6):3039-3045; Zhong *et al.*, 1994, *Peptide Research* 7(2):99-106).

[0020] Segrest *et al.* han sintetizado péptidos compuestos de 18 a 24 residuos de aminoácido que no comparten homología de secuencia con las hélices de ApoA-I (Kannelis *et al.*, 1980, *J. Biol. Chem.* 255(3):11464-11472; Segrest *et al.*, 1983, *J. Biol. Chem.* 258:2290-2295). Las secuencias se diseñaron específicamente para imitar los dominios helicoidales anfipáticos de alipoproteínas intercambiables de clase A en términos de momento hidrófobo (Eisenberg *et al.*, 1982, *Nature* 299:371-374) y distribución de carga (Segrest *et al.*, 1990, *Proteins* 8:103-117; Patente de los Estados Unidos No. 4,643,988). Un péptido de 18 residuos, el péptido "18", se diseñó para ser una α -hélice clase A modelo (Segrest *et al.*, 1990, más arriba). Estudios con estos péptidos y otros péptidos con una distribución de carga invertida, como el péptido "18R", han demostrado consistentemente que la distribución de carga es crítica para la actividad; péptidos con una distribución de carga invertida exhiben una afinidad de lípido disminuida, relativa a las imitaciones clase A de 18 A y un menor contenido helicoidal en la presencia de lípidos (Kannelis *et al.*, 1980, *J. Biol. Chem.* 255:11464-11472; Anantharamaiah *et al.*, 1985, *J. Biol. Chem.* 260:10248-10255; Chung *et al.*, 1985, *J. Biol. Chem.* 260:10256-10262;

Epand *et al.*, 1987, *J. Biol. Chem.* 262:9389-9396; Anantharamaiah *et al.*, 1991, *Adv. Exp. Med. Biol.* 285:131-140).

[0021] Se ha diseñado igualmente un péptido de "consenso", que contiene 22 residuos de aminoácido basados en las secuencias de las hélices ApoA-I humana (Anantharamaiah *et al.*, 1990, *Arteriosclerosis* 10(1): 95-105; Venkatachalapathi *et al.*, 1991, *Mol. Conformation and Biol. Interactions, Indian Acad. Sci. B*: 585-596). La secuencia se construyó identificando el residuo más predominante en cada posición de las supuestas hélices de la ApoA-I humana. Al igual que los péptidos ya descritos, la hélice formada por este péptido tiene residuos de aminoácido cargados positivamente, agrupados en la interfase hidrófila-hidrófoba, residuos de aminoácido cargados negativamente, agrupados en el centro de la cara hidrófila y un ángulo hidrófobo de menos de 180°. Aunque un dímero de este péptido es algo efectivo en activar LCAT, el monómero exhibió escasas propiedades de unión de lípido (Venkatachalapathi *et al.*, 1991, más arriba).

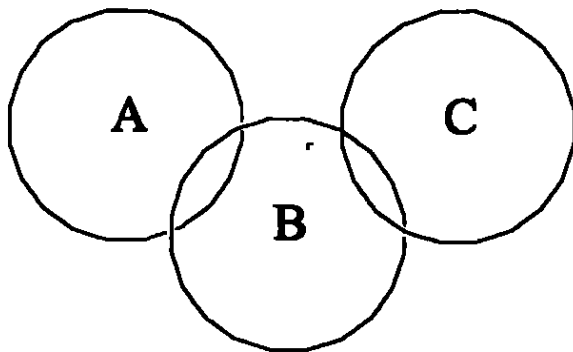
[0022] Basado principalmente en estudios *in vitro* con los péptidos ya descritos, ha surgido un conjunto de "reglas" para diseñar péptidos que imitan la función de ApoA-I. Significativamente, se cree que para afinidad de lípido y activación de LCAT (Venkatachalapathi *et al.*, 1991, más arriba) se requiere una α -hélice anfipática que tenga residuos de aminoácido cargados positivamente, agrupados en la interfase hidrófila-hidrófoba, y residuos de aminoácidos cargados negativamente, agrupados en el centro de la cara hidrófila. Anantharamaiah *et al.* han indicado asimismo que el residuo Glu cargado negativamente en la posición 13 del péptido de consenso de 22-meros, el cual se ubica en la cara hidrófoba de la α -hélice, juega un papel importante en la activación de LCAT (Anantharamaiah *et al.*, 1991, más arriba). Más aún, Brasseur ha indicado que se requiere un ángulo hidrófobo (ángulo ϕ) de menos de 180° para una estabilidad óptima del complejo lípido-apolipoproteína, y que es responsable además de la formación de partículas discoides con los péptidos alrededor del borde de la bicapa de lípido (Brasseur, 1991, *J. Biol. Chem.* 66 (24):16120-

16127). Rosseneu *et al.* han insistido también en que para activación de LCAT se requiere un ángulo hidrófobo de menos de 180° (WO 93/25581).

[0023] Sin embargo, a pesar del progreso en elucidar "reglas" para diseñar agonistas de ApoA-I, hasta la fecha se ha informado que los mejores agonistas de ApoA-I tienen menos del 40% de la actividad de la ApoA-I intacta. Ninguno de los agonistas de péptido descritos en la literatura ha demostrado ser útil como medicamento. Por consiguiente, subsiste una necesidad para el desarrollo de una molécula estable que imite la actividad de ApoA-I y que sea relativamente simple y rentable de producir. Preferiblemente, moléculas candidatas mediarían el RCT tanto directo como indirecto. Tales moléculas serían más pequeñas que los agonistas de péptido existentes y tendrían espectros funcionales más amplios. No obstante, las "reglas" para diseñar mediadores eficaces de RCT no se han elucidado completamente y se desconocen los principios para diseñar moléculas orgánicas con la función de ApoA-I.

Sumario de la Invención

[0024] Se divulga un mediador de transporte inverso de colesterol, que contiene la estructura:



[0025] en donde A, B y C pueden estar en cualquier orden, y en donde:

[0026] A comprende una fracción ácida, que contiene un grupo ácido o su bioisómero;

71

[0027] B comprende una fracción aromática o lipófila, que contiene por lo menos una porción de inhibidor de HMG CoA reductasa o su análogo; y

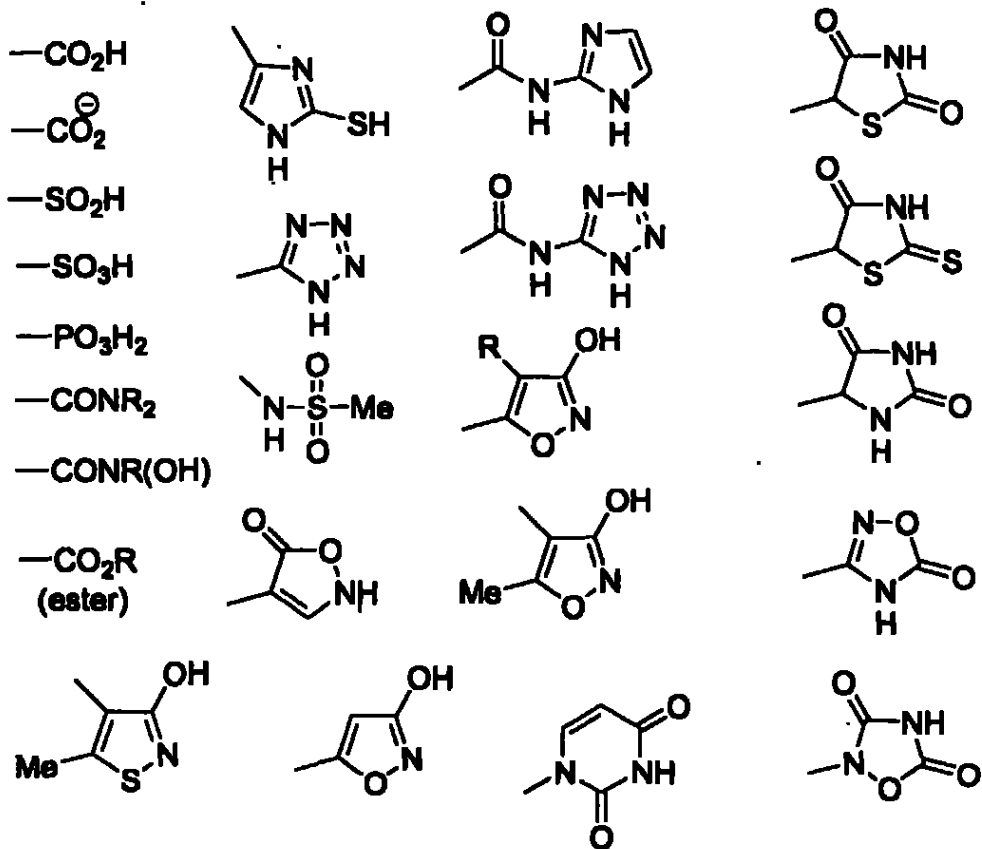
[0028] C comprende una fracción básica, que contiene un grupo básico o su bioisótero.

[0029] Preferiblemente, por lo menos uno de los grupos alfa amino o alfa carboxi se han eliminado de sus respectivas fracciones de terminal amino o carboxi.

[0030] Si no se elimina, el grupo alfa amino se taponar preferiblemente con un grupo protector seleccionado del grupo conformado por acetilo, fenilacetilo, benzoilo, pivolilo, 9- fluorenilmetiloxycarbonilo, ácido 2-naftílico, ácido nicotínico, un $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{CO}-$ donde n varía de 3 a 20, di-tert-butil-4-hidroxi-fenilo, naftilo, naftilo sustituido, Fmoc, bifenilo, fenilo sustituido, heterociclos sustituidos, alquilo, arilo, arilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo fusionado, heteroarilo saturado, y heteroarilo saturado sustituido.

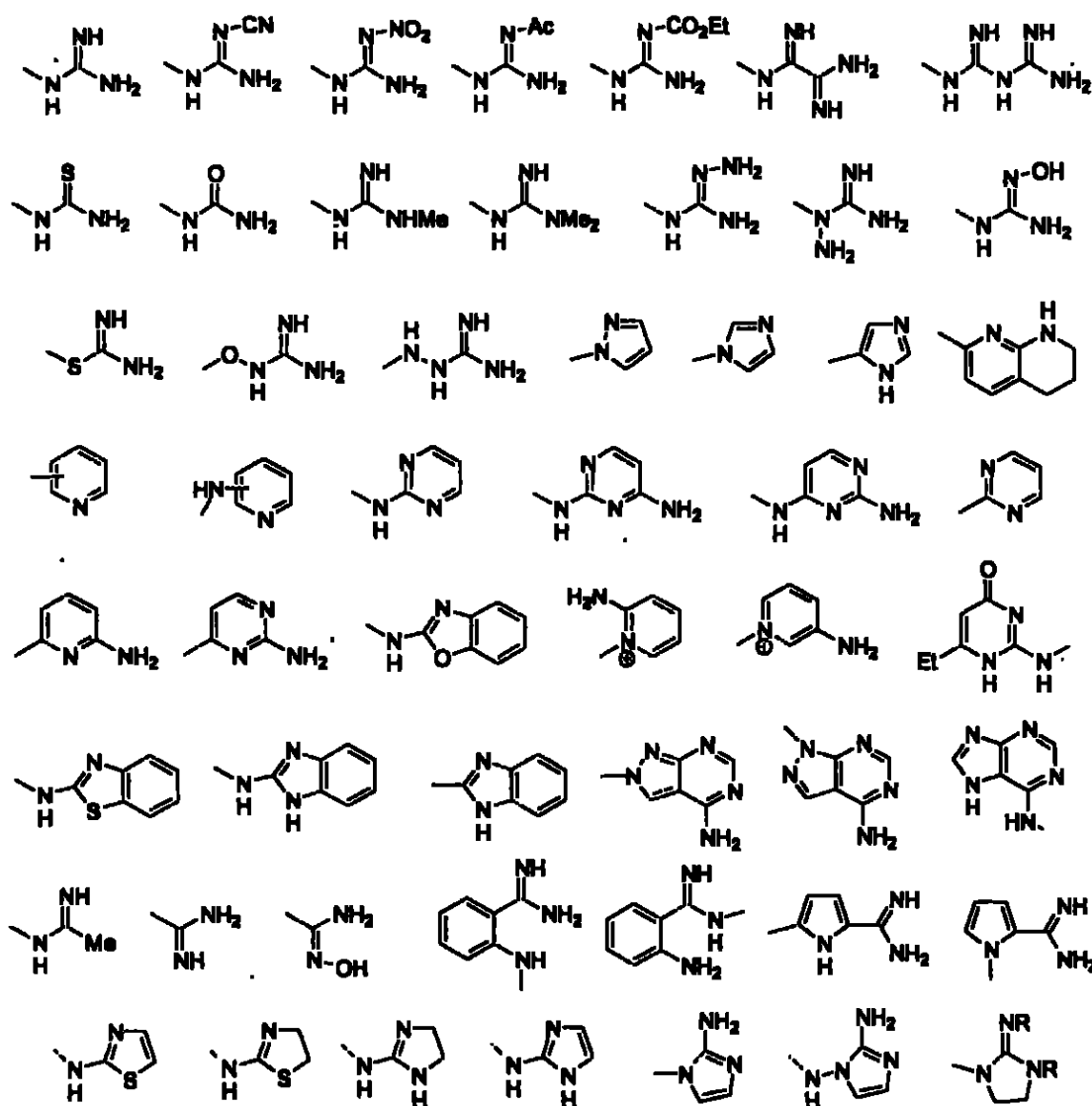
[0031] Si no se elimina, el grupo alfa carboxi se taponar preferiblemente con un grupo protector seleccionado del grupo conformado por una amina, tal como RNH donde R = H, di-*tert*-butil-4-hidroxi-fenilo, naftilo, naftilo sustituido, Fmoc, bifenilo, fenilo sustituido, heterociclos sustituidos, alquilo, arilo, arilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo fusionado, heteroarilo saturado, y heteroarilo saturado sustituido.

[0032] Bioisósteros del grupo ácido pueden seleccionarse del grupo conformado por:



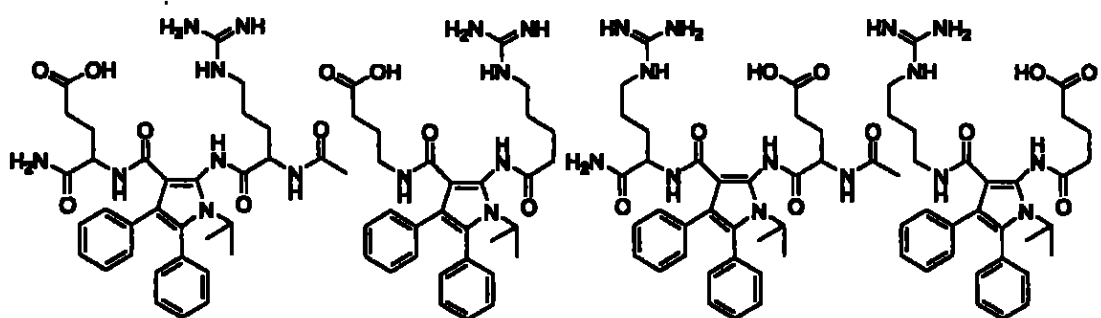
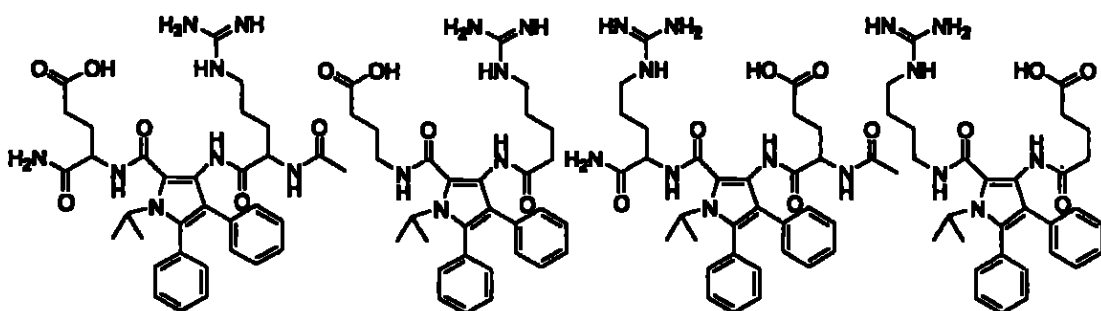
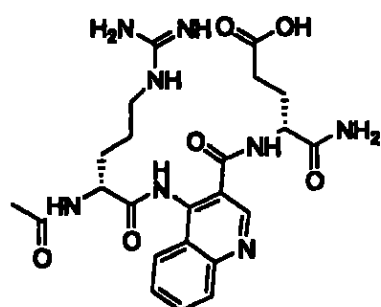
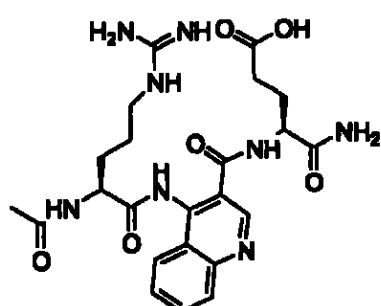
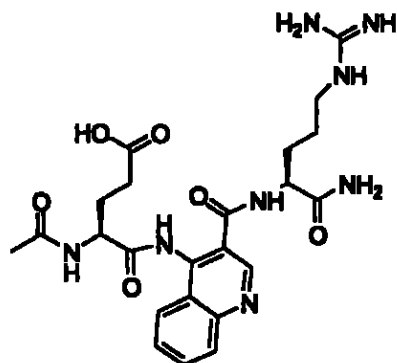
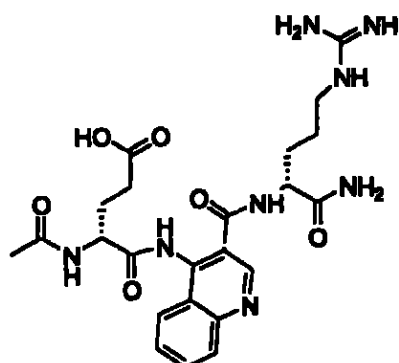
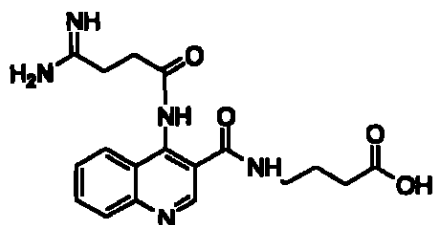
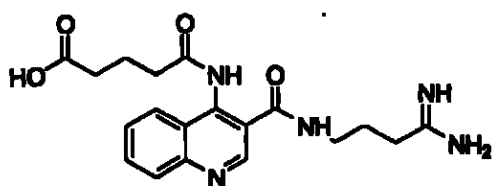
Bioisósteros del grupo básico pueden seleccionarse del grupo conformado por:

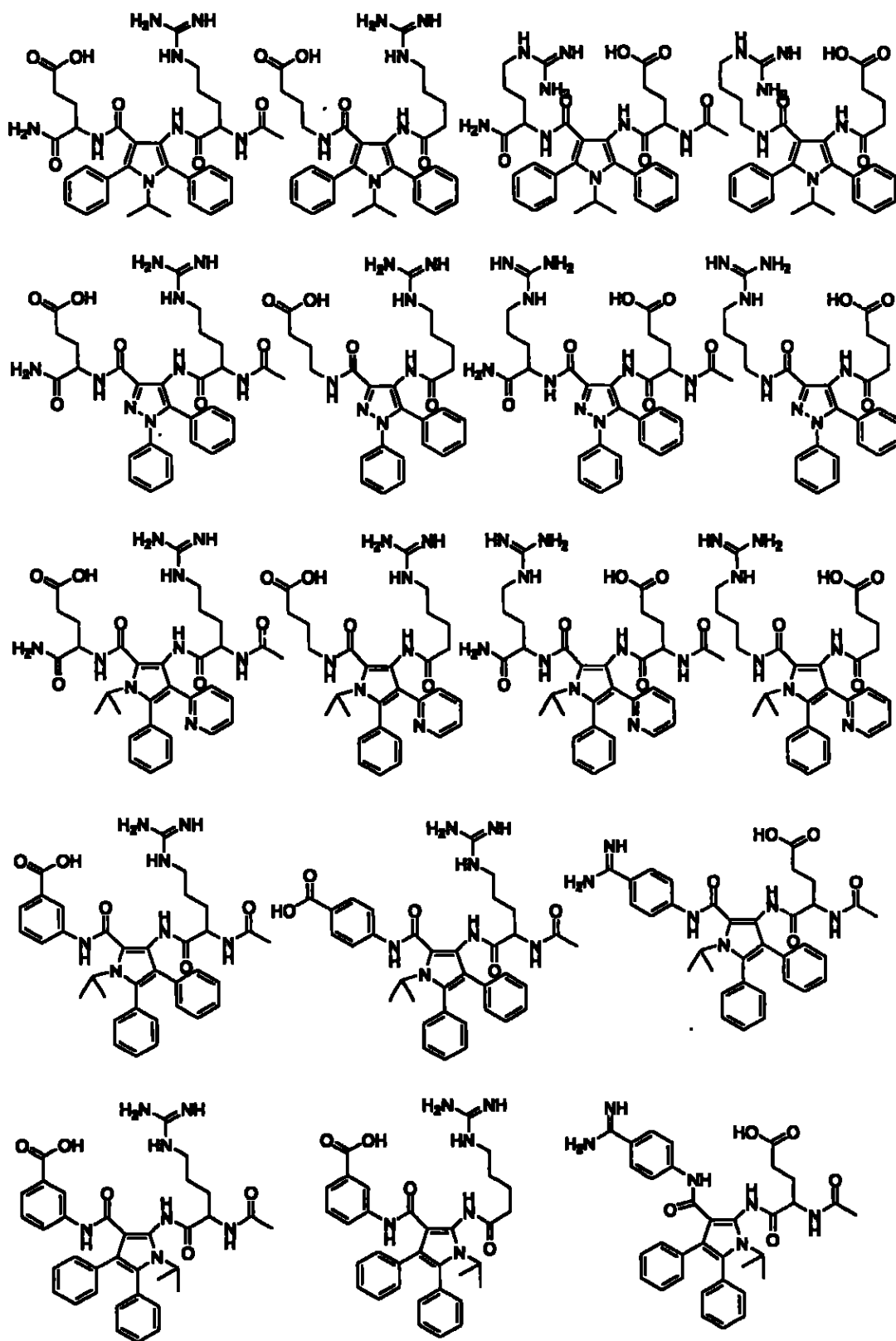
73



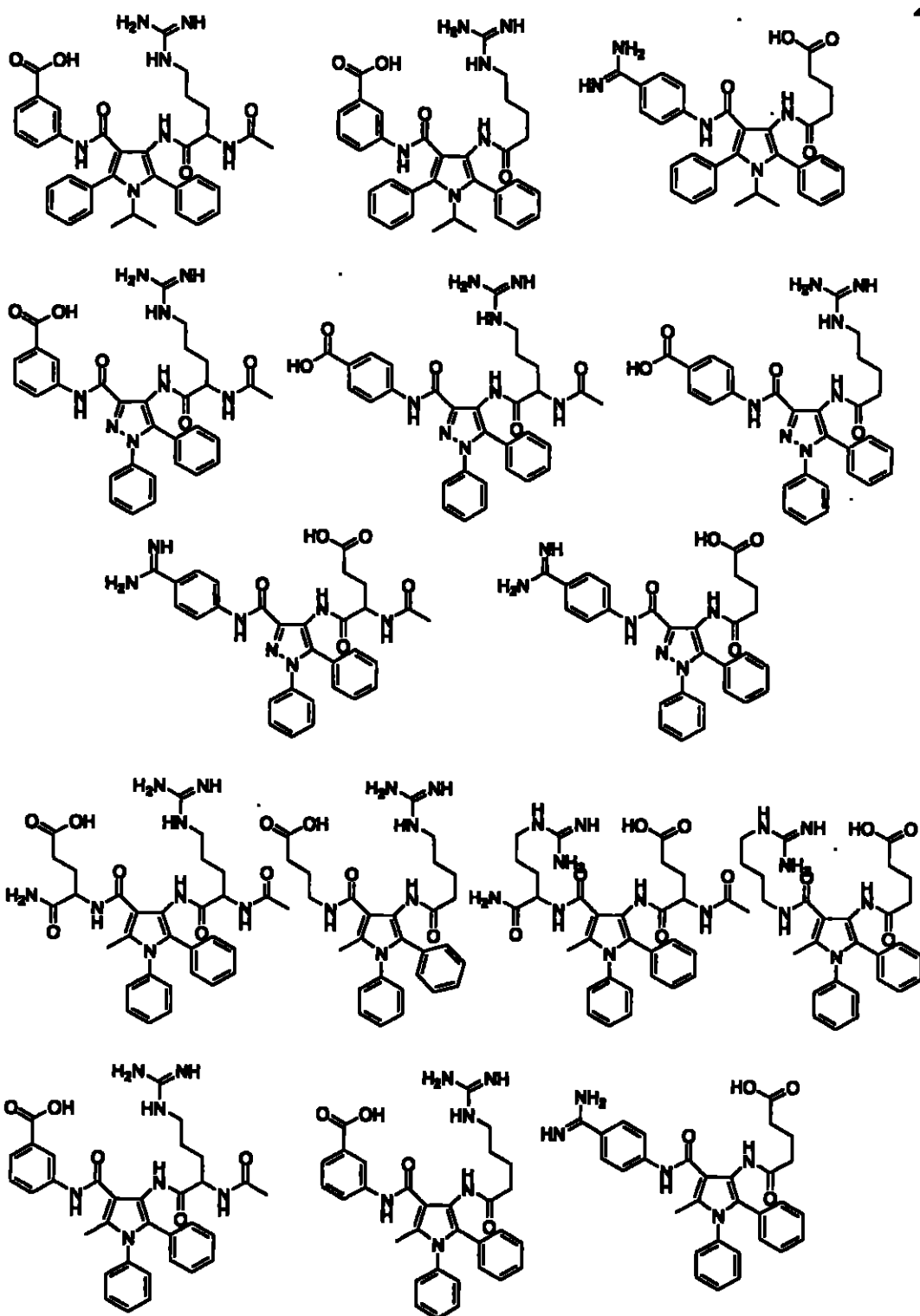
[0033] Los siguientes mediadores se divulgan de acuerdo con incorporaciones preferidas:

74

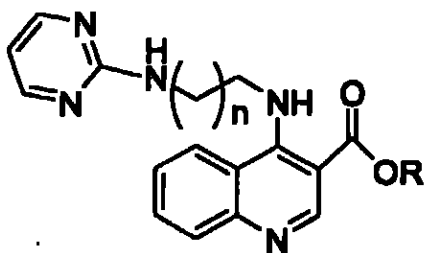
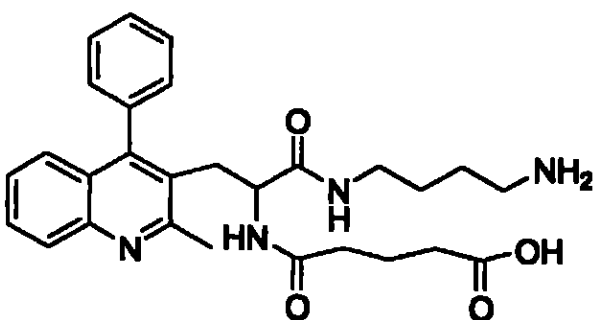
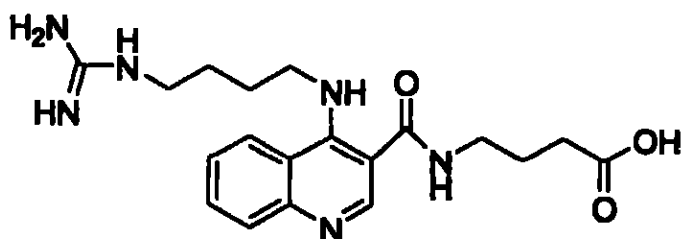
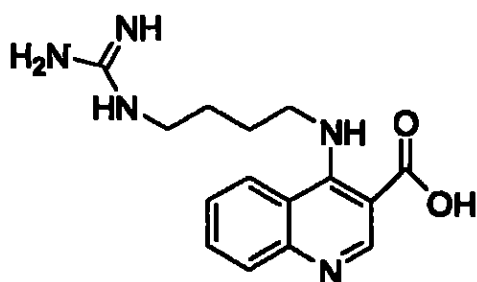
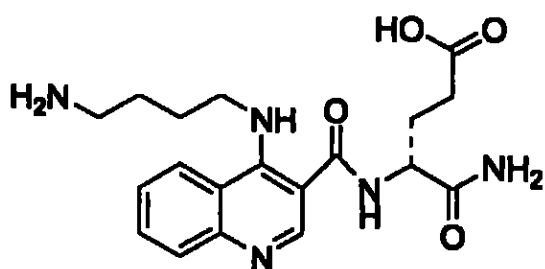
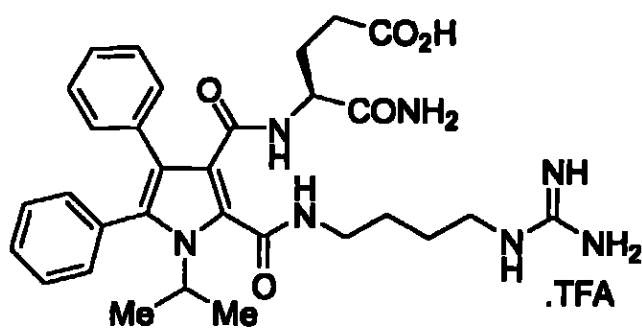




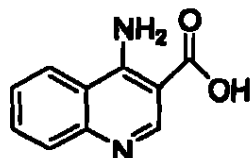
76



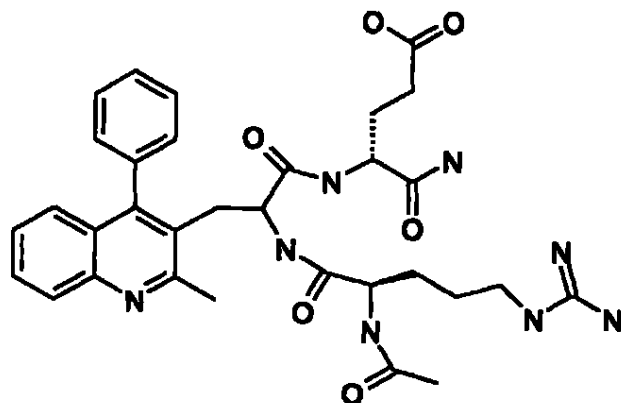
20/77



en donde $n = 1-10$



[0034] En incorporaciones preferidas, se divulgan los siguientes compuestos: 4-Agmatina-3-amidoGABAquinolina, ácido 4-(1-(4-minobutilcarbamoil)-2-(2-metil-4-fenilquinolin-3-1)etilcarbamoil)butanoico, y ácido 4-(5-guanidinopentilamino)quinolin-3-carboxílico. Cualesquiera residuos de aminoácido de terminal carboxi y/o amino, no derivados, en el listado anterior de compuestos preferidos se taponan con un grupo protector. En otra incorporación preferida, el mediador tiene la estructura:



Descripción Detallada de la Incorporación Preferida

[0035] Los mediadores de RCT en incorporaciones preferidas de la invención imitan la función y la actividad de ApoA-I. En un aspecto amplio, estos mediadores son moléculas que comprenden tres regiones, una región ácida, una región lipófila (por ejemplo, aromática), y una región básica. Las moléculas contienen preferiblemente una región cargada positivamente, una región cargada negativamente, y una región lipófila, no cargada. Las ubicaciones de las regiones unas con otras varían entre moléculas; por consiguiente, en una incorporación preferida, las moléculas median RCT independientemente de las posiciones relativas de las tres regiones en cada molécula. Mientras que en algunas incorporaciones preferidas la plantilla molecular o modelo comprende un residuo "ácido"

derivado de aminoácido, una fracción lipófila, y un residuo básico derivado de aminoácido, conectado en cualquier orden para formar un mediador de RCT, en otras incorporaciones preferidas, el modelo molecular puede estar incorporado por un residuo único con regiones ácidas, lipófilas y básicas, tales como por ejemplo, el aminoácido fenilalanina.

[0036] En algunas incorporaciones preferidas, los mediadores moleculares de RCT comprenden aminoácidos L- o D- naturales, análogos de aminoácidos (sintéticos o semisintéticos), y derivados de aminoácidos. Por ejemplo, el mediador puede incluir un residuo "ácido" de aminoácidos o su análogo, un andamiaje aromático o lipófilo, y un residuo básico de aminoácidos o su análogo, uniéndose los residuos por ligamientos de enlace de péptido o amida, o cualesquiera otros enlaces. Los mediadores moleculares de RCT comparten el aspecto común de reducir el colesterol en el suero mejorando las vías de RCT directo o indirecto (es decir, aumentando la descarga de colesterol), la capacidad de activar LCAT, y la capacidad de aumentar la concentración de HDL en el suero.

[0037] En una incorporación preferida, el mediador de transporte inverso de colesterol comprende preferiblemente un grupo ácido, un grupo lipófilo y un grupo básico, y contiene la secuencia: X1-X2-X3, X1-X2-Y3, Y1-X2-X3, o Y1-X2-Y3 en donde: X1 es un aminoácido ácido o su análogo; X2 es una porción aromática o lipófila de un inhibidor de HMG CoA reductasa (por ejemplo, un andamiaje o farmacóforo); X3 es un aminoácido básico o su análogo; Y1 es un análogo de aminoácido ácido sin el grupo alfa amino; y Y3 es un análogo de aminoácido básico sin el grupo alfa carboxi. Cuando el grupo amino alfa de terminal amino está presente (por ejemplo, X1), comprende además un primer grupo protector, y cuando el grupo alfa carboxi de terminal carboxi está presente (por ejemplo, X3), comprende además un segundo grupo protector. Los primeros grupos protectores (terminal amino) se seleccionan preferiblemente del grupo conformado por un acetilo, fenilacetilo, pivolilo, ácido 2-naftílico, ácido nicotínico, un $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_n - \text{CO} -$ donde n varía de 1 a 20, y una amida de acetilo, fenilacetilo, di-*terc*-butil-4-hidroxi-fenilo, naftilo, naftilo

sustituido, FMOC, bifenilo, fenilo sustituido, heterociclos sustituidos, alquilo, arilo; arilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo fusionado, heteroarilo saturado, heteroarilo saturado sustituido y similares. Los segundos grupos protectores (terminal carboxi) se seleccionan preferiblemente del grupo conformado por una amina tal como RNH_2 donde R = di-*terc*-butil-4-hidroxi-fenilo, naftilo, naftilo sustituido, FMOC, bifenilo, fenilo sustituido, heterociclos sustituidos, alquilo, arilo, arilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo fusionado, heteroarilo saturado, heteroarilo saturado sustituido y similares. El orden de los grupos ácidos, lipófilos y básicos puede combinarse en cualquiera y todas las formas posibles para proporcionar compuestos que conserven las características básicas del modelo molecular. En algunas incorporaciones preferidas, análogos de X1 y X3 pueden comprender bioisósteros de los grupos R ácidos y básicos. En otras incorporaciones, uno o más de X1, X2 o X3 son residuos de aminoácido D u otros residuos de aminoácido sintéticos modificados para proporcionar moléculas estables metabólicamente. Esto podría lograrse igualmente mediante un enfoque peptidomimético, es decir, invirtiendo los enlaces peptídicos en la línea de sostén o grupos similares.

[0038] En otra incorporación, el mediador puede estar incorporado en una entidad más grande, tal como un péptido de alrededor de 1 a 10 aminoácidos, o una molécula.

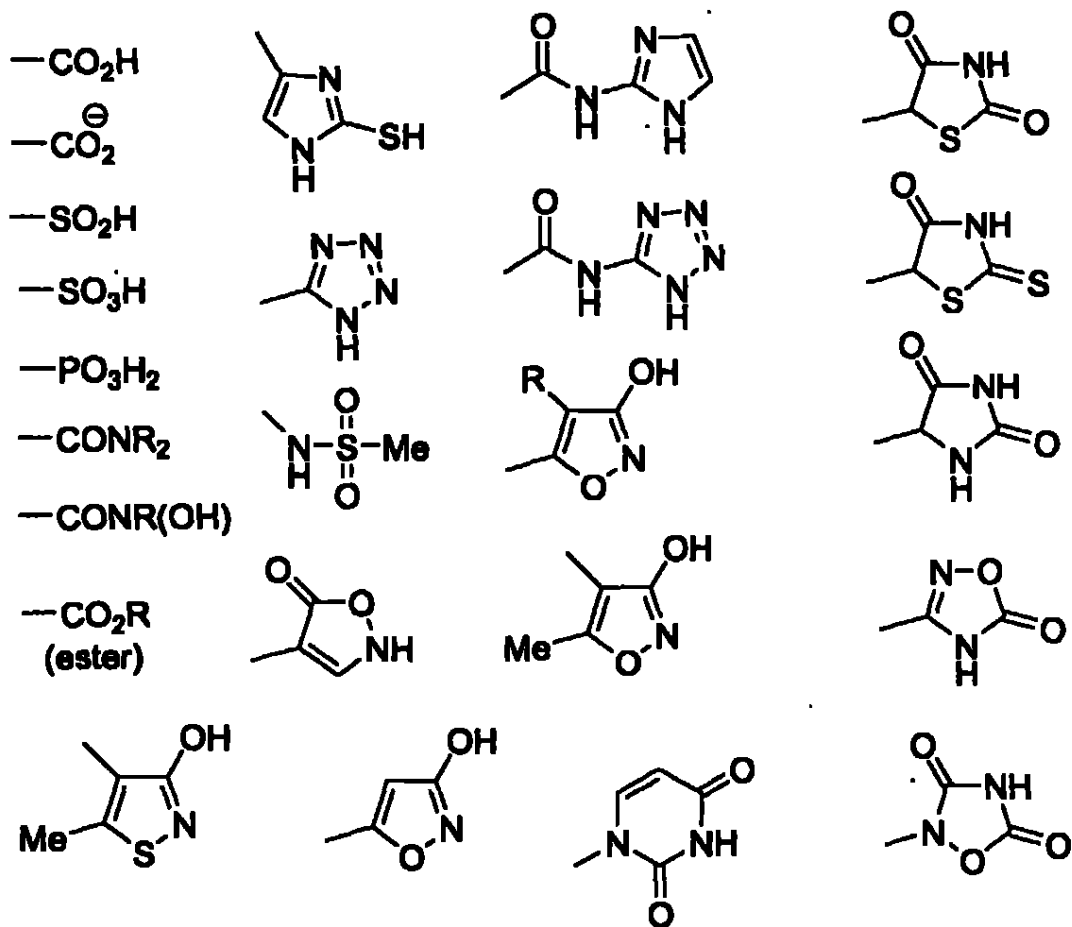
[0039] En esta solicitud andamiaje se utiliza para denotar un farmacóforo, que es un modelo para simplificar un proceso de interacción entre un ligando (molécula de fármaco candidato) y una proteína. Un andamiaje puede poseer ciertas características de la molécula nativa fijadas en un sitio activo de la proteína. Puede asumirse que estas características interactúan con algunas características complementarias en la cavidad de la proteína. Pueden derivarse variaciones, uniendo grupos funcionales al andamiaje. Preferiblemente, definimos un andamiaje por la siguiente deducción: Un andamiaje es una imitación de por lo menos una porción de un inhibidor de una HMG CoA reductasa que es lipófilo o aromático.

[0040] Los términos "bioisótero", "sustitución bioisostérica", "bioisosterismo" y términos estrechamente relacionados, tal como se emplean en esta solicitud, tienen los mismos significados que los generalmente reconocidos en el arte. Bioisósteros son átomos, iones, o moléculas en los cuales las capas periféricas de los electrones pueden considerarse sustancialmente similares. El término bioisótero se utiliza usualmente para significar una porción de una molécula general, por oposición a la molécula entera en sí. La sustitución bioisostérica involucra usar un bioisótero para reemplazar otro con la expectativa de mantener o modificar ligeramente la actividad biológica del primer bioisótero. Los bioisósteros en este caso son por consiguiente átomos o grupos de átomos que tienen tamaño similar, forma y densidad de electrones. El bioisosterismo surge de una expectativa razonable de que una sustitución bioisostérica propuesta tendrá como resultado el mantenimiento de propiedades biológicas similares. Tal expectativa razonable puede basarse únicamente en una semejanza estructural. Esto es especialmente cierto en aquellos casos donde un número de detalles son conocidos con respecto a los dominios característicos del receptor, etc. involucrados, a los cuales se unen los bioisósteros o los cuales actúan sobre dichos bioisósteros en alguna manera.

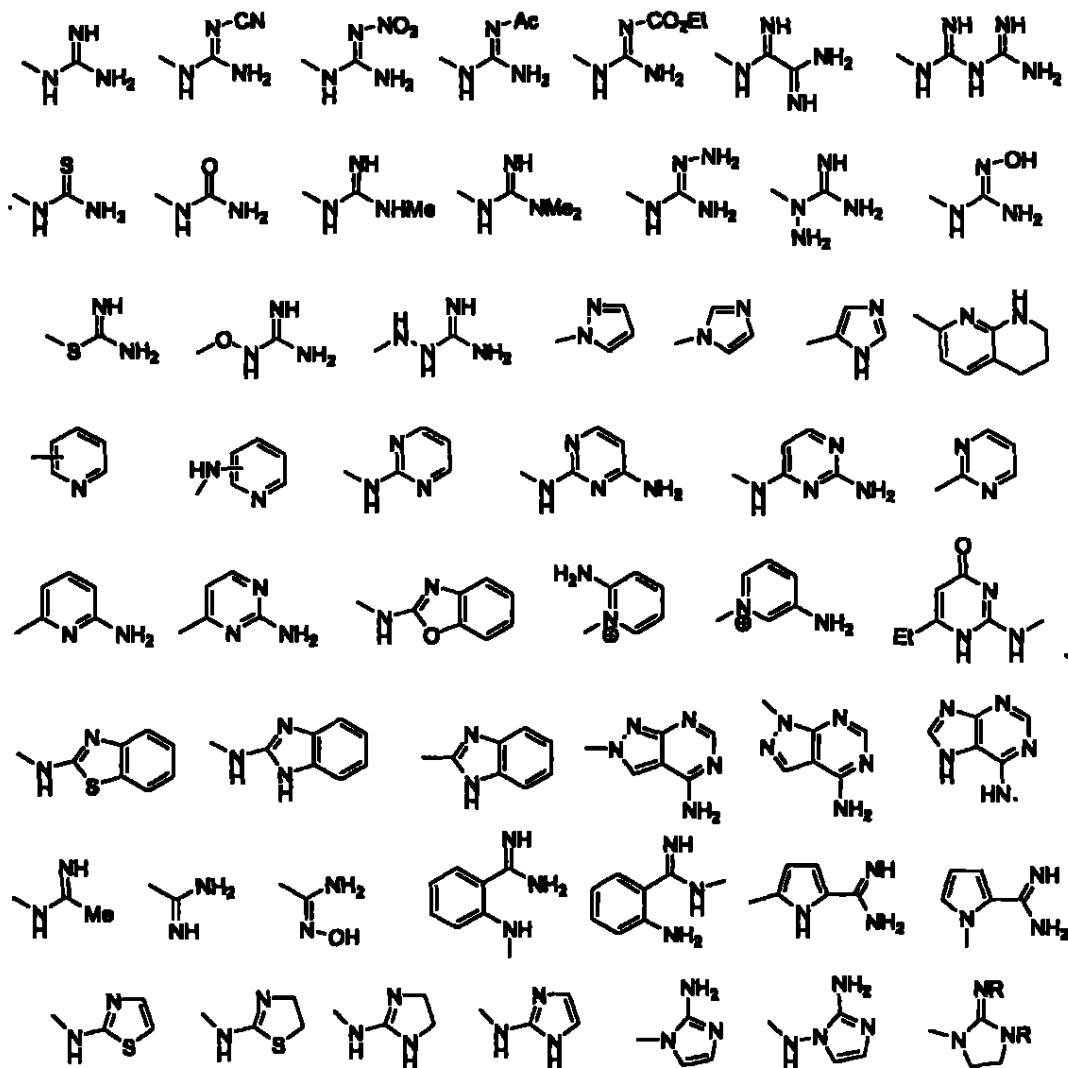
[0041] Ejemplos de bioisósteros para grupos ácidos y básicos se muestran a continuación.

Bioisósteros de Ácido Carboxílico (R = H/alquilo)

82



Bioisósteros de Guanidina (R = H/alquilo)



[0042] Tal como se emplea en esta solicitud, el término "aminoácido" puede referirse igualmente a una molécula de la fórmula general $\text{NH}_2\text{-CHR-COOH}$ o el residuo en un péptido que porta el aminoácido original, donde "R" es una de un número de diferentes cadenas laterales. "R" puede ser un sustituyente que se refiera a uno de los veinte aminoácidos codificados genéticamente. "R" puede ser también un sustituyente que se refiera a uno distinto de los veinte aminoácidos genéticamente codificados. Tal como se emplea en esta solicitud, el término "residuo de aminoácido" se refiere a la porción del aminoácido que permanece luego de perder una molécula de agua, cuando se une a otro aminoácido. Tal como se emplea en esta solicitud, el término "análogo de aminoácido" se refiere a un derivado estructural de un compuesto original de aminoácido, que difiere de él por lo menos en un elemento, tal como por ejemplo, un grupo alfa amino o un

84

aminoácido ácido en el cual el grupo R ácido se ha reemplazado con un bioisómero del mismo. Como tales, incorporaciones "semi-desnudas" y "desnudas" de la presente invención comprenden análogos de aminoácido, puesto que estas versiones varían de una estructura de aminoácido tradicional en carecer por lo menos de un elemento, tal como un grupo alfa amino o carboxi. El término "aminoácido modificado" se refiere más particularmente a un aminoácido que porta un sustituyente "R", que no corresponde a uno de los veinte aminoácidos genéticamente codificados — ya que tales aminoácidos modificados caen dentro de la clase más amplia de análogos de aminoácido.

[0043] Tal como se emplea en esta solicitud, el término "completamente protegido" se refiere a una incorporación preferida, en la cual ambos terminales amino y carboxilo comprenden grupos protectores.

[0044] Tal como se emplea en esta solicitud, el término "semi-desnuda" se refiere a una incorporación preferida, en la cual falta uno del grupo alfa amino o el grupo alfa carboxi de los respectivos residuos de aminoácido de terminal amino o carboxi, o sus análogos. El grupo alfa amino o alfa carboxi restante está taponado con un grupo protector.

[0045] Tal como se emplea en esta solicitud, el término "desnuda" o "completamente desnuda" se refiere a una incorporación preferida, en la cual los dos grupos alfa amino y alfa carboxi se han eliminado de los respectivos residuos de aminoácido de terminal amino o carboxi, o sus análogos.

[0046] Ciertos compuestos pueden existir en formas tautoméricas. La totalidad de tales isómeros, incluidos diastereómeros y enantiómeros, están cubiertos por las incorporaciones. Se asume que los ciertos compuestos están presentes ya sea en las formas tautoméricas o bien en la mezcla de las mismas.

[0047] Ciertos compuestos pueden existir en formas polimórficas. El polimorfismo resulta de la cristalización de un compuesto en por lo menos dos formas distintas. La totalidad de tales polimorfos están cubiertos

85

por las incorporaciones. Se asume que los ciertos compuestos están presentes en un cierto polimorfo o mezcla del mismo.

Inhibición de HMG-CoA Reductasa

[0048] Tal como ya se dijo, un andamiaje es una imitación de una porción de un inhibidor de HMG CoA reductasa que es lipófila o aromática.

[0049] Los inhibidores de HMG CoA reductasa comparten un grupo hidrófobo, rígido, que se conecta a una fracción similar a HMG. Los inhibidores de HMG CoA reductasa son inhibidores competitivos de HMGR con respecto a la unión del sustrato HMG CoA. Los grupos hidrófobos rígidos, estructuralmente diversos, de inhibidores de HMG CoA reductasa se acomodan en una ranura no polar, poco profunda, de HMGR.

[0050] La inhibición de HMGR es un método efectivo y seguro en la terapia de reducción del colesterol. Los inhibidores de HMG CoA reductasa poseen otros efectos, aparte de bajar el colesterol. Éstos incluyen la promoción, mediada por óxido nítrico, del crecimiento de nuevos vasos sanguíneos, la estimulación de la formación de hueso, la protección contra la modificación oxidativa de la lipoproteína de baja densidad, efectos anti-inflamatorios y reducción en las concentraciones de proteína C-reactiva.

Mediación de RCT

[0051] Hasta la fecha, los esfuerzos en diseñar agonistas de ApoA-I se han centrado en las estructuras unitarias de 22-meros, por ejemplo, el "22-mero de consenso" de Anantharamaiah *et al.*, 1990, *Arteriosclerosis* 10(1):95-105; Venkatachalapathi *et al.*, 1991, *Mol. Conformation and Biol. Interactions, Indian Acad. Sci. B*: 585-596, que son capaces de formar α -hélices anfipáticas en presencia de lípidos. (Véase, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos No. 6,376,464 dirigida a miméticos de péptido derivados de modificaciones del 22-mero de consenso). Hay varias ventajas de usar tales péptidos relativamente cortos, comparados con 22-meros más largos. Por ejemplo, los mediadores más cortos de RCT son más fáciles y menos costosos de producir, son química y adaptativamente más estables, las conformaciones preferidas permanecen relativamente

86

rígidas, hay pocas o ningunas interacciones intra-moleculares en la cadena peptídica, y los péptidos más cortos exhiben un mayor grado de disponibilidad oral. Múltiples copias de estos péptidos más cortos podrían unirse a la HDL o LDL, produciendo el mismo efecto de un péptido grande más moderado. Aunque la multifuncionalidad de ApoA-I puede basarse en las contribuciones de sus múltiples dominios α -helicoidales, es también posible que incluso una sola función de ApoA-I, por ejemplo, la activación de LCAT, pueda estar mediada de una manera redundante por más de uno de los dominios α -helicoidales. Por consiguiente, en un aspecto preferido de las incorporaciones, múltiples funciones de ApoA-I pueden imitarse por los mediadores divulgados de RCT, los cuales están dirigidos a un subdominio único.

[0052] Tres características funcionales de ApoA-I son ampliamente aceptadas como criterios principales para el diseño de agonista de ApoA-I: (1) la capacidad de asociarse con fosfolípidos; (2) la capacidad de activar LCAT; y (3) la capacidad de promover la descarga de colesterol de las células. Los mediadores moleculares de RCT de acuerdo con algunos modos de las incorporaciones preferidas pueden exhibir únicamente la última característica funcional — capacidad de aumentar RCT. No obstante, un buen número de otras propiedades de ApoA-I, que a menudo se pasan por alto, hacen la ApoA-I un blanco particularmente atractivo para intervención terapéutica. Por ejemplo, ApoA-I dirige el flujo de colesterol al hígado mediante un proceso mediado por receptor y modula la producción de pre- β -HDL (aceptor primario de colesterol de los tejidos periféricos) mediante una reacción estimulada por la proteína de transporte de fosfolípidos (PLTP). Sin embargo, estas características permiten la ampliación de la utilidad potencial de moléculas miméticas de ApoA-I. Este enfoque enteramente novedoso de ver la función mimética de ApoA-I, posibilitará el uso de pequeñas moléculas derivadas de péptido o aminoácido, las cuales se divulgan aquí, para facilitar el RCT directo (vía la ruta HDL), así como el RCT indirecto (es decir, para interceptar y eliminar las LDLs de la circulación, redirigiendo su flujo al hígado). Para ser

87

capaces de mejorar el RCT indirecto, los mediadores moleculares de las incorporaciones preferidas serán preferiblemente capaces de asociarse con fosfolípidos y unirse al hígado (es decir, servir como ligando para sitios de unión de lipoproteína hepática).

[0053] Por lo tanto, una meta de los esfuerzos de investigación, que condujeron a incorporaciones preferidas, fue identificar, diseñar y sintetizar los mediadores cortos y estables de molécula pequeña de RCT, que exhiben conformación de unión lipídica preferencial, aumentan el flujo de colesterol al hígado facilitando el transporte inverso de colesterol directo y/o indirecto, mejoran el perfil de lipoproteína en el plasma y, posteriormente, previenen la evolución o/y promueven la regresión de lesiones ateroscleróticas.

[0054] Los mediadores de RCT de las incorporaciones preferidas pueden prepararse en formas farmacéuticas estables a granel o unitarias, por ejemplo, productos liofilizados, que pueden reconstituirse antes de uso *in vivo* o reformularse. Incorporaciones preferidas de la invención incluyen las formulaciones farmacéuticas y el uso de tales preparaciones en el tratamiento de hiperlipidemia, hipercolesterolemia, cardiopatía coronaria, aterosclerosis, diabetes, obesidad, enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple, afecciones relacionadas con hiperlipidemia, tales como inflamación, y otros trastornos tales como endotoxemia causante del choque séptico.

[0055] Las incorporaciones preferidas se ilustran por ejemplos prácticos que demuestran que los mediadores de RCT de las incorporaciones preferidas se asocian con el componente HDL y LDL del plasma, y pueden aumentar la concentración de HDL y partículas pre- β -HDL, y reducir los niveles en el plasma de LDL. Por lo tanto, promueven el RCT directo e indirecto. Los mediadores de RCT incrementan la acumulación de colesterol mediada por LDL humana en hepatocitos humanos (células HepG2). Los mediadores de RCT son también eficaces en activar PLTP y, por consiguiente, promueven la formación de partículas pre- β -HDL. El incremento de colesterol HDL sirvió como prueba evidente

de la participación de LCAT (la activación de LCAT no se evidenció directamente (*in vitro*)) en el RCT. El uso de los mediadores de RCT de las incorporaciones preferidas *in vivo* en modelos con animales resulta en un aumento de la concentración de HDL en el suero.

[0056] Las incorporaciones preferidas se divulgan con más detalle en las siguientes subsecciones, las cuales describen la composición y estructura de los mediadores de RCT, incluidos andamiajes lipófilos derivados de inhibidores de HMG CoA reductasa, inclusive versiones protegidas, versiones semi-desnudas, y sus versiones desnudas; caracterización estructural y funcional; métodos de preparación de formulaciones farmacéuticas a granel y unitarias; y métodos de empleo.

Estructura y Función del Mediador

[0057] En algunas incorporaciones preferidas, los mediadores de RCT son generalmente péptidos, o sus análogos, que imitan la actividad de ApoA-I. En algunas incorporaciones, por lo menos un ligamiento de amida en el péptido se reemplaza con una amida sustituida, un isómero de una amida o un mimético de una amida. Adicionalmente, uno o más ligamientos de amida pueden reemplazarse con fracciones miméticas de péptido o miméticas de amida, que no interfieren significativamente la estructura o actividad de los péptidos. Fracciones miméticas apropiadas de amida se describen, por ejemplo, en Olson *et al.*, 1993, *J. Med. Chem.* 36:3039-3049.

[0058] Tal como se emplea en esta solicitud, las abreviaturas de los aminoácidos L-enantioméricos genéticamente codificados son convencionales y son las siguientes: Los aminoácidos D se designan por minúsculas, por ejemplo D-alanina = a, etc.

2089

Tabla 1

Aminoácidos	Símbolo de Una Letra	Abreviatura Común
Alanina	A	Ala
Arginina	R	Arg
Asparagina	N	Asn
Ácido Aspártico	D	Asp
Cisteína	C	Cys
Glutamina	Q	Gln
Ácido Glutámico	E	Glu
Glicina	G	Gly
Histidina	H	His
Isoleucina	I	Ile
Leucina	L	Leu
Lisina	K	Lys
Fenilalanina	F	Phe
Proline	P	Pro
Serina	S	Ser
Threonina	T	Thr
Triptófano	W	Trp
Tirosina	Y	Tyr
Valina	V	Val

[0059] Ciertos residuos de aminoácido en los mediadores de RCT pueden reemplazarse con otros residuos de aminoácido sin afectar en forma significativamente nociva y, en muchos casos, incluso mejorando, la actividad de los péptidos. Por consiguiente, las incorporaciones preferidas también contemplan formas mutadas o alteradas de los mediadores de RCT, en donde por lo menos un residuo de aminoácido definido en la estructura se sustituye con otro residuo de aminoácido o su derivado y/o análogo. Se reconocerá que en incorporaciones preferidas, las sustituciones de aminoácido son conservadoras, es decir, el residuo de aminoácido

21 90

reemplazante tiene propiedades físicas y químicas que son similares al residuo de aminoácido que se está reemplazando.

[0060] Para efectos de determinar sustituciones de aminoácido conservadoras, los aminoácidos pueden clasificarse convenientemente en dos categorías principales — hidrófilos e hidrófobos — dependiendo de las características físico químicas de la cadena lateral de aminoácido. Estas dos categorías principales pueden clasificarse todavía en subcategorías, que definen más claramente las características de las cadenas laterales de aminoácido. Por ejemplo, la clase de aminoácidos hidrófilos puede subdividirse aún más en aminoácidos ácidos, básicos y polares. La clase de aminoácidos hidrófobos puede subdividirse aún más en aminoácidos no polares y aromáticos. Las definiciones de las diferentes categorías de aminoácidos que definen ApoA-I son las siguientes:

[0061] El término "aminoácido hidrófilo" se refiere a un aminoácido que exhibe una hidrofobicidad menor que cero, de acuerdo con la escala de hidrofobicidad de consenso normalizada de Eisenberg *et al.*, 1984, J. Mol. Biol. 179:125-142. Aminoácidos hidrófilos genéticamente codificados incluyen Thr (T), Ser (S), His (H), Glu (E), Asn (N), Gln (Q), Asp (D), Lys (K) y Arg (R).

[0062] El término "aminoácido hidrófobo" se refiere a un aminoácido que exhibe una hidrofobicidad mayor que cero, de acuerdo con la escala de hidrofobicidad de consenso normalizada de Eisenberg, 1984, J. Mol. Biol. 179:125-142. Aminoácidos hidrófobos genéticamente codificados incluyen Pro (P), Ile (I), Phe (F), Val (V), Leu (L), Trp (W), Met (M), Ala (A), Gly (G) y Tyr (Y).

[0063] El término "aminoácido ácido" se refiere a un aminoácido hidrófilo con un valor pK de cadena lateral menor que 7. Por lo general, los aminoácidos ácidos tienen cadenas laterales cargadas negativamente a pH fisiológico debido a la pérdida de un ión de hidrógeno. Aminoácidos ácidos genéticamente codificados incluyen Glu (E) y Asp (D).

[0064] El término "aminoácido básico" se refiere a un aminoácido hidrófilo con un valor pK de cadena lateral mayor que 7. Por lo general, los

aminoácidos básicos tienen cadenas laterales cargadas positivamente a pH fisiológico debido a la asociación con un ión de hidronio. Aminoácidos básicos genéticamente codificados incluyen His (H), Arg (R) and Lys (K).

[0065] El término "aminoácido polar" se refiere a un aminoácido hidrófilo con una cadena lateral que no está cargada a pH fisiológico, pero que tiene por lo menos un enlace en el cual el par de electrones compartidos en común por dos átomos se mantiene más estrechamente por uno de los átomos. Aminoácidos polares genéticamente codificados incluyen Asn (N), Gln (Q) Ser (S) y Thr (T).

[0066] El término "aminoácido no polar" se refiere a un aminoácido hidrófobo con una cadena lateral que no está cargada a pH fisiológico y que tiene enlaces en los cuales el par de electrones compartidos en común por dos átomos se mantiene por lo general en forma igual por cada uno de los dos átomos (es decir, la cadena lateral es no polar). Aminoácidos no polares genéticamente codificados incluyen Leu (L), Val (V), Ile (I), Met (M), Gly (G) y Ala (A).

[0067] El término "aminoácido aromático" se refiere a un aminoácido hidrófobo con una cadena lateral que tiene por lo menos un anillo aromático o heteroaromático. El anillo aromático o heteroaromático puede contener uno o más sustituyentes tales como — OH, — SH, — CN, — F, — Cl, — Br, — I, — NO₂, — NO, — NH₂, — NHR, — NRR, — C(O)R, — C(O)OH, — C(O)OR, — C(O)NH₂, — C(O)NHR, — C(O)NRR y similares, donde cada R es independientemente (C₁ - C₆) alquilo, (C₁ - C₆) alquilo sustituido, (C₁ - C₆) alquenilo, (C₁ - C₆) alquenilo sustituido, (C₁ - C₆) alquinilo, (C₁ - C₆) alquinilo sustituido, (C₅ - C₂₀) arilo, (C₅ - C₂₀) arilo sustituido, (C₆ - C₂₆) alquilarilo, (C₆ - C₂₆) alquilarilo sustituido, heteroarilo de 5-20 miembros, heteroarilo de 5-20 miembros sustituido, alquilheteroarilo de 6-26 miembros o alquilheteroarilo de 6-26 miembros sustituido. Aminoácidos aromáticos genéticamente codificados incluyen Phe (F), Tyr (Y) y Trp (W).

[0068] El término "aminoácido alifático" se refiere a un aminoácido hidrófobo que tiene una cadena lateral de hidrocarburo

92
27

alifático. Aminoácidos alifáticos genéticamente codificados incluyen Ala (A), Val (V), Leu (L) y Ile (I).

[0069] El residuo de aminoácido Cys (C) es inusual en el sentido de que puede formar puentes disulfuro con otros residuos Cys (C) u otros aminoácidos que contengan sulfanilo. La capacidad de los residuos Cys (C) (y otros aminoácidos con cadenas laterales que contengan — SH) de existir en un péptido ya sea en la forma — SH libre reducido o con puente disulfuro oxidado incide en si los residuos Cys (C) aportan carácter hidrófilo o hidrófobo neto a un péptido. Aunque Cys (C) exhibe una hidrofobicidad de 0.29 de acuerdo con la escala de consenso normalizada de Eisenberg (Eisenberg, 1984, más arriba), hay que entender que, para efectos de las incorporaciones preferidas, Cys (C) se cataloga como un aminoácido hidrófilo polar, a pesar de las clasificaciones generales ya definidas.

[0070] Tal como se observará por aquellas personas expertas en el arte, las categorías ya definidas no son mutuamente excluyentes. Por lo tanto, aminoácidos con cadenas laterales, que exhiban dos o más propiedades fisico-químicas, pueden incluirse en múltiples categorías. Por ejemplo, cadenas laterales de aminoácido que tengan fracciones aromáticas, sustituidas adicionalmente con sustituyentes polares, tales como Tyr (Y), pueden exhibir propiedades hidrófobas aromáticas y polares o hidrófilas y, por lo tanto, pueden incluirse en ambas categorías aromáticas y polares. La clasificación apropiada de cualquier aminoácido será evidente a aquellas personas expertas en el arte, especialmente a la luz de la divulgación detallada suministrada en esta solicitud.

[0071] Aunque las categorías ya definidas se han ejemplificado en términos de los aminoácidos genéticamente codificados, las sustituciones de aminoácido no necesitan limitarse, y en ciertas incorporaciones preferiblemente no se restringen, a los aminoácidos genéticamente codificados. En efecto, muchos de los mediadores preferidos de RCT contienen aminoácidos no codificados genéticamente. Por consiguiente, aparte de los aminoácidos genéticamente codificados de ocurrencia natural, residuos de aminoácido en los mediadores de RCT pueden sustituirse con

aminoácidos no codificados, de ocurrencia natural, y aminoácidos sintéticos.

[0072] Ciertos aminoácidos comúnmente encontrados, que proporcionan sustituciones útiles para los mediadores de RCT incluyen, pero no se limitan a, β -alanina (β -Ala) y otros omega-aminoácidos tales como ácido 3-aminopropiónico, ácido 2,3-diaminopropiónico (Dpr), ácido 4-aminobutírico, etc.; ácido α -aminoisobutírico (Aib); ácido ϵ -aminohexanoico (Aha); ácido δ -aminovalérico (Ava); N-metilglicina o sarcosina (MeGly); ornitina (Orn); citrulina (Cit); t-butilalanina (t-BuA); t-butilglicina (t-BuG); N-metilisoleucina (Melle); fenilglicina (Phg); ciclohexilalanina (Cha); norleucina (Nle); naftilalanina (Nal); 4-fenilfenilalanina, 4-clorofenilalanina (Phe(4-Cl)); 2-fluorofenilalanina (Phe(2-F)); 3-fluorofenilalanina (Phe(3-F)); 4-fluorofenilalanina (Phe(4-F)); penicilamina (Pen); ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico (Tic); β -2-tienilalanina (Thi); sulfóxido de metionina (MSO); homoarginina (hArg); N-acetil lisina (AcLys); ácido 2,4-diaminobutírico (Dbu); ácido 2,3-diaminobutírico (Dab); p-aminofenilalanina (Phe (pNH₂)); N-metil valina (MeVal); homocisteína (hCys), homofenilalanina (hPhe) y homoserina (hSer); hidroxiprolina (Hyp), homoprolina (hPro), aminoácidos N-metilados y peptoides (glicinas N-sustituidas).

[0073] Otros residuos de aminoácido, no mencionados específicamente en esta solicitud, pueden clasificarse fácilmente con base en sus propiedades físicas y químicas observadas, a la luz de las definiciones consignadas en esta solicitud.

[0074] Las clasificaciones de los aminoácidos genéticamente codificados y no codificados comunes, de acuerdo con las categorías ya definidas, se resumen en la siguiente Tabla 2. Hay que entender que la Tabla 2 es para efectos de ilustración únicamente y no pretende ser un listado exhaustivo de residuos y derivados de aminoácido, que puedan utilizarse para sustituir los mediadores de RCT descritos en esta solicitud.

94

**Tabla 2. CLASIFICACIONES DE AMINOÁCIDOS COMÚNMENTE
ENCONTRADOS**

Clasificación	Genéticamente Codificados	No Genéticamente Codificados
<u>Hidrófobos</u>		
Aromáticos	F, Y, W	Phg, Nal, Thi, Tic, Phe (4-Cl), Phe (2-F), Phe (3-F), Phe (4-F), hPhe
No Polares	L, V, I, M, G, A, P	t-BuA, t-BuG, Melle, Nle, MeVal, Cha, McGly, Aib
Alifáticos	A, V, L, I	b-Ala, Dpr, Aib, Aha, McGly, t-BuA, t-BuG, Melle, Cha, Nle, MeVal
<u>Hidrófilos</u>		
Ácidos	D, E	
Básicos	H, K, R	Dpr, Orn, hArg, Phe(p-NH ₂), Dbu, Dab
Polares	C, Q, N, S, T	Cit, AcLys, MSO, bAla, hSer
Rotura de Hélice	P, G	D-Pro y otros aminoácidos D (en péptidos L)

[0075] Otros residuos de aminoácido, no mencionados de manera específica en esta solicitud, pueden catalogarse fácilmente basados en sus propiedades físicas y químicas observadas, a la luz de las definiciones suministradas en esta solicitud.

[0076] Aunque en la mayoría de los casos, los aminoácidos de los mediadores de RCT se sustituirán con aminoácidos D-enantioméricos, las substituciones no se limitan a aminoácidos D-enantioméricos. Por consiguiente, incluidas también en la definición de formas "mutadas" o "alteradas" se encuentran aquellas situaciones donde un D-aminoácido se reemplaza con un L-aminoácido idéntico (por ejemplo, D-Arg→L-Arg) o con un L-aminoácido de la misma categoría o subcategoría (por ejemplo, D-Arg D-Lys), y viceversa. Los mediadores pueden componerse

95
c/p

ventajosamente de por lo menos un aminoácido D-enantiomérico. Se cree que los mediadores que contienen tales D-aminoácidos son más estables a degradación en la cavidad bucal, intestino o suero que las moléculas compuestas exclusivamente de L-aminoácidos.

Conectores

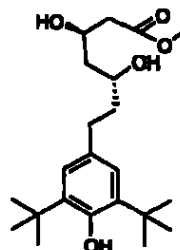
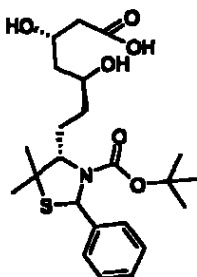
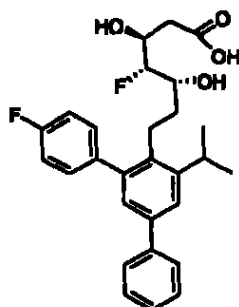
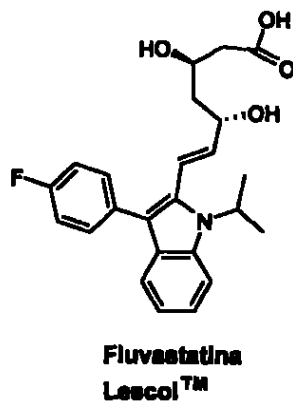
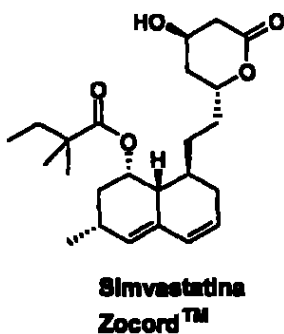
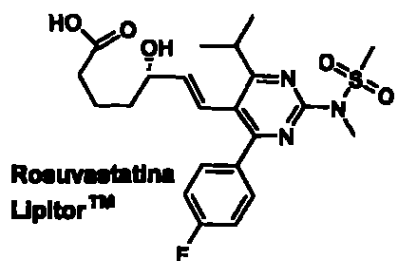
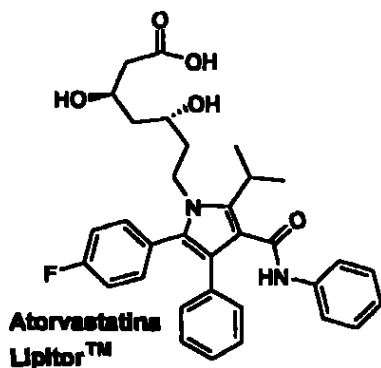
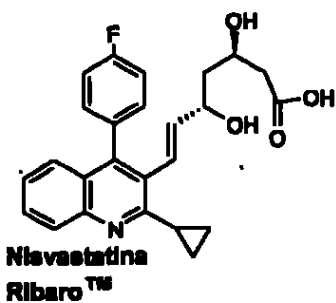
[0077] Los mediadores de RCT pueden conectarse o enlazarse en una manera de cabeza-a-cola (es decir, N-término a C-término), una manera cabeza-a-cabeza, (es decir, N-término a N-término), una manera cola-a-cola (es decir, C-término a C-término), o combinaciones de las mismas. El conector puede ser cualquier molécula bifuncional, capaz de unir covalentemente dos péptidos uno con otro. Por consiguiente, conectores apropiados son moléculas bifuncionales, en las cuales los grupos funcionales son susceptibles de unirse covalentemente al N-término y/o C-término de un péptido. Grupos funcionales apropiados para unión al N- o C-término de péptidos son bien conocidos en el arte, al igual que químicas adecuadas para efectuar tal formación de enlace covalente.

[0078] Conectores de suficiente longitud y flexibilidad incluyen, pero no se limitan a, Pro (P), Gly (G), Cys-Cys, Gly-Gly, $H_2N-(CH_2)_n-COOH$, donde n es 1 a 12, preferiblemente 4 a 6; H_2N -aril- $COOH$ y carbohidratos. No obstante, en algunas incorporaciones, no se usan en absolutos conectores separados *per se*. En su lugar, las fracciones ácidas, lipófilas y básicas son todas parte de una sola molécula.

Andamiaje de los Inhibidores de HMG CoA Reductasa

[0079] En incorporaciones preferidas, el andamiaje hidrófobo o aromático se basa en un inhibidor de HMG CoA reductasa. Ejemplos de inhibidores de HMG CoA reductasa se muestran a continuación:

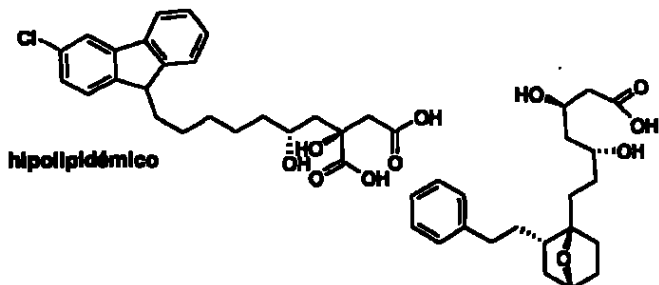
96



Inhibidor de HMG-CoA Reductasa

Inhibidor de HMG-CoA Reductasa

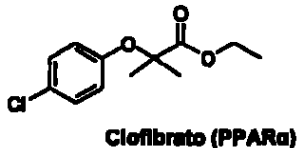
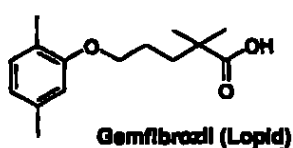
Inhibidor de HMG-CoA Reductasa



Inhibidor de HMG-CoA Reductasa

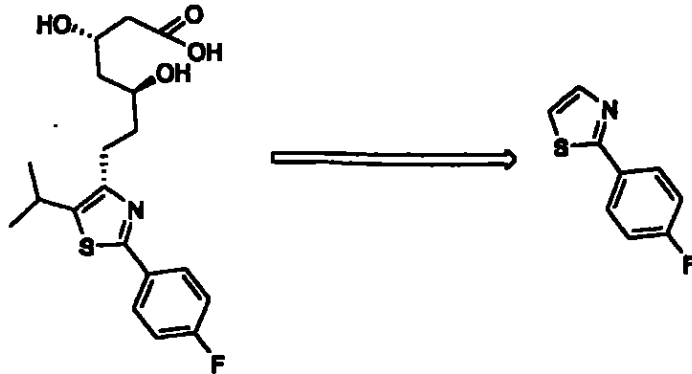
Inhibidor de HMG-CoA Reductasa

Fibratos agentes hipolipidémicos activan PPARα

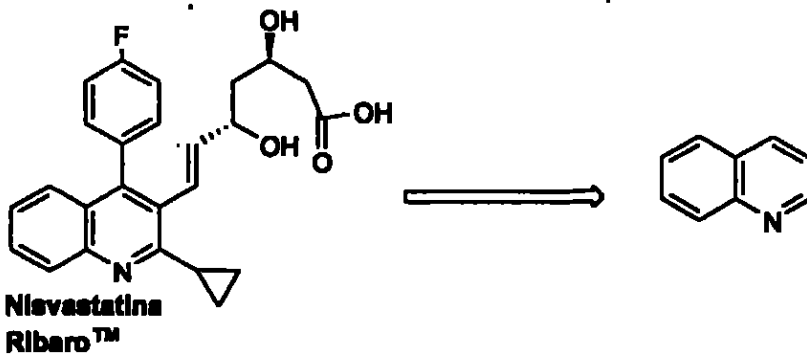


97

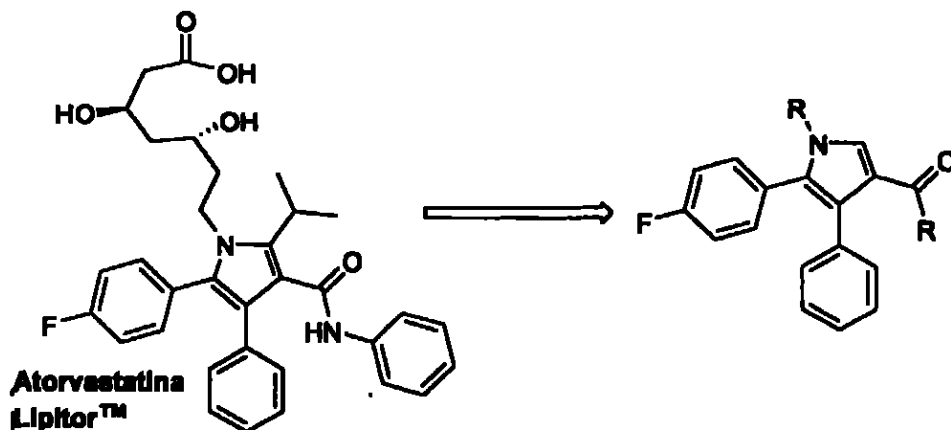
[0080] En consecuencia, ejemplos de andamiajes lipófilos o aromáticos, basados en inhibidores de HMG CoA reductasa, se muestran a continuación junto con el inhibidor original de HMG CoA reductasa:



Inhibidor de HMG-CoA Reductasa

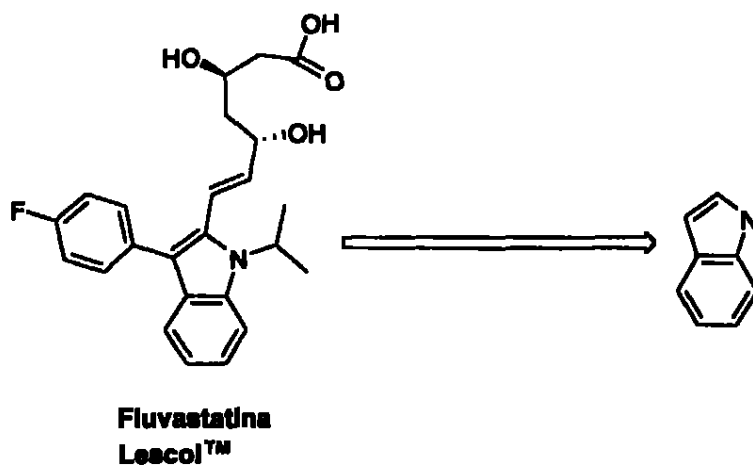
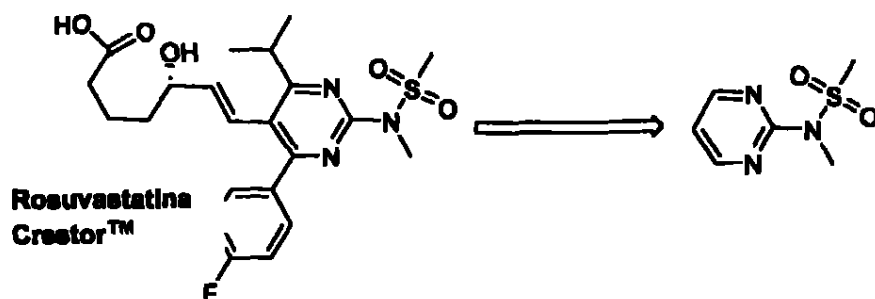


Niasstatina
Ribaro™



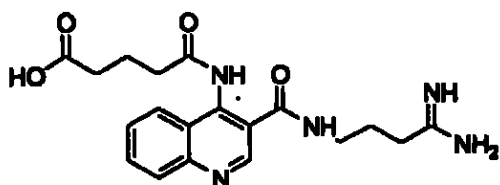
Atorvastatina
Lipitor™

98

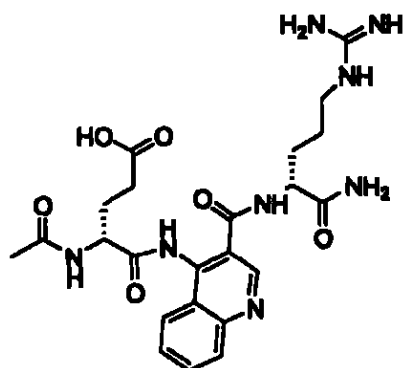
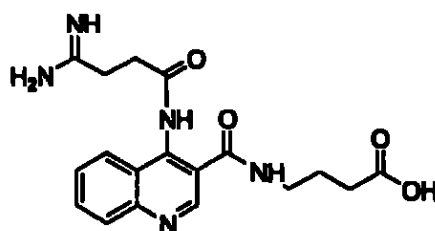
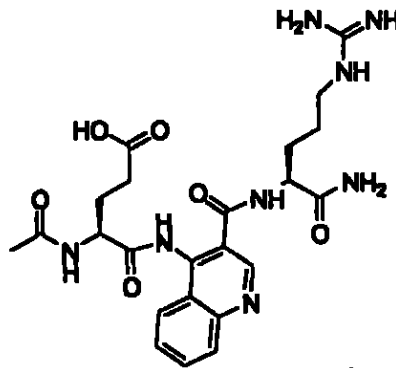
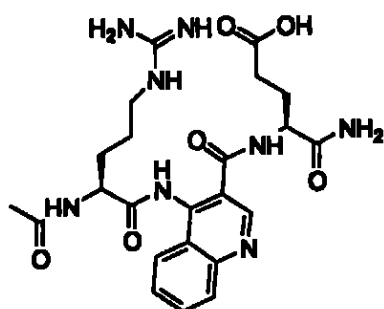
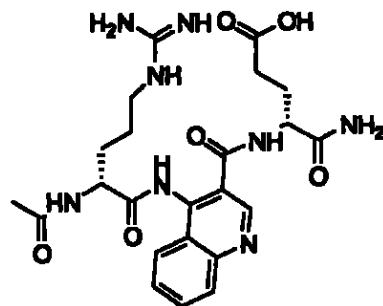


[0081] Ejemplos de mediadores de RCT, que comprenden un andamiaje lipófilo basado en un inhibidor de HMG CoA reductasa, tal como nisvastatina, se muestran a continuación.

99



Ácido Glutárico-Quinolna-Agmatina

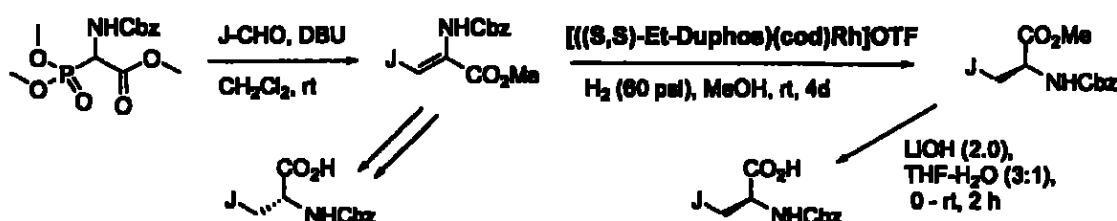
AcE-Quin-RNH₂AcE-Quin-RNH₂AcR-Quin-eNH₂AcR-Quin-ENH₂

[0082] Tal como se ya se especificó, preferiblemente un andamiaje es una mímica de una porción de un inhibidor de HMG CoA reductasa, que es lipófilo o aromático. Los inhibidores de HMG CoA reductasa comparten un grupo hidrófobo, rígido, que se conecta a una fracción similar a HMG. Los inhibidores de HMG CoA reductasa son inhibidores competitivos de HMGR con respecto a la unión de la HMG CoA de sustrato. Los grupos hidrófobos rígidos, estructuralmente diversos, de los inhibidores de HMG CoA reductasa se alojan en una ranura no polar, de baja profundidad, de HMGR.

10/100

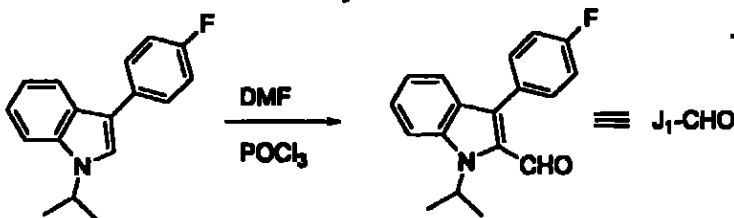
[0083] Los derivados de alanina sustituida de andamiaje de inhibidor de HMG CoA reductasa son reemplazos del aminoácido central (X_2) en los modelos moleculares X_1 - X_2 - X_3 , X_1 - X_2 - Y_3 , Y_1 - X_2 - X_3 o Y_1 - X_2 - Y_3 ; aunque las moléculas pueden volverse a disponer en cualquier orden. Los derivados de aminoácido pueden prepararse de los arilaldehídos correspondientes (J -CHO, donde J es cualquiera de los andamiajes de estatina), como se muestra a continuación. Los derivados de aminoácido pueden prepararse en forma enantioméricamente pura (D o L, dependiendo del catalizador quiral) o en la racémica.

Esquema: Síntesis general de los derivados de alanina atados a andamiajes de estatina

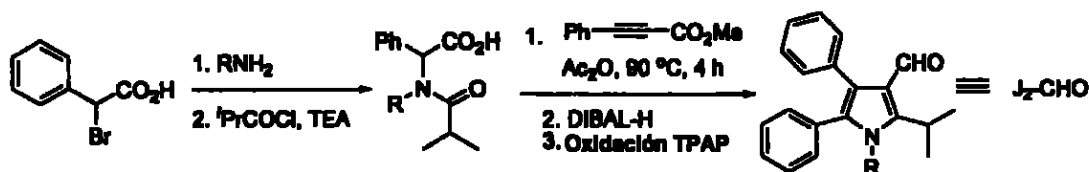


[0084] Los arilaldehídos ya mencionados (J_n -CHO, $n = 1-4$) pueden prepararse de acuerdo con los siguientes esquemas.

Esquema: Síntesis del aldehído andamiaje de Fluvastatina

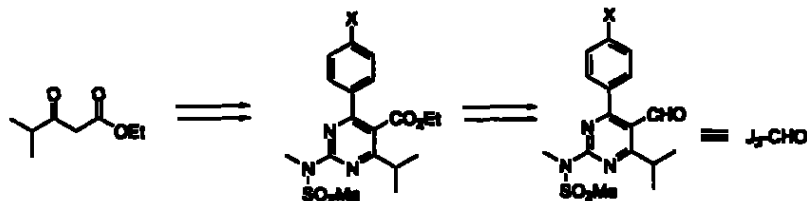


Esquema: Síntesis del aldehído andamiaje de Atorvastatina (donde R es un grupo alquilo o alquilsulfonilo)

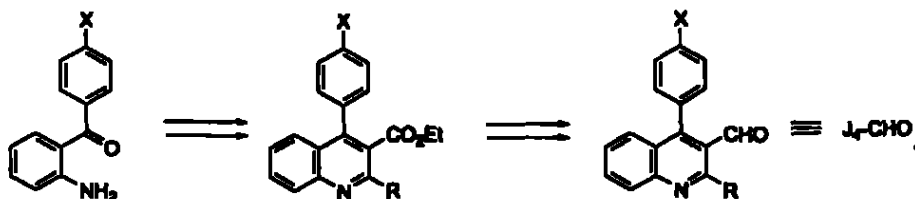


Esquema: Síntesis del aldehído andamiaje de Rosuvastatina (donde X es hidrógeno o halógeno)

101

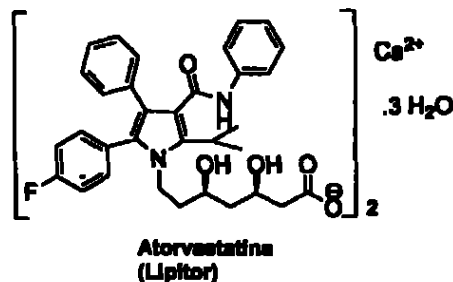


Esquema: Síntesis del aldehído andamiaje de Nisvastatina (donde X es hidrógeno o halógeno y R es alquilo)



[0085] Estos derivados de alanina sustituida con estatina pueden acoplarse entonces con otros derivados de aminoácido (por ejemplo, Glu o Arg). Además, estos derivados pueden desnudarse en todo o en parte, como se describe en el caso de EFR o efr.

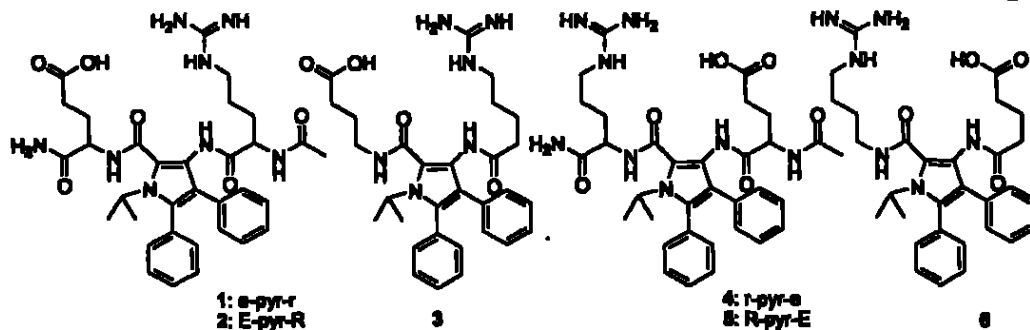
[0086] Una incorporación de los mediadores de RCT usando un andamiaje de HMG CoA reductasa se basa en atorvastatina.



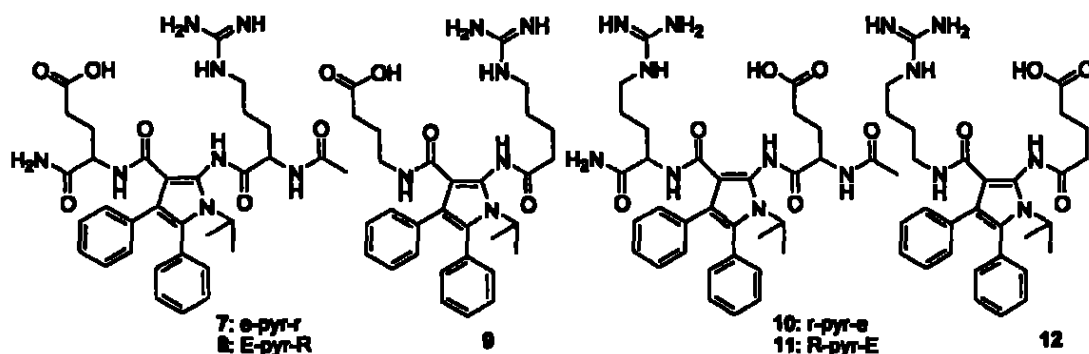
[0087] Los derivados de D- y L-aminoácido basados en atorvastatina pueden sintetizarse. Estos derivados pueden además desnudarse en todo o en parte. El reemplazo bioisostérico puede realizarse en uno de los residuos de aminoácido o ambos a la vez. La fracción de ácido glutámico puede reemplazarse, por ejemplo, por ácido 3-amino benzoico o ácido paraminobenzoico (PABA). Estos derivados se muestran en los siguientes cuadros y esquemas.

A: De ácido 3-amino-pirrol-2-carboxílico

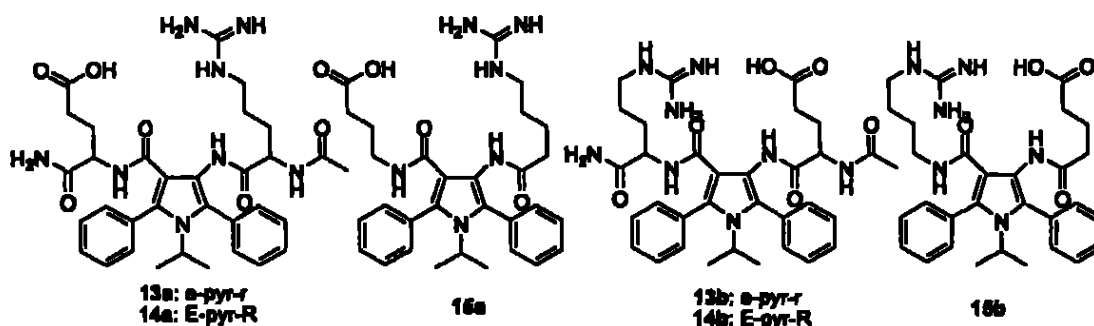
102



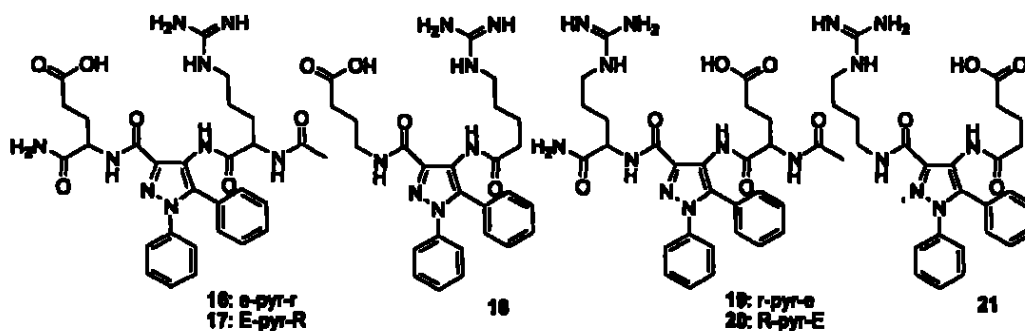
B: De ácido 2-amino-pirrol-3-carboxílico



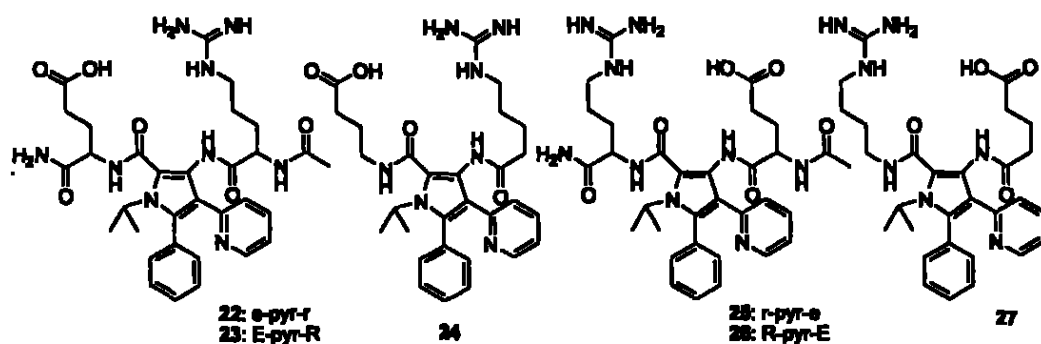
C: De ácido 4-amino-pirrol-3-carboxílico



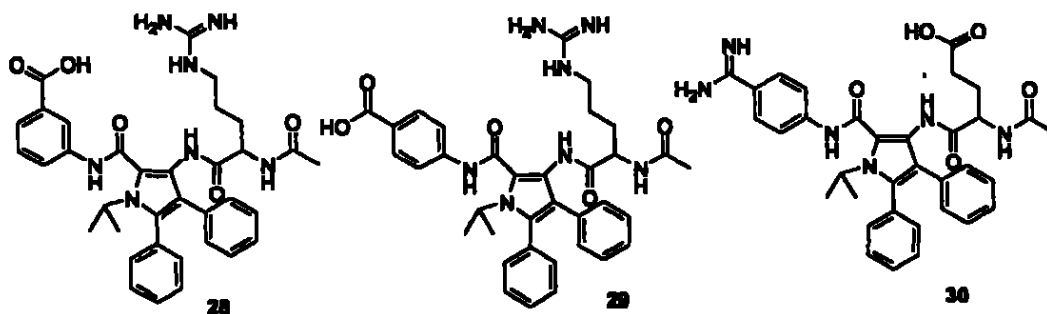
D: De ácido 4-amino-razol-3-carboxílico



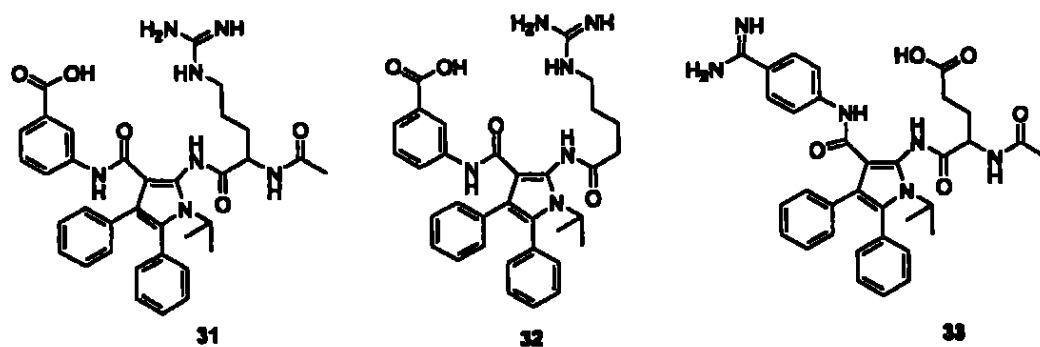
E: De ácido 3-amino-pirrol-2-carboxílico (anillo piridina para fenilo)



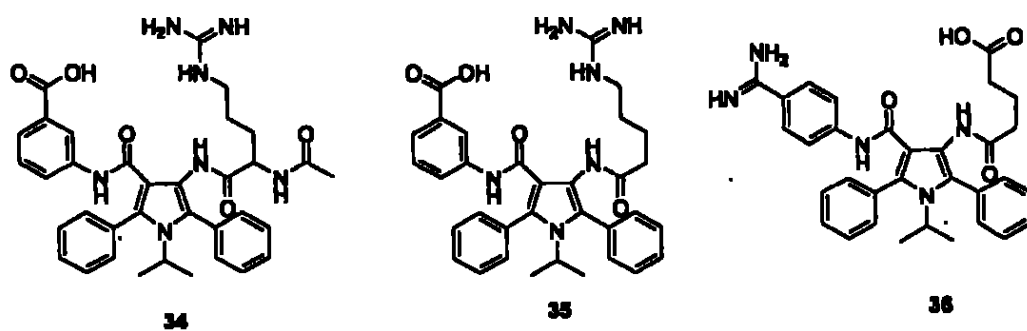
F: De ácido 3-amino-pirrol-2-carboxílico (Bioisósteros)



G: De ácido 2-amino-pirrol-3-carboxílico (Bioisósteros)

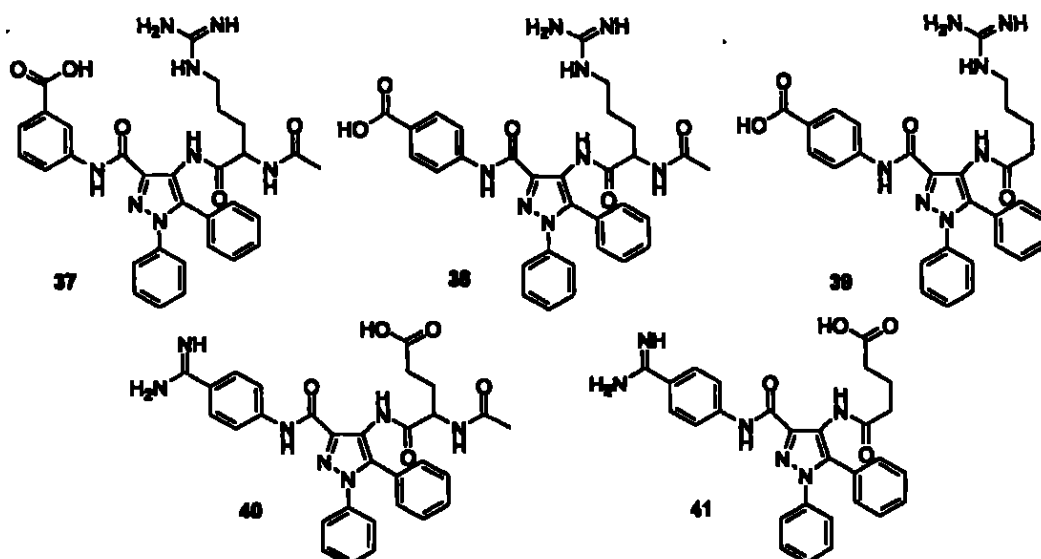


H: De ácido 4-amino-pirrol-3-carboxílico (Bioisósteros)

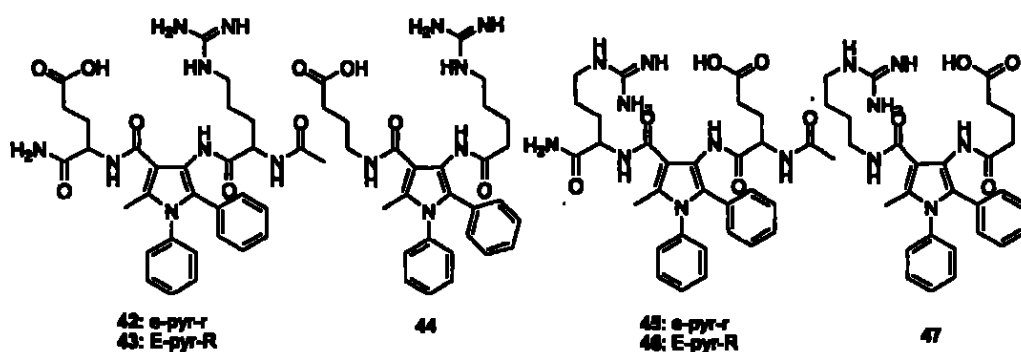


I: De ácido 4-amino-pirazol-3-carboxílico (Bioisósteros)

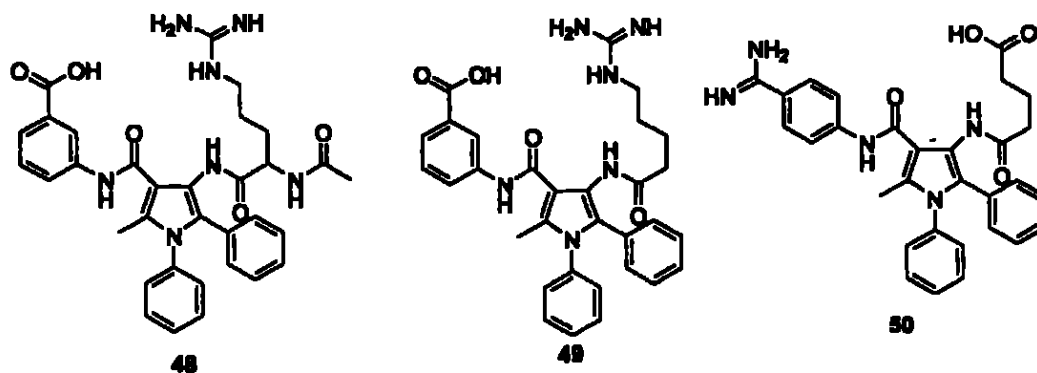
104



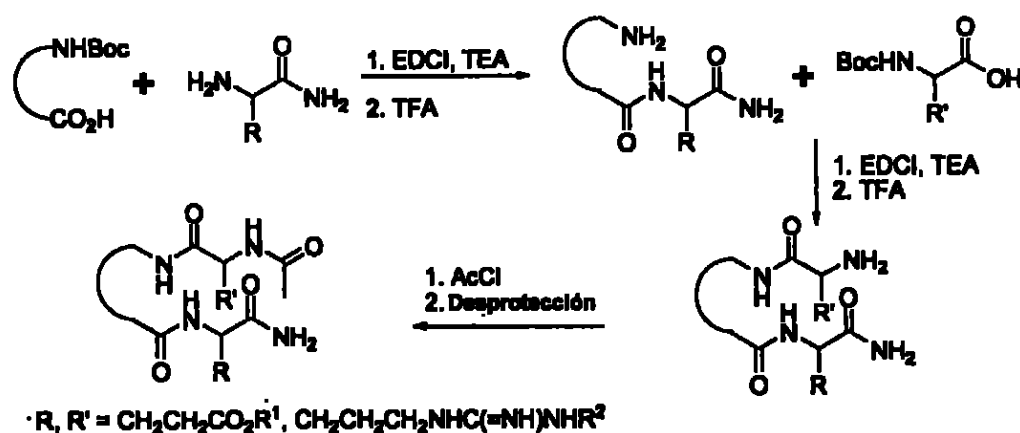
J: Incorporaciones Alternativas



K: Incorporaciones alternativas que comprenden bioisósteros

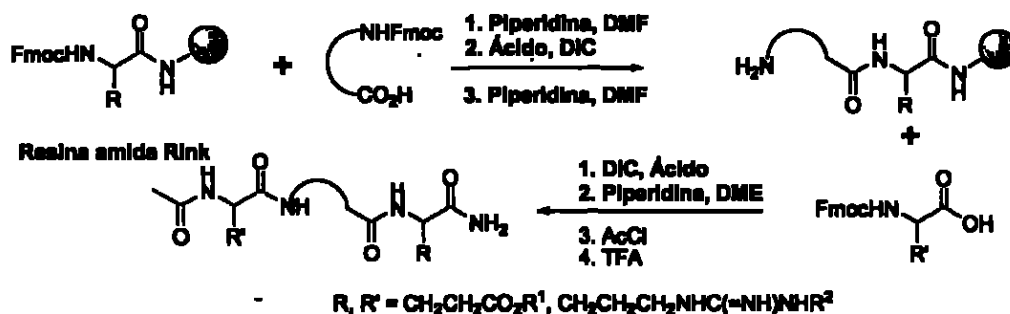


Esquema - 1: Ruta General para la Síntesis en Fase Solución



[0088] La ruta general para los aminoácidos N-Boc protegidos en la síntesis peptídica fase solución se muestra en Esquema 1. Primeramente, se hace reaccionar el ácido con la amina bajo condiciones estándar (por ejemplo, EDCI, HOBT, Et₃N) y el producto resultante se desprotege (TFA) para obtener la amina correspondiente. Ésta última se acopla con otro aminoácido apropiadamente protegido bajo las condiciones estándar. El N-Boc se retira (TFA) y se tapona con cloruro ácido (por ejemplo, AcCl) y los demás grupos protectores se retiran para obtener el producto deseado.

Esquema - 2: Ruta General para la Síntesis en Fase Sólida

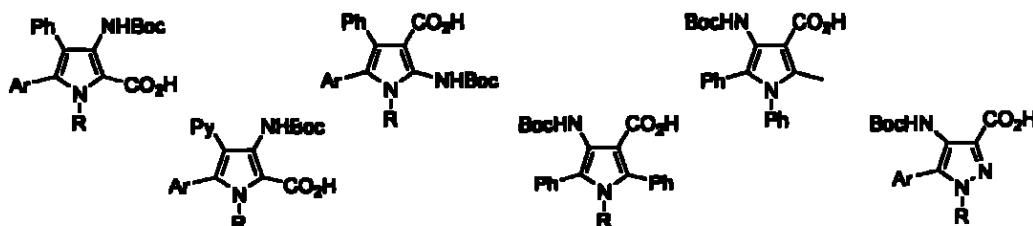


[0089] La ruta general para los aminoácidos N-Boc protegidos en síntesis peptídica fase sólida se muestra en Esquema 2. Primeramente, el N-Fmoc de la resina (Rink) se desprotege (piperidina, DMF) y luego se acopla con un aminoácido N-Fmoc protegido bajo condiciones estándar (por ejemplo, DIC, HOBT, Et₃N) y el producto resultante se desprotege, como ya se indicó, para obtener la amidoamina ligada a resina. Ésta última se acopla con otro aminoácido apropiadamente protegido bajo las condiciones estándar y se repite una vez más. El N-Fmoc se retira

~~106~~ 106

(piperidina, DMF) y se tapona con cloruro ácido (por ejemplo, AcCl) y los demás grupos protectores se retiran para obtener el producto deseado.

Los Intermedios de Andamiaje:



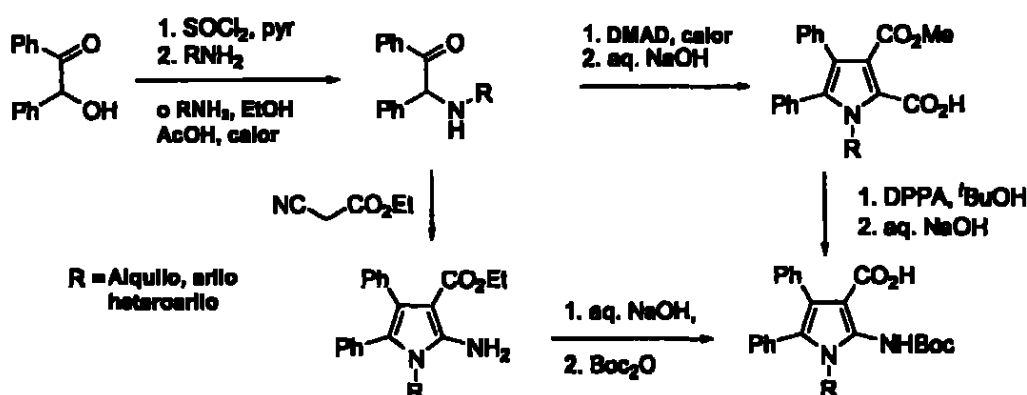
(donde Ar = arilo, heteroarilo; R = alquilo, arilo, heteroarilo)

[0090] Los reemplazos de andamiaje se muestran arriba. No obstante, los derivados N-Fmoc & N-Cbz no se muestran, preparados también. Las síntesis de los últimos intermedios no se describen en los esquemas, pero se preparan de una manera similar (usando FmocCl) como sus derivados N-Boc. Los siguientes esquemas describen la síntesis de estos valiosos intermedios.

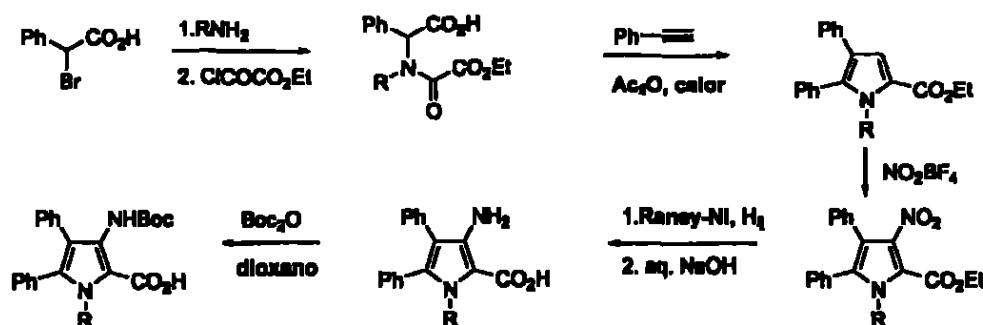
[0091] La síntesis de los derivados de ácido 2-amino-pirrol-3-carboxílico se muestra en Esquema 3. Benjuí se hace reaccionar con SOCl_2 al cloruro correspondiente y luego se hace reaccionar con amina la alfa-ceto amina. Alternativamente, ésta última se prepara directamente de benjuí, cuando se calienta la amina en presencia de un ácido más débil (por ejemplo, AcOH) en disolvente alcohol. La amina no es un monómero, más bien, es de índole oligomérica (de NMR de masa y protones). La alfa-ceto amina se hace reaccionar con dimetil acetilendicarboxilato (DMAD) en MeOH al producto pirrol en excelente rendimiento. El éster en la posición 2 se hidroliza selectivamente con 1 equivalente de NaOH acuoso en MeOH y se acidifica con HCl diluido. El ácido resultante se somete bajo rearrreglo de Curtius [difetil fosforil azida (DPPA), *tert*-BuOH, calor). El éster N-Boc protegido se hidroliza (NaOH acuoso, calor, luego HCl diluido) al ácido correspondiente.

[0092] Alternativamente, la alfa-ceto amina se hace reaccionar con etil cianoacetato al 2-amino-pirrol (Esquema - 3) y éste último se hidroliza y se N-Boc protege bajo condiciones estándar.

107

Esquema - 3: Síntesis del derivado de ácido 2-amino-pirrol-3-carboxílico

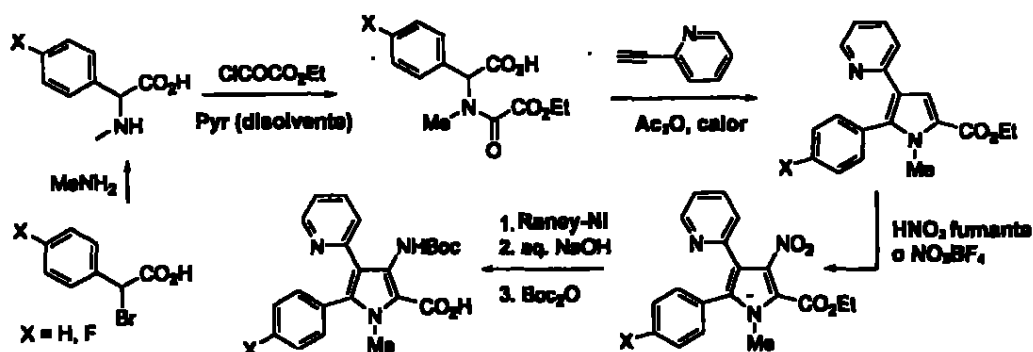
[0093] Las síntesis de derivados de ácido 3-amino-pirrol-2-carboxílico se muestran en Esquema 4 y Esquema 5. La amina se hace reaccionar con ácido alfa-bromo-fenil acético, seguido por tratamiento con cloruro ácido. El aminoácido resultante se trata con un dipolarófilo (aril-acetileno) en anhídrido acético al pirrol. Éste último se nitra sucesivamente (HNO_3 o sal de nitronio), se reduce (níquel de Raney, H_2 , EtOH/THF), se hidroliza (NaOH acuoso, calor) y se N-protege (Boc_2O , dioxano) al producto deseado (Esquema 4).

Esquema - 4: Síntesis del derivado de ácido 3-amino-pirrol-2-carboxílico

[0094] Esquema 5 muestra la síntesis del núcleo pirrol amarrado con hereroarilo. El amido-ácido se prepara de manera similar como se indicó anteriormente (Esquema 4). El núcleo pirrol se nitra (HNO_3 de sal de nitronio). Éste último se reduce entonces, se hidroliza, se N-Boc protege como se indica en Esquema 5.

Esquema - 5: Síntesis del derivado de ácido 4-(2-piridil)-3-amino-pirrol-2-carboxílico

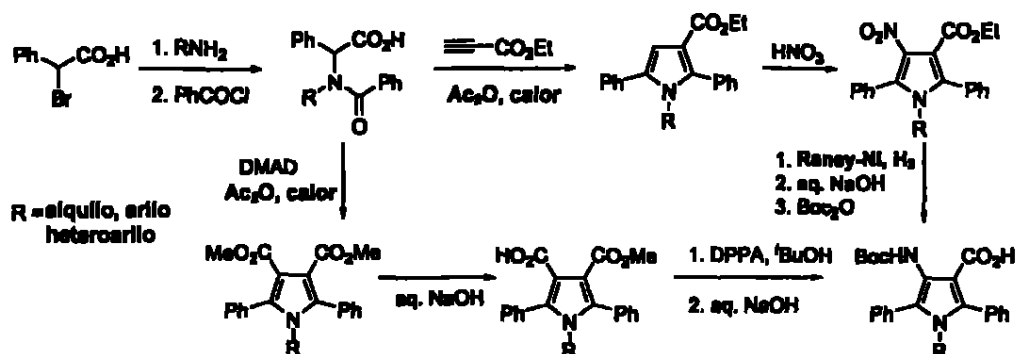
108



[0095] Para la síntesis de los derivados de ácido 4-amino-pirrol-3-carboxílico, se presentan dos rutas, como se muestra en Esquema 5 y Esquema 6. El alfa-aminoácido se hace reaccionar con un cloruro ácido en piridina al compuesto N-acilo, el cual se calienta con dimetil acetilendicarboxilato (DMAD) en anhídrido acético al pirrol simétrico esperado. El diácido se hidroliza selectivamente (1.0 equivalente NaOH acuoso; HCl diluido) al monoácido. Éste último se trata con difenil fosforil azida (DPPA) [benceno, *tert*-BuOH, calor] y NaOH acuoso [calor; HCl diluido] al compuesto deseado (Esquema 6).

[0096] Alternativamente, el amido-ácido se hace reaccionar con propargil éster en anhídrido acético, seguido por nitración al nitro-ácido (Esquema 6). El grupo nitro se reduce entonces (níquel de Raney, H₂, EtOH/THF) a la amina, se hidroliza el éster (NaOH acuoso) y la amina se protege (Boc₂O, dioxano) de acuerdo con el Esquema 4.

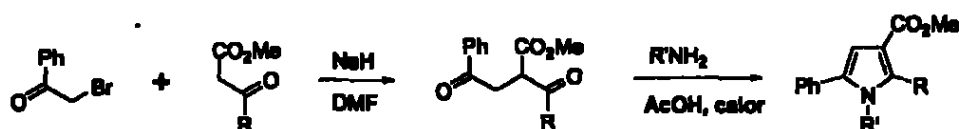
Esquema - 6: Síntesis del derivado de ácido 4-amino-pirrol-3-carboxílico



[0097] Un enfoque completamente diferente para la síntesis de derivados de ácido 4-amino-pirrol-3-carboxílico se bosqueja en el esquema

7. Primeramente, un beta-ceto éster se alquila en la posición alfa y el diceto éster resultante se trata con una amina en el pirrol-3-carboxilato. Éste último se convierte en el producto deseado como se muestra en Esquema 6.

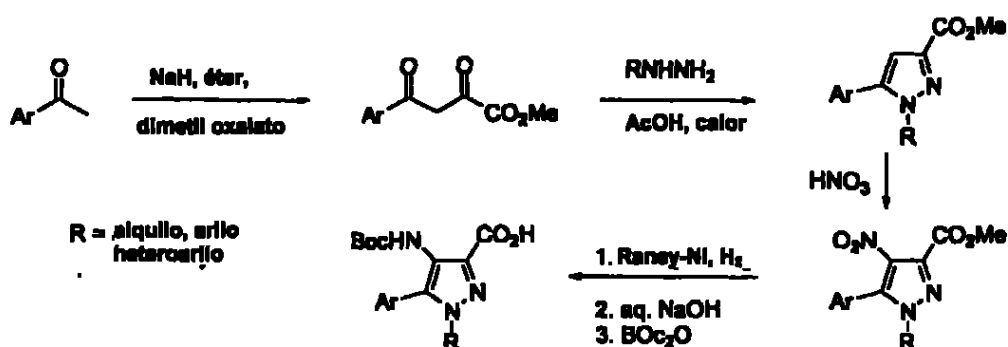
Esquema - 7: Síntesis del ácido 4-amino-pirrol-3-carboxílico (continuación)



R = alquilo, arilo; R' = arilo, alquilo

[0098] La síntesis del núcleo pirazol se describe en Esquema 8. En presencia de una base, se hace reaccionar aril cetona con éster de oxalato, seguido por acidificación al 1,3-diceto-compuesto. Éste último se hace reaccionar con una hidrazina sustituida al derivado pirazol-3-carboxilato. La nitración subsiguiente (HNO_3 o sal de nitronio), reducción (níquel de Raney, H_2), hidrólisis de éster (NaOH acuoso), y protección de amina (Boc_2O) llevan al compuesto deseado.

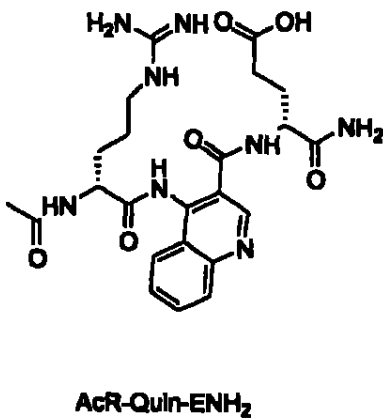
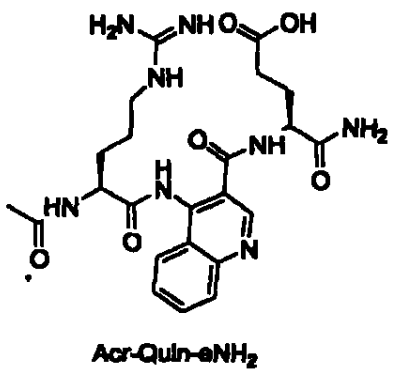
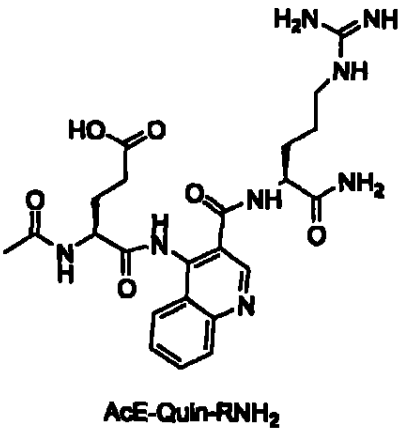
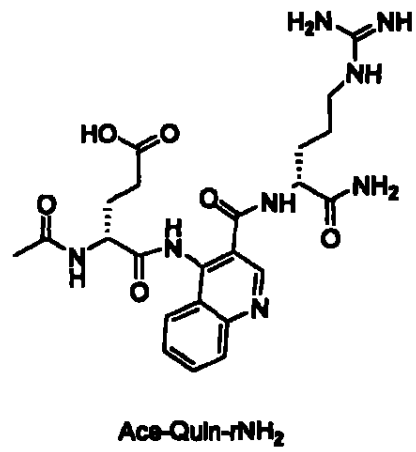
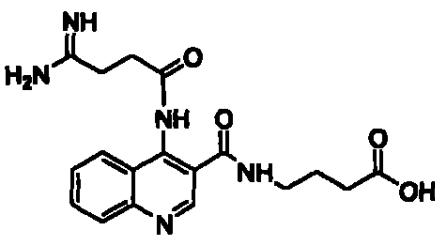
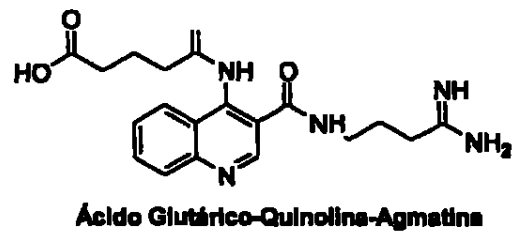
Esquema - 8: Síntesis del derivado de ácido 4-amino-pirazol-3-carboxílico

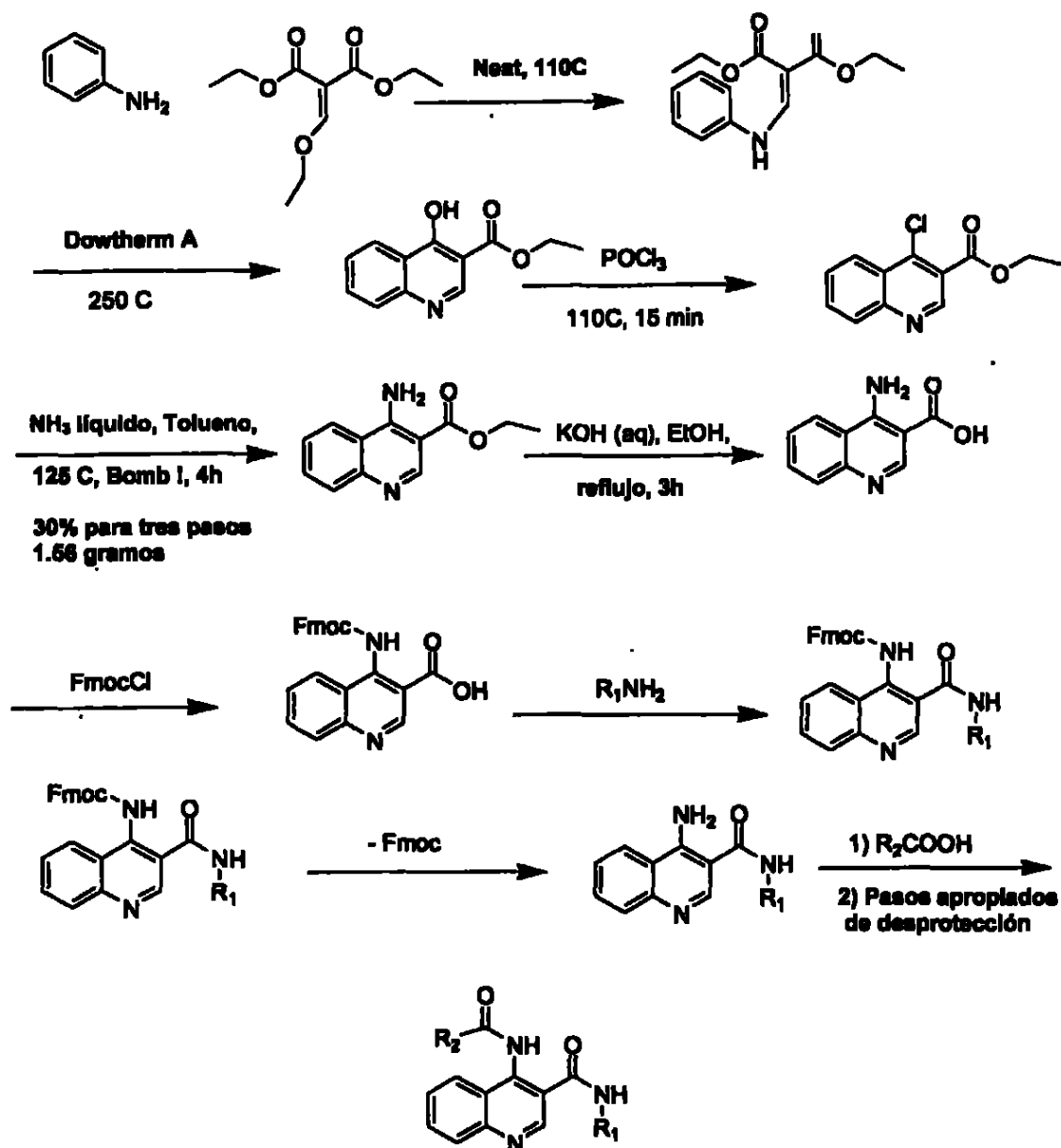


R = alquilo, arilo
heteroarilo

[0099] Otra incorporación de los mediadores de RCT usando un andamiaje de HMG CoA reductase basa en nisvastatina, como se muestra a continuación. Se muestra asimismo un esquema general para la síntesis de estos compuestos.

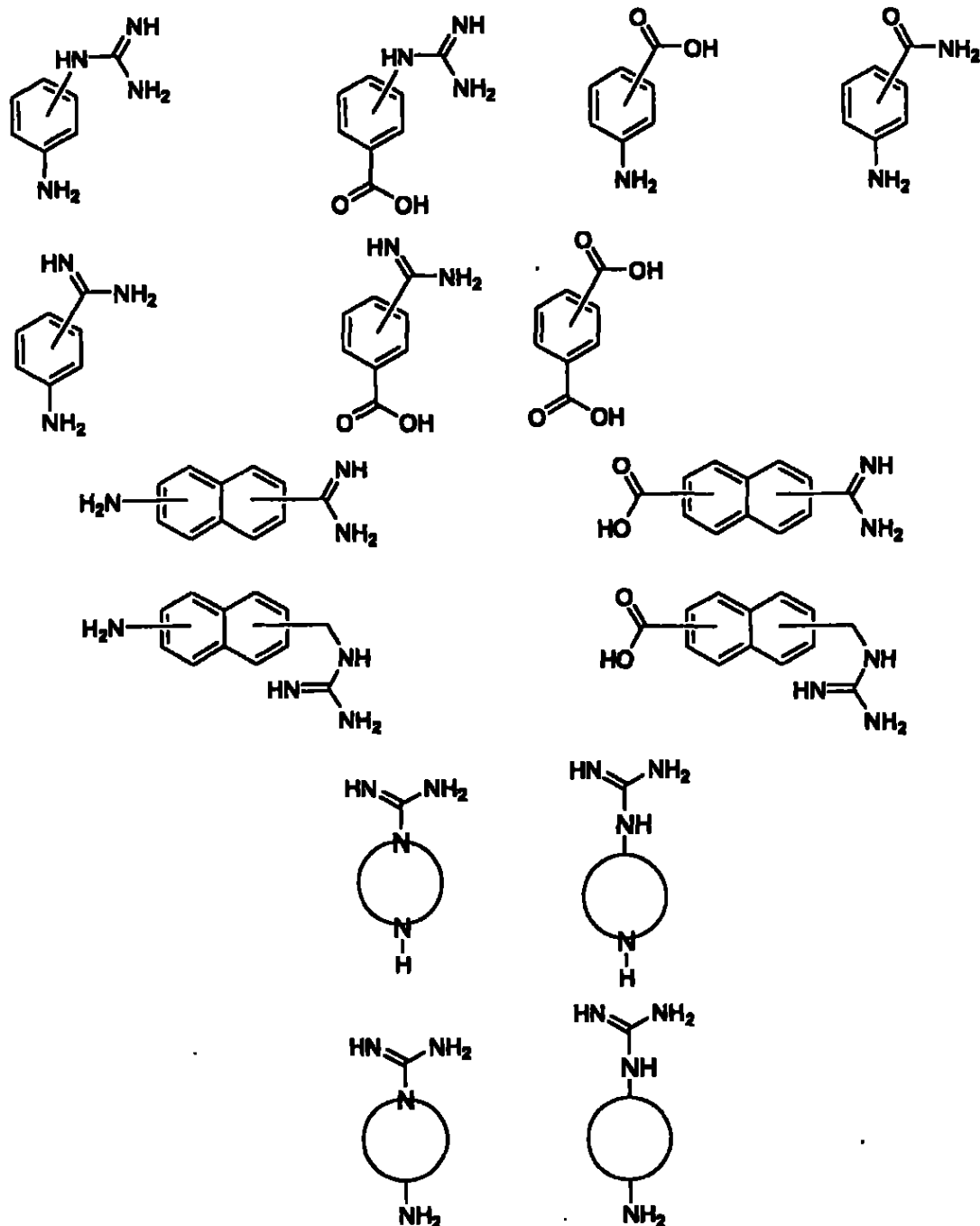
110





Bioisósteros Utilizados en las Estructuras de los Mediadores de RCT

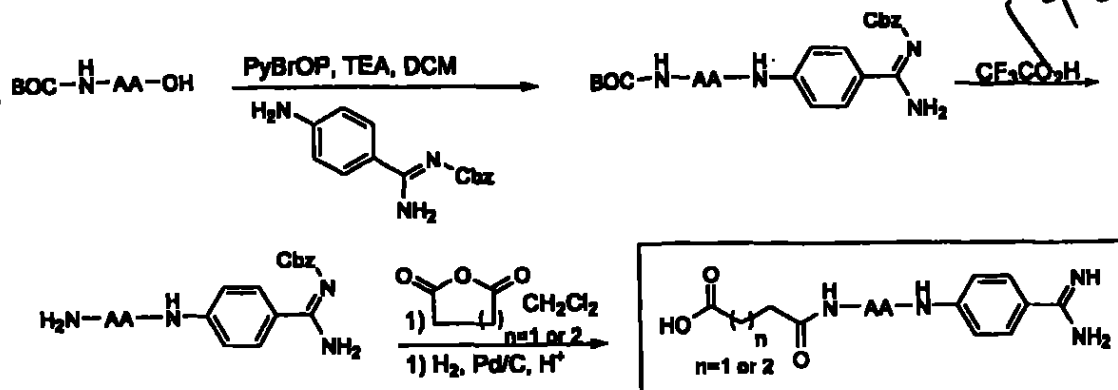
[0100] A continuación se muestran ejemplos de bioisósteros preferidos, que pueden usarse en mediadores de RCT preferidos. Bioisósteros que contienen un grupo guanidio o amidino sirven para sustituir un aminoácido, tal como arginina. Bioisósteros que contienen un ácido carboxílico sirven para sustituir un aminoácido, tal como glutamato. Cualquier otro biosótero puede servir para sustituir los aminoácidos básicos, arginina, lisina, o histidina, y se contemplan los aminoácidos ácidos, glutamato y aspartato. Los círculos representan estructuras cíclicas, incluidas estructuras aromáticas y no aromáticas.



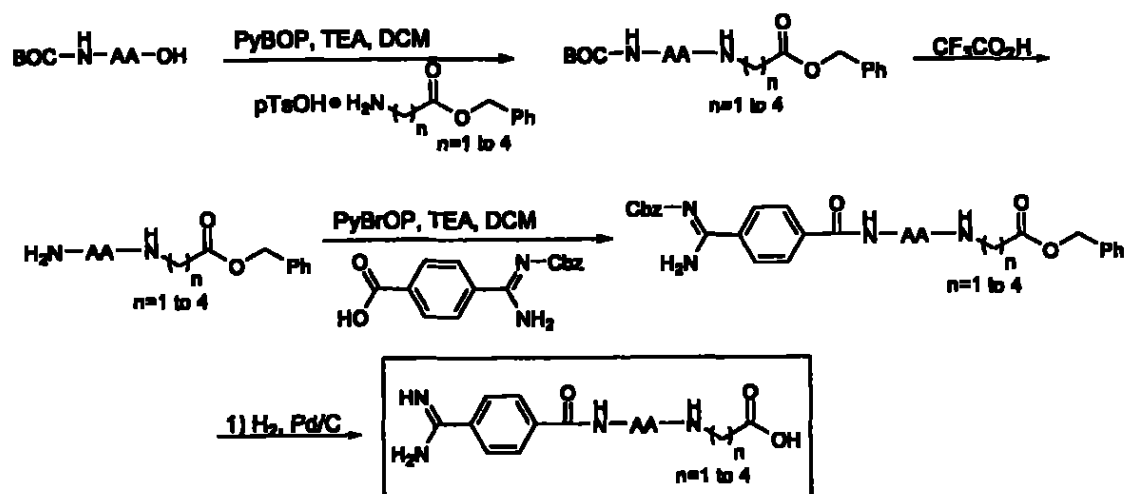
[0101] Los esquemas sintéticos que siguen muestran ejemplos de métodos que pueden emplearse para sintetizar mediadores de RCT que lleven bioisósteros. El término "AA" puede representar un andamiaje lipófilo en los esquemas.

Esquema 9

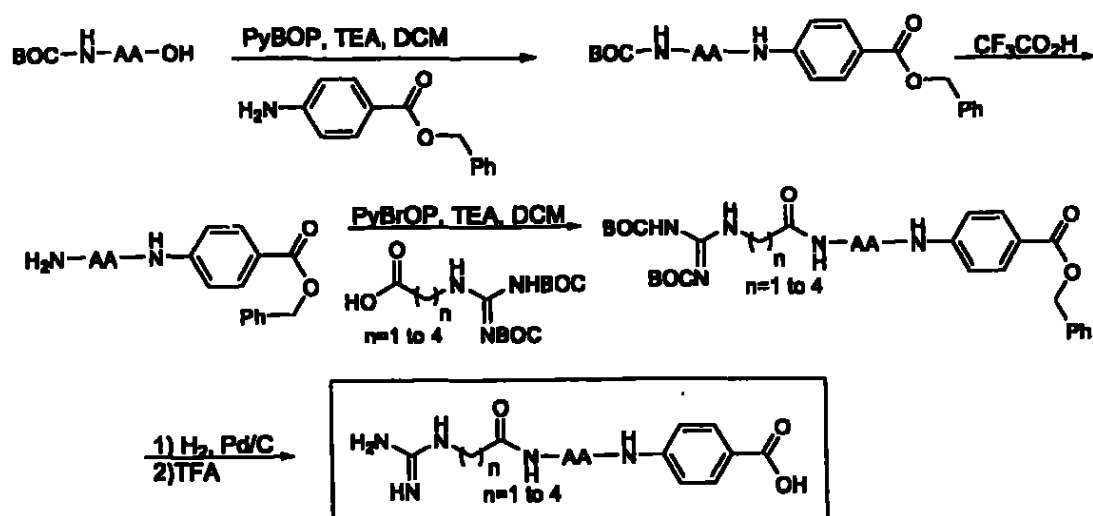
113



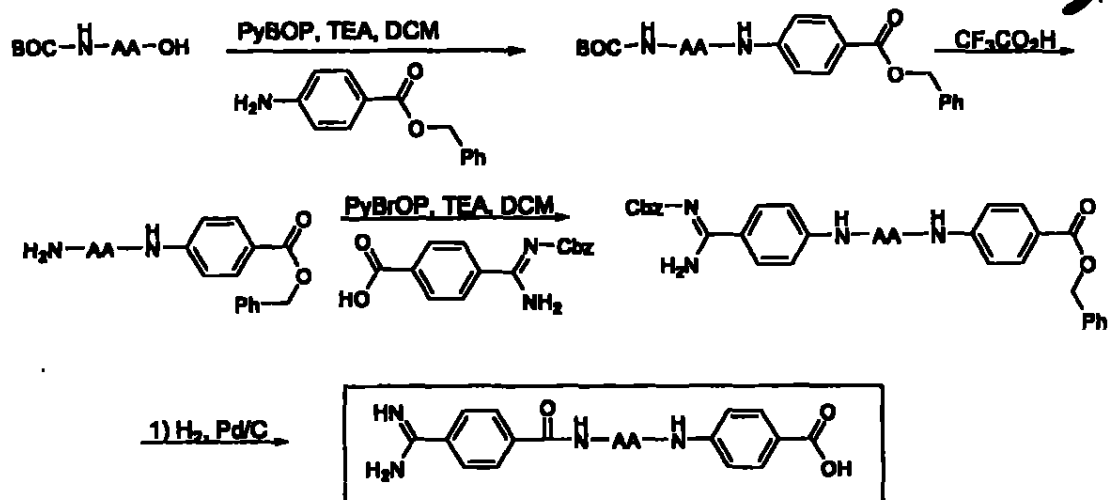
Esquema 10



Esquema 11

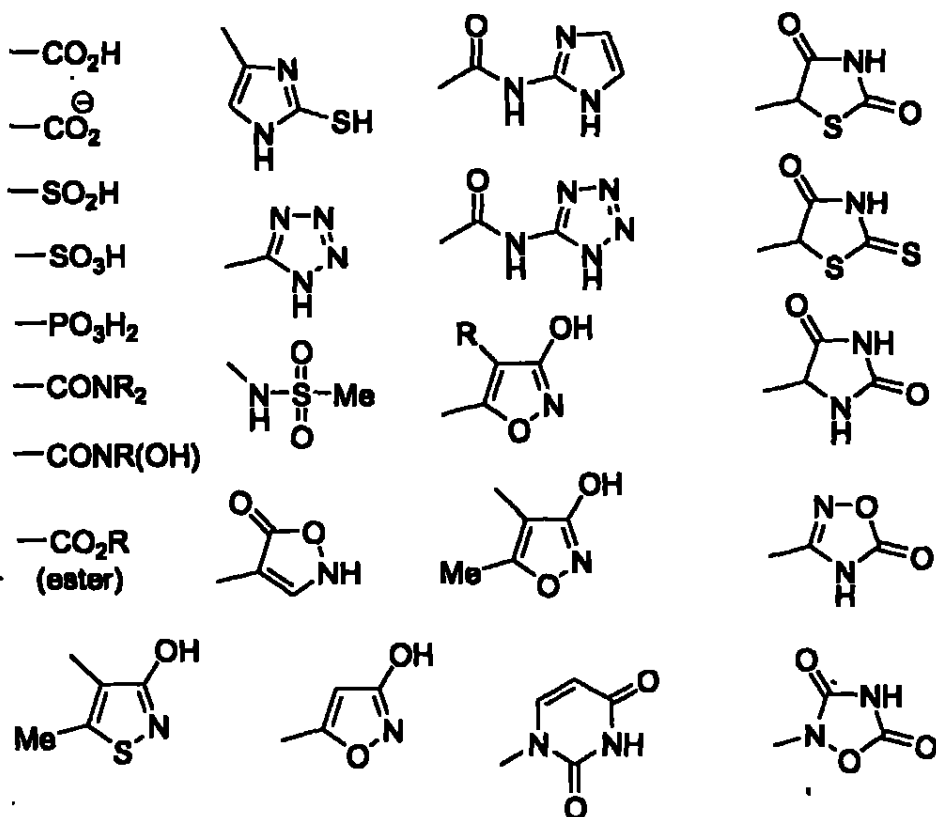


Esquema 12



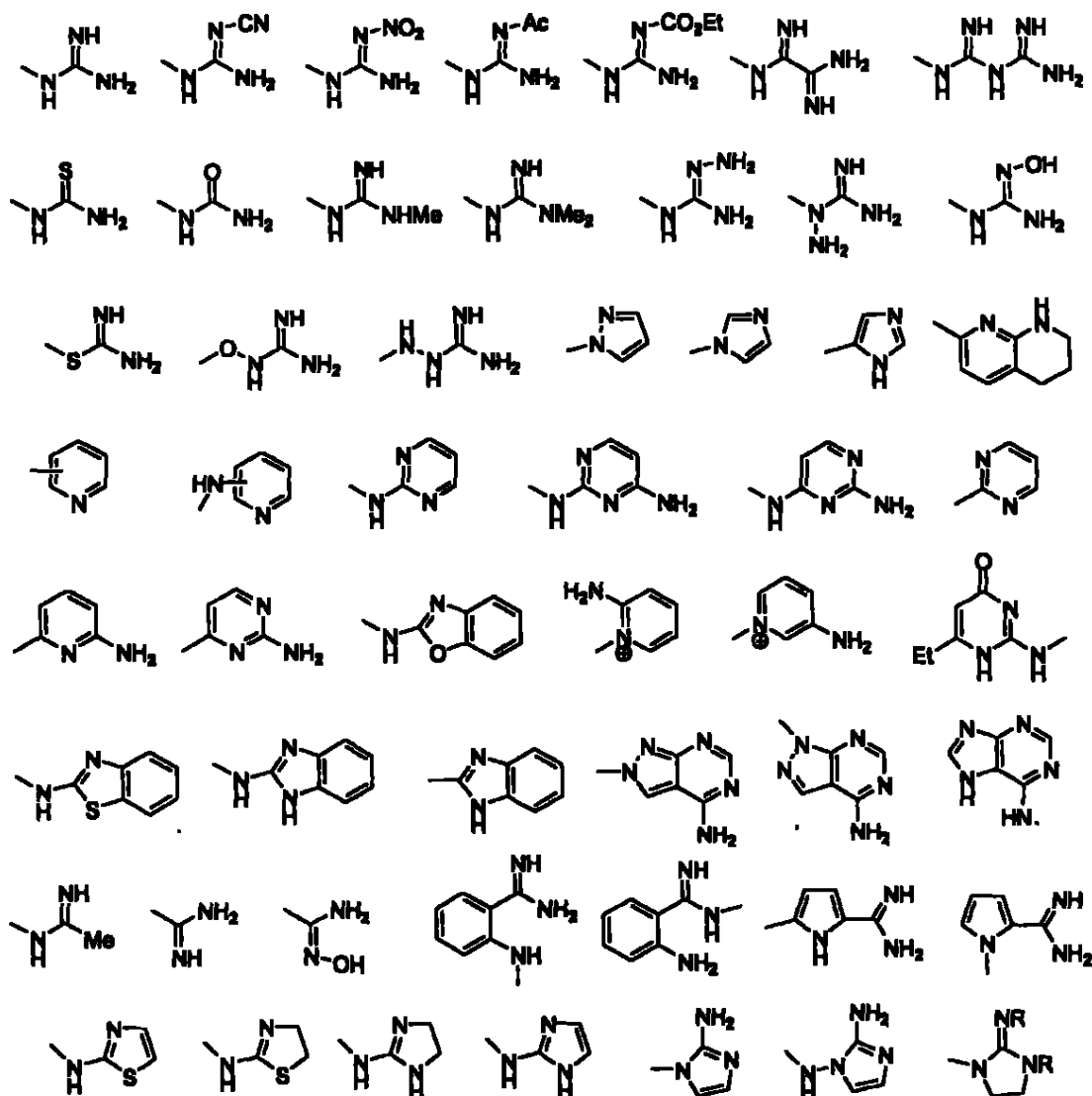
[0102] Ejemplos de bioisómeros para grupos ácido carboxílico y guanidina se muestran a continuación.

Bioisómeros de Ácido Carboxílico (R = H/alquilo)



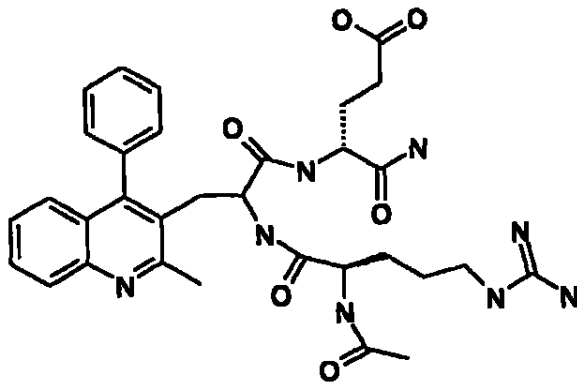
115

Biosósteros de Guanidina (R = H/alquilo)



Mediadores Preferidos

[0103] En incorporaciones preferidas, el mediador puede seleccionarse del grupo conformado por 4-Agmatina-3-amidoGABAquinolina, ácido 4-(1-(4-aminobutilcarbamoil)-2-(2-metil-4-fenilquinolin-3-il)etilcarbamoil)butanoico, y ácido 4-(5-guanidinopentilamino)quinolin-3-carboxílico. Cualesquiera residuos de aminoácido de terminal amino y/o carboxi no derivados en el listado anterior de compuestos preferidos se taponan con un grupo protector. En otra incorporación preferida, el mediador tiene la estructura:



Análisis de Estructura y Función

[0104] La estructura y función de los mediadores de RCT de las incorporaciones preferidas, incluidas las formas multiméricas ya descritas, pueden analizarse con el fin de seleccionar compuestos activos. Por ejemplo, los mediadores pueden analizarse con respecto a su capacidad de formar α -hélices, unir lípidos, formar complejos con lípidos, activar LCAT, y promover la descarga de colesterol, etc.

[0105] Métodos y análisis para analizar la estructura y/o función de los mediadores son bien conocidos en el arte. Métodos preferidos se dan en los ejemplos prácticos, más abajo. Por ejemplo, los análisis dicroísmo circular (CD) y resonancia magnética nuclear (NMR), descritos más abajo, pueden utilizarse para analizar la estructura de los mediadores — particularmente el grado de helicidad en la presencia de lípidos. La capacidad de unir lípidos puede determinarse utilizando el análisis de espectroscopía de fluorescencia descrito más abajo. La capacidad de los mediadores de activar LCAT puede determinarse fácilmente usando la activación de LCAT descrita más adelante. Los análisis *in vitro* e *in vivo* descritos más abajo pueden emplearse para evaluar la semivida, distribución, descarga de colesterol y efectos sobre el RCT.

Métodos Sintéticos

[0106] Las incorporaciones preferidas pueden prepararse usando virtualmente cualquier técnica conocida en el arte para la preparación de compuestos. Por ejemplo, los compuestos pueden prepararse empleando síntesis peptídicas convencionales graduales de fase solución o fase sólida.

117

[0107] Los mediadores de RCT pueden prepararse usando síntesis graduales convencionales de fase solución o fase sólida (véase, por ejemplo, Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins, Williams et al., Eds., 1997, CRC Press, Boca Raton Fla., y las referencias citadas allí; Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach, Atherton & Sheppard, Eds., 1989, IRL Press, Oxford, Inglaterra, y las referencias citadas allí).

[0108] En síntesis convencional de fase sólida, la unión del primer aminoácido o su análogo implica hacer reaccionar químicamente su extremo carboxil-terminal (C-terminal) con una resina derivada para formar el extremo carboxil-terminal del oligopéptido. El extremo alfa-amino del aminoácido se bloquea típicamente con un grupo t-butoxi-carbonilo (Boc) o con un grupo 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc) para impedir que el grupo amino, que de lo contrario podría reaccionar, participe en la reacción de acoplamiento. Los grupos de cadena lateral de los aminoácidos o análogos, si reactivos, se bloquean igualmente (o se protegen) por varios grupos protectores derivados de benciloen la forma de éteres, tioéteres, ésteres, y carbamatos.

[0109] El siguiente paso y los subsiguientes ciclos repetitivos involucra desbloquear el aminoácido ligado a resina amino-terminal (N-terminal) (o residuo terminal de la cadena peptídica) para retirar el grupo bloqueador alfa-amino, seguido por adición química (acoplamiento) del siguiente aminoácido bloqueado. Este proceso se repite sin embargo durante tantos ciclos como sea necesario para sintetizar la molécula entera de interés. Luego de cada uno de los pasos de acoplamiento y desbloqueo, la molécula ligada a resina se lava concienzudamente para eliminar cualesquiera reactivos residuales antes de pasar al siguiente. Las partículas de soporte sólidas facilitan la extracción de reactivos en cualquier paso dado, ya que la resina y el péptido ligado a la resina pueden filtrarse fácilmente y lavarse mientras se mantienen en una columna o dispositivo con aberturas porosas.

[0110] Moléculas sintetizadas pueden liberarse de la resina por catálisis ácida (típicamente con ácido fluorhídrico o ácido trifluoroacético), que disocia la molécula de la resina dejando una amida o grupo carboxilo en su C-terminal. La disociación acidolítica sirve además para retirar los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos en el péptido sintetizado. Los péptidos terminados pueden purificarse entonces por uno cualquiera de una variedad de métodos de cromatografía.

[0111] De acuerdo con una incorporación preferida, los péptidos y los mediadores de derivado de péptido de RCT se sintetizaron por métodos de síntesis de fase sólida con química Na-Fmoc. Aminoácidos Na-Fmoc protegidos y resina MBHA de amida de Rink y resina de Wang se adquirieron de Novabiochem (San Diego, CA) o Chem-Impex Intl (Wood Dale, IL). Otros químicos y disolventes se adquirieron de las siguientes fuentes: ácido trifluoroacético (TFA), anisol, 1,2-etanoditiol, tioanisol, piperidina, anhídrido acético, ácido 2-naftoico y ácido pivaloico (Aldrich, Milwaukee, WI), HOBt y NMP (Chem-Impex Intl, Wood Dale, IL), diclorometano, metanol y disolventes de grado HPLC de Fischer Scientific, Pittsburgh, PA. Se comprobó la pureza de los péptidos mediante LC/MS. La purificación de los péptidos se logró usando el sistema de HPLC preparativa (Agilent technologies, 1100 Series) en una columna de sílice ligada a C₁₈ (columna preparativa Tosoh Biospec, ODS-80TM, Dim: 21.5 mm x 30cm). Los péptidos se eluyeron con un sistema de gradiente [50% a 90% de disolvente B (acetonitrilo: agua 60:40 con 0.1% TFA)].

[0112] Todos los péptidos y sus análogos se sintetizaron de una manera gradual mediante el método de fase sólida, usando resina MBHA de amida de Rink (0.5-0.66 mmol/g) o resina de Wang (1.2 mmol/g). Los grupos protectores de cadena lateral fueron Arg (Pbf), Glu (OtBu) y Asp (OtBu). Cada aminoácido Fmoc-protégido se acopló a esta resina utilizando un exceso de 1.5 a 3 veces de los aminoácidos protegidos. Los reactivos de acoplamiento fueron N-hidroxibenzotriazol (HOBt) y diisopropil carbodiimida (DIC), y el acoplamiento se monitoreó mediante la prueba de ninhidrina. El grupo Fmoc se retiró con 20% piperidina en

tratamiento de 30-60 minutos NMP y luego lavados sucesivos con CH_2Cl_2 , 10%TEA en CH_2Cl_2 , metanol y CH_2Cl_2 . Los pasos de acoplamiento fueron seguidos por acetilación o con otros grupos taponantes según fuera necesario.

[0113] Una mezcla de TFA, tioanisol, etanoditiol y anisol (90:5:3:2, v/v) se empleó (4-5 horas a temperatura de la sala) para disociar el péptido de la resina-péptido y extraer la totalidad de los grupos protectores de cadena lateral. La mezcla de péptido crudo se filtró del embudo sinterizado, el cual se lavó con TFA (2-3 veces). El filtrado se concentró en un jarabe espeso y se añadió en éter frío. El péptido se precipitó como un sólido blanco luego de mantenerlo de un día para otro en el congelador y centrifugación. Se decantó la solución y el sólido se lavó concienzudamente con éter. El péptido crudo resultante se disolvió en tampón (acetonitrilo: agua 60:40 con 0.1% TFA) y se secó. El péptido crudo se purificó por HPLC usando una columna C-18 preparativa (fase reversa) con un sistema de gradiente 50 - 90% B en 40 minutos [Tampón A: agua que contenía 0.1% (v/v) TFA, Tampón B: Acetonitrilo: agua (60:40) que contenía 0.1% (v/v) TFA]. Las fracciones puras se concentraron sobre Speedvac. Los rendimientos variaron de 5% a 20%.

[0114] Alternativamente, los péptidos de las incorporaciones preferidas pueden prepararse mediante condensación de segmentos, es decir, la unión conjunta de pequeñas cadenas de péptido constituyentes para formar una cadena peptídica más grande, como se describe, por ejemplo, en Liu *et al.*, 1996, *Tetrahedron Lett.* 37(7):933- 936; Baca, et al., 1995, *J. Am. Chem. Soc.* 117:1881-1887; Tam et al., 1995, *Int. J. Peptide Protein Res.* 45:209-216; Schnolzer and Kent, 1992, *Science* 256:221-225; Liu and Tam, 1994, *J. Am. Chem. Soc.* 116(10):4149-4153; Liu and Tam, 1994, *PNAS. USA* 91:6584-6588; Yamashiro and Li, 1988, *Int. J. Peptide Protein Res.* 31:322-334; Nakagawa et al., 1985, *J. Am Chem, Soc.* 107:7087-7083; Nokihiro et al., 1989, *Peptides* 1988:166-168; Kneib-Cordonnier *et al.*, 1990, *Int. J. Pept. Protein Res.* 35:527-538; cuyas divulgaciones se incorporan en esta solicitud en su totalidad por referencia a ellas). Otros

métodos útiles para sintetizar los péptidos de las incorporaciones preferidas se describen en Nakagawa et al., 1985, *J Am. Chem. Soc.* 107:7087-7092.

[0115] Para péptidos producidos por condensación de segmentos, la eficiencia de acoplamiento del paso de condensación puede aumentarse significativamente incrementando el tiempo de acoplamiento. Típicamente, aumentar el tiempo de acoplamiento resulta en una racemización incrementada del producto (Sieber et al., 1970, *Helv. Chim. Acta* 53:2135-2150). Mediadores de RCT que contienen grupos bloqueadores N- y/o C-terminales pueden prepararse usando técnicas estándares de química orgánica. Por ejemplo, métodos para acilar el N-término de un péptido o amidar o esterificar el C-término de un péptido son bien conocidos en el arte. Modos de llevar a cabo otras modificaciones en el N- y/o C-término serán evidentes a aquellas personas expertas en el arte, como lo serán los modos de proteger funcionalidades de cadena lateral, que puedan ser necesarios para unir grupos bloqueadores terminales.

[0116] Análogamente, por ejemplo, métodos para desprotección de un grupo protector en el N-término de un péptido o el C-término de un péptido son bien conocidos en el arte. Modos de llevar a cabo otras modificaciones en el N- y/o C-término serán evidentes a aquellas personas expertas en el arte, como lo serán los modos de desproteger cualesquiera funcionalidades de cadena lateral, que puedan ser necesarios para retirar grupos bloqueadores terminales.

[0117] Sales farmacéuticamente aceptables (iones contrario) pueden prepararse convenientemente por cromatografía de intercambio iónico u otros métodos, como son bien conocidos en el arte.

Formulaciones Farmacéuticas y Métodos de Tratamiento

[0118] Los mediadores de RCT de las incorporaciones preferidas pueden utilizarse para tratar cualquier trastorno en animales, especialmente mamíferos, incluidos humanos, para los cuales es benéfica la reducción del colesterol en el suero, incluidas sin limitación enfermedades en las cuales aumentar la concentración de HDL en el suero, activar LCAT, y promover

la descarga de colesterol y RCT es beneficioso. Tales afecciones incluyen, pero no se limitan a hiperlipidemia, y especialmente hipercolesterolemia, y enfermedad cardiovascular tal como aterosclerosis (incluido el tratamiento y prevención de aterosclerosis) y arteriopatía coronaria; reocurrencia de estenosis (por ejemplo, prevenir o tratar placas ateroscleróticas, que se desarrollan como consecuencia de intervenciones médicas tales como angioplastia con globo); y otros trastornos, tales como isquemia, y endotoxinemia, que a menudo resulta en choque septicémico. Los mediadores de RCT pueden emplearse solos o en terapia de combinación con otros medicamentos utilizados para tratar las enfermedades anteriores. Tales terapias incluyen, pero no se limitan a administración simultánea o secuencial de los fármacos involucrados.

[0119] Por ejemplo, en el tratamiento de hipercolesterolemia o aterosclerosis, las formulaciones de mediadores moleculares de RCT pueden administrarse con uno cualquiera o más de las terapias reductoras de colesterol actualmente en uso; por ejemplo, resinas de ácido biliar, niacina, y/o estatinas. Tal régimen de tratamiento combinado puede producir efectos terapéuticos particularmente benéficos, ya que tales fármacos actúan sobre un objetivo diferente en la síntesis y transporte de colesterol; es decir, las resinas de ácido biliar afectan la reconversión del colesterol, la población de quilomicrones y LDL; la niacina afecta principalmente la población de VLDL y LDL; las estatinas inhiben la síntesis del colesterol, disminuyendo la población de LDL (y quizás aumentando la expresión del receptor de LDL); mientras que los mediadores de RCT afectan el RCT, incrementan la HDL, aumentan la actividad LCAT y promueven la descarga de colesterol.

[0120] Los mediadores de RCT pueden usarse en conjunción con fibratos para tratar hiperlipidemia, hipercolesterolemia y/o enfermedad cardiovascular tal como aterosclerosis.

[0121] Los mediadores de RCT pueden usarse en combinación con los agentes antimicrobianos y anti-inflamatorios utilizados actualmente para tratar choque septicémico inducido por endotoxina.

122

[0122] Los mediadores de RCT pueden formularse como composiciones a base de molécula o como complejos molécula-lípido, los cuales pueden administrarse a sujetos en una variedad de maneras, preferiblemente mediante administración oral, para llevar los mediadores de RCT a la circulación. Formulaciones ejemplares y regímenes de tratamiento se describen a continuación.

[0123] En otra incorporación preferida, se proveen métodos para aliviar uno o más síntomas de hipercolesterolemia y/o aterosclerosis. Los métodos conllevan preferiblemente administrar a un organismo, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente uno o más de los compuestos de las incorporaciones preferidas (o miméticos de tales compuestos). El compuesto (s) puede(n) administrarse, como se describe en esta solicitud, de acuerdo con cualquiera de un número de métodos estándar incluidos, pero no limitados a inyección, supositorio, atomizador nasal, implante de liberación en el tiempo, parche transdérmico, y similares. En una incorporación particularmente preferida, el compuesto (s) se administra(n) oralmente (por ejemplo, como un jarabe, cápsula, o tableta).

[0124] Los métodos involucran la administración de un compuesto único de las incorporaciones preferidas o la administración de dos o más compuestos diferentes. Los compuestos pueden proporcionarse como monómeros o en formas diméricas, oligoméricas o poliméricas. En ciertas incorporaciones, las formas multiméricas pueden comprender monómeros asociados (por ejemplo, enlazados iónica o hidrófobamente), aunque algunas otras formas multiméricas comprenden monómeros enlazados covalentemente (enlazados directamente o mediante un conector).

[0125] Aunque las incorporaciones preferidas se describen con respecto al uso en humanos, son también apropiadas para uso animal, por ejemplo veterinario. Por consiguiente, organismos preferidos incluyen, pero no se limitan a humanos, primates no humanos, caninos, equinos, felinos, porcinos, ungulados, lagomorfos, y similares.

[0126] Los métodos de las incorporaciones preferidas no se limitan a humanos o animales no humanos que muestren uno o más síntoma(s) de

hipercolesterolemia y/o aterosclerosis (por ejemplo, hipertensión, formación y ruptura de placas, reducción en acontecimientos clínicos tales como infarto del miocardio, angina, o apoplejía, niveles elevados de lipoproteína de baja densidad, niveles elevados de lipoproteína de muy baja densidad, o proteínas inflamatorias, etc.), sino son útiles en un contexto profiláctico. Por lo tanto, los compuestos de las incorporaciones preferidas (o sus miméticos) pueden administrarse a organismos para prevenir la iniciación/evolución de uno o más síntomas de hipercolesterolemia y/o aterosclerosis. Sujetos particularmente preferidos en este contexto son sujetos que muestran uno o más factores de riesgo para aterosclerosis (por ejemplo, historia familiar, hipertensión, obesidad, consumo elevado de alcohol, tabaquismo, colesterol alto en la sangre, triglicéridos altos en la sangre, LDL elevada en la sangre, VLDL, IDL, o HDL baja, diabetes, o una historia familiar de diabetes, lípidos altos en la sangre, infarto del miocardio, angina o apoplejía, etc.). Las incorporaciones preferidas incluyen las formulaciones farmacéuticas y el empleo de tales preparaciones en el tratamiento de hiperlipidemia, hipercolesterolemia, cardiopatía coronaria, aterosclerosis, diabetes, obesidad, enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple, afecciones relacionadas con hiperlipidemia, tales como inflamación, y demás trastornos, tales como endotoxemia causante de choque septicémico.

[0127] En una incorporación preferida, los mediadores moleculares de RCT pueden sintetizarse o fabricarse usando cualquier técnica descrita en esta solicitud, relativa a la síntesis y purificación de los mediadores de RCT. Preparaciones estables que tienen una vida útil prolongada puede elaborarse liofilizando los compuestos — ya sea para prepararlas a granel para reformulación, o para preparar alícuotas individuales o unidades farmacéuticas, que pueden reconstituirse por rehidratación con agua esterilizada o una solución tamponada esterilizada antes de la administración a un sujeto.

[0128] En otra incorporación preferida, los mediadores de RCT pueden formularse y administrarse en un complejo molécula-lípido. Este

enfoque tiene algunas ventajas puesto que el complejo debería tener una mayor semivida en la circulación, particularmente cuando el complejo tiene un tamaño y una densidad similar a HDL y, especialmente, las poblaciones pre- β -1 o pre- β -2 HDL. Los complejos molécula-lípido pueden prepararse convenientemente por cualquiera de un número de métodos descritos a continuación. Preparaciones estables con una vida útil prolongada pueden elaborarse por liofilización — siendo la estrategia preferida el procedimiento de co-liofilización descrito más adelante. Los complejos liofilizados molécula-lípido pueden usarse para preparar un medicamento a granel para reformulación farmacéutica, o para preparar alícuotas individuales o unidades farmacéuticas que pueden reconstituirse por rehidratación con agua esterilizada o una solución tamponada apropiada antes de la administración a un sujeto.

[0129] Una variedad de métodos, bien conocidos por las personas expertas en el arte, pueden utilizarse para preparar las vesículas o complejos molécula-lípido. A este fin, puede emplearse un número de técnicas disponibles para preparar liposomas o proteoliposomas. Por ejemplo, el compuesto puede co-sonicarse (usando un sonicador de baño o sonda) con lípidos apropiados para formar complejos. Alternativamente el compuesto puede combinarse con vesículas de lípido preformadas, resultantes en la formación espontánea de complejos molécula-lípido. En todavía otra alternativa, los complejos molécula-lípido pueden formarse por un método de diálisis de detergente; por ejemplo, una mezcla del compuesto, lípido y detergente se dializa para eliminar el detergente y reconstituir o formar complejos molécula-lípido (por ejemplo, véase Jonas *et al.*, 1986, *Methods in Enzymol.* 128:553-582).

[0130] Aunque las estrategias anteriores son factibles, cada método presenta sus propios problemas peculiares de producción en términos de costo, rendimiento, reproducibilidad y seguridad. De acuerdo con un método preferido, el compuesto y el lípido se combinan en un sistema disolvente, que co-solubiliza cada ingrediente y puede retirarse completamente por liofilización. A este efecto, deben seleccionarse

cuidadosamente parejas de disolventes para garantizar co-solubilidad tanto del compuesto anfipático como del lípido. En una incorporación, compuesto (s) o sus derivados/análogos, a incorporarse en las partículas, pueden disolverse en un disolvente acuoso u orgánico o mezcla de disolventes (disolvente 1). El componente (fosfo)lípido se disuelve en un disolvente acuoso u orgánico o mezcla de disolventes (disolvente 2), que es miscible con disolvente 1, y las dos soluciones se mezclan. Alternativamente, el compuesto y lípido pueden incorporarse en un sistema co-disolvente; es decir, una mezcla de los disolventes miscibles. Una proporción apropiada de compuesto a lípidos se determina primero empíricamente, de modo que los complejos resultantes posean las propiedades físicas y químicas apropiadas; es decir, usual (pero no necesariamente) similares en tamaño a HDL. La mezcla resultante se congela y liofiliza a sequedad. A veces tiene que agregarse un disolvente adicional a la mezcla para facilitar la liofilización. Este producto liofilizado puede almacenarse por períodos prolongados y permanecerá estable.

[0131] El producto liofilizado puede reconstituirse con el fin de obtener una solución o suspensión del complejo molécula-lípido. A este fin, el polvo liofilizado puede rehidratarse con una solución acuosa a un volumen adecuado (a menudo 5 mgs compuesto/ml, que es conveniente para inyección intravenosa). En una incorporación preferida el polvo liofilizado se rehidrata con solución tamponada con fosfato o una solución salina fisiológica. La mezcla puede tener que agitarse o centrifugarse para facilitar la rehidratación y, en la mayoría de los casos, el paso de reconstitución debe conducirse a una temperatura igual o mayor que la temperatura de transición de fase del componente lípido de los complejos. En el término de unos minutos, resulta una preparación transparente de complejos lípido-proteína reconstituídos.

[0132] Puede caracterizarse una alícuota de la preparación reconstituída resultante para confirmar que los complejos en la preparación tengan la distribución de tamaño deseada; por ejemplo, la distribución de tamaño de HDL. A este fin puede emplearse cromatografía de filtración en

gel. Por ejemplo, puede utilizarse un sistema de cromatografía de filtración en gel Pharmacia Superose 6 FPLC. El tampón utilizado contiene 150 mM NaCl en 50 mM de tampón de fosfato, pH 7.4. Un volumen de muestra típica es 20 a 200 microlitros de complejos que contienen 5 mgs compuesto/ml. La velocidad de flujo de columna es 0.5 mls/min. Una serie de proteínas de peso molecular conocido y diámetro Stokes, así como HDL humana se emplean preferiblemente como estándares para calibrar la columna. Las proteínas y complejos de lipoproteína se monitorean por absorción o dispersión de luz de longitud de onda 254 o 280 nm.

[0133] Los mediadores de RCT de las incorporaciones preferidas pueden acomplejarse con una variedad de lípidos, incluidos lípidos y/o fosfolípidos saturados, insaturados, naturales y sintéticos. Lípidos apropiados incluyen, pero no se limitan a, fosfolípidos de cadena alquílica pequeña, fosfatidilcolina de huevo, fosfatidilcolina de soya, dipalmitoilfosfatidilcolina, dimiristoilfosfatidilcolina, distearoilfosfatidilcolina, 1-miristoil-2-palmitoilfosfatidilcolina, 1-palmitoil-2-miristoilfosfatidilcolina, 1-palmitoil-2-estearoilfosfatidilcolina, 1-estearoil-2-palmitoilfosfatidilcolina, dioleoilfosfatidilcolina, dioleofosfatidiletanolamina, dilauroilfosfatidilglicerolfosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, esfingomielina, esfingolípidos, fosfatidilglicerol, difosfatidilglicerol, dimiristoilfosfatidilglicerol, dipalmitoilfosfatidilglicerol, distearoilfosfatidilglicerol, dioleoilfosfatidilglicerol, ácido dimiristoilfosfatídico, ácido dipalmitoilfosfatídico, dimiristoilfosfatidiletanolamina, dipalmitoilfosfatidiletanolamina, dimiristoilfosfatidilserina, dipalmitoilfosfatidilserina, fosfatidilserina del cerebro, esfingomielina del cerebro, dipalmitoilesfingomielina, distearoilesfingomielina, ácido fosfatídico, galactocerebrósido, gangliósidos, cerebrósidos, dilauroilfosfatidilcolina, (1,3)-D-mannosil-(1,3)diglicérido, aminofenilglucósido, 3-colesteril-6'-(glucosiltio)hexil éter glucolípidos, y colesterol y sus derivados.

[0134] La formulación farmacéutica de las incorporaciones preferidas contienen los mediadores moleculares de RCT o el complejo molécula-lípido como el ingrediente activo en un excipiente farmacéuticamente aceptable, apropiado para administración y aplicación *in vivo*. Como los compuestos pueden contener términos ácidos y/o básicos y/o cadenas laterales, los compuestos pueden incluirse en las formulaciones o bien en la forma de ácidos libres o bases, o bien en la forma de sales farmacéuticamente aceptables.

[0135] Las preparaciones inyectables incluyen suspensiones estériles, soluciones o emulsiones del ingrediente activo en vehículos acuosos o aceitosos. Las composiciones pueden contener asimismo agentes de formulación, tales como un agente de suspensión, estabilizante y/o dispersante. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en una forma farmacéutica unitaria, por ejemplo, en ampollas o en envases multidosis, y pueden contener preservantes agregados.

[0136] Alternativamente, la formulación inyectable puede proveerse en forma de polvo para reconstitución con un excipiente apropiado, incluidos, pero no limitados a agua esterilizada libre de pirógenos, tampón, solución de dextrosa, etc., antes del empleo. A este fin, los mediadores de RCT pueden liofilizarse, o puede prepararse el complejo molécula-lípido co-liofilizado. Las preparaciones almacenadas pueden suministrarse en formas farmacéuticas unitarias y reconstituirse antes del empleo *in vivo*.

[0137] Para administración prolongada, el ingrediente activo puede formularse como una preparación de liberación lenta, para administración por implante; por ejemplo, subcutáneo, intradérmico, o inyección intramuscular. Así, por ejemplo, el ingrediente activo puede formularse con materiales apropiados poliméricos o hidrófobos (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados poco solubles; por ejemplo, como una forma de sal poco soluble de los mediadores de RCT.

[0138] Alternativamente, pueden utilizarse sistemas de aplicación transdérmica fabricados como un disco o parche adhesivo, que liberan lentamente el ingrediente activo para absorción percutánea. A este fin, pueden empelarse intensificadores de permeación para facilitar la penetración transdérmica del ingrediente activo. Un beneficio particular puede lograrse incorporando los mediadores de RCT de las incorporaciones preferidas o el complejo molécula-lípido en un parche de nitroglicerina para uso en pacientes con cardiopatía isquémica e hipercolesterolemia.

[0139] Para administración oral, las composiciones farmacéuticas pueden tomar la forma de, por ejemplo, tabletas o cápsulas preparadas por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes aglutinantes (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); rellenos (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o fosfato de calcio dibásico); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); desintegrantes (por ejemplo, almidón de papa o glicolato sódico de almidón); o agentes humectantes (por ejemplo, laurilsulfato sódico). Las tabletas pueden recubrirse por métodos bien conocidos en el arte. Las preparaciones líquidas para administración oral pueden tomar la forma de, por ejemplo, soluciones, jarabes o suspensiones, o pueden presentarse como un producto seco para constitución con agua u otro vehículo apropiado antes del empleo. Tales preparaciones líquidas pueden elaborarse por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsificantes (por ejemplo, lecitina o acacia); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendras, ésteres oleosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados); y preservantes (por ejemplo, metil o propil-p- hidroxibenzoatos o ácido sórbico). Las preparaciones pueden contener asimismo sales tamponadoras, agentes saborizantes, colorantes y edulcorantes, según sea apropiado. Preparaciones para administración oral puede formularse apropiadamente para proporcionar una liberación controlada del compuesto activo.

[0140] Para administración bucal, las composiciones pueden tomar la forma de tabletas o pastillas para chupar formuladas de manera convencional. Para rutas rectales y vaginales de administración, el ingrediente activo puede formularse como soluciones (para enemas de retención), supositorios o ungüentos.

[0141] Para administración por inhalación, el ingrediente activo puede aplicarse convenientemente en la forma de una presentación atomizable en aerosol de envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propulsor apropiado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, anhídrido carbónico u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado la unidad farmacéutica puede determinarse proveyendo una válvula para dispensar una cantidad dosificada. Cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina para uso en un inhalador o insuflador pueden formularse conteniendo una mezcla de polvo del compuesto y una base en polvo apropiada tal como lactosa o almidón.

[0142] Si se desea, las composiciones pueden presentarse en un envase o dispositivo dispensador, que puede contener una o más presentaciones farmacéuticas unitarias que incluyen el ingrediente activo. El envase puede, por ejemplo, comprender una película metálica o plástica, tal como un envase blíster. El envase o dispositivo dispensador puede acompañarse con instrucciones de administración.

[0143] Los mediadores de molécula de RCT y/o complejos molécula-lípido de las incorporaciones preferidas pueden administrarse por cualquier ruta apropiada que garantice la biodisponibilidad en la circulación. Esto puede lograrse por rutas parenterales de administración, incluidas inyecciones intravenosa (IV), intramuscular (IM), intradérmica, subcutánea (SC) e intraperitoneal (IP). No obstante, pueden utilizarse otras rutas de administración. Por ejemplo, la absorción a través del tracto gastrointestinal puede realizarse por rutas orales de administración (incluidas pero no limitadas a ingestión, rutas bucales y sublinguales), siempre que se empleen formulaciones apropiadas (por ejemplo, cubiertas entéricas) para impedir o minimizar la degradación del ingrediente activo,

por ejemplo, en los entornos rudos de la mucosa bucal, estómago y/o intestino delgado. La administración oral tiene la ventaja de facilidad de empleo y, por lo tanto, cumplimiento terapéutico mejorado. Alternativamente, la administración a través del tejido mucoso, tales como modos vaginales y rectales de administración, puede utilizarse para evitar o minimizar la degradación en el trato gastrointestinal. En todavía otra alternativa, las formulaciones de las incorporaciones preferidas pueden administrarse por vía transcutánea (por ejemplo, por vía transdérmica), o por inhalación. Se observará que la ruta preferida puede variar con la enfermedad, edad y cumplimiento terapéutico del destinatario.

[0144] La dosis efectiva de mediadores moleculares de RCT o complejo molécula-lípido usada variará con la ruta de administración, y debe ajustarse para obtener concentraciones en el plasma en circulación de 1.0 mg/l a 2 g/l. Los datos obtenidos en sistemas de modelos animales, descritos en esta solicitud, muestran que los agonistas de ApoA-I de las incorporaciones preferidas se asocian con el componente HDL, y tienen una semivida proyectada en humanos de alrededor de cinco días. Por consiguiente, en una incorporación, los mediadores de RCT pueden administrarse por inyección en una dosis entre 0.5 mg/kg a 100 mg/kg una vez por semana. En otra incorporación, pueden mantenerse niveles deseables en el suero mediante infusión continua o mediante infusión intermitente que aporte alrededor de 0.1 mg/kg/hr a 100 mg/kg/hr.

[0145] La toxicidad y eficacia terapéutica de varios mediadores de RCT pueden determinarse usando procedimientos farmacéuticos estándar en cultivo celular o animales experimentales para determinar la LD₅₀ (la dosis letal al 50% de la población) y la ED₅₀ (la dosis terapéuticamente efectiva en 50% de la población). La relación de la dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación LD₅₀/ED₅₀. Se prefieren agonistas moleculares de ApoA-I, que exhiben índices terapéuticos elevados.

Otros Usos

[0146] Los mediadores de agonistas de RCT de las incorporaciones preferidas pueden emplearse en análisis *in vitro* para medir el HDL del suero, por ejemplo, para efectos diagnósticos. Debido a que los mediadores de RCT se asocian con el componente HDL y LDL del suero, los agonistas pueden emplearse como "marcadores" para la población HDL y LDL. Más aún, los agonistas pueden usarse como marcadores para la subpoblación de HDL que son efectivos en RCT. A este fin, el agonista puede agregarse a, o mezclarse con, una muestra de suero del paciente; luego de un tiempo de incubación apropiada, el componente HDL puede analizarse detectando los mediadores incorporados de RCT. Esto puede lograrse usando un agonista marcado (por ejemplo, radiomarcadores, marcadores fluorescentes, marcadores enzimáticos, tintes, etc.), o mediante inmunoanálisis usando anticuerpos (o fragmentos de anticuerpo) específicos para el agonista.

[0147] Alternativamente, puede utilizarse un agonista marcado en procedimientos radiográficos (por ejemplo, TAC, RMN) para visualizar el sistema circulatorio, o para monitorear el RCT, o para visualizar la acumulación de HDL en estrías grasas, lesiones ateroscleróticas, etc. (donde la HDL debe ser activa en la descarga de colesterol).

Ensayos para Análisis de Mediadores de Transporte Inverso de Colesterol

Ensayo de Activación de LCAT

[0148] Los mediadores de RCT de acuerdo con incorporaciones preferidas pueden evaluarse con respecto a su eficacia clínica potencial mediante varios ensayos *in vitro*, por ejemplo, mediante su capacidad de activar LCAT *in vitro*. En el ensayo LCAT, vesículas de sustrato (vesículas unilaminares pequeñas o "SUVs") compuestas de fosfatidilcolina de huevo (EPC) o 1-palmitoil-2-oleil-fosfatidil-colina (POPC) y colesterol radiomarcado se preincuban con masas equivalentes ya sea de compuesto o ya sea de ApoA-I (aislado de plasma humano). La reacción se inicia por la adición de LCAT (purificada de plasma humano). ApoA-I nativa, que se utilizó como control positivo, representa una actividad de activación del 100%. La "actividad específica" (es decir, unidades de actividad

(activación de LCAT)/unidad de masa) de los mediadores moleculares puede calcularse como la concentración de mediador que logra la máxima activación de LCAT. Por ejemplo, una serie de concentraciones del compuesto (por ejemplo, una dilución limitante) puede ensayarse para determinar la "actividad específica" del compuesto – la concentración que alcanza la activación máxima de LCAT (es decir, conversión porcentual de colesterol a éster de colesterol) en un punto de tiempo específico en el ensayo (por ejemplo, 1 hora). Cuando se grafica la conversión porcentual de colesterol en, por ejemplo, 1 hora, contra la concentración de compuesto utilizado, la "actividad específica" puede identificarse como la concentración de compuesto que logra un límite en la curva graficada.

Preparación de Vesículas de Sustrato

[0149] Las vesículas usadas en el ensayo LCAT son SUVs compuestas de fosfatidilcolina de huevo (EPC) o 1-palmitoil-2-oleil-fosfatidilcolina (POPC) y colesterol con una relación molar de 20:1. Para preparar una solución patrón concentrada de vesícula suficiente para 40 ensayos, 7.7 mg EPC (o 7.6 mg POPC; 10 μ mol), 78 μ g (0.2 μ mol) 4-¹⁴C-colesterol, 116 μ g colesterol (0.3 μ mol) se disuelven en 5 ml xileno y se liofilizan. A continuación se agregaron 4 ml de tampón de ensayo al polvo seco y se sonicaron bajo atmósfera de nitrógeno a 4°C. Condiciones de sonicación: Sonicador Branson 250, punta 10 mm, 6×5 minutos; tampón de ensayo: 10 mM Tris, 0.14 M NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.4. La mezcla sonicada se centrifuga 6 veces durante 5 minutos cada vez a 14.000 rpm (16,000×g) para retirar las partículas de titanio. La solución clara resultante se emplea para el ensayo enzimático.

Purificación de LCAT

[0150] Para la purificación de LCAT, se emplea tratamiento con sulfato de dextrina /Mg²⁺ de plasma humano para obtener suero deficiente en lipoproteína (LPDS), el cual se cromatografía secuencialmente en Fenilsefarosa, Affigelblue, Concanavalina A sefarosa y cromatografía de afinidad de anti-ApoA-I.

Preparation of LPDS

[0151] Para preparar LPDS, 500 ml plasma se agregan a 50 ml de solución de sulfato de dextrina (MW=500.000). Agitar durante 20 minutos. Centrifugar durante 30 minutos a 3.000 rpm (16.000×g) a 4°C. Usar sobrenadante (LPDS) para purificación posterior (aprox. 500 ml).

Cromatografía de Fenilsefarosa

[0152] Los siguientes materiales y condiciones se emplearon para la cromatografía de fenilsefarosa. Fase sólida: flujo rápido de fenilsefarosa, grado alto de sustrato, columna Pharmacia: XK26/40, altura de lecho de gel: 33 cm, V = ca, velocidades de flujo de 175 ml: 200 ml/hora (muestra) lavado: 200 ml/hora (tampón) elución: 80 ml/hora (agua destilada) tampón: 10 mM Tris, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 7.4, 0.01% de azida de sodio.

[0153] Equilibrar la columna en tampón Tris, agregar 29 g NaCl a 500 ml LPDS y aplicar a la columna, lavar con varios volúmenes de tampón Tris hasta que la absorción a 280 nm de longitud de onda está aproximadamente en la línea de referencia, luego iniciar la elución con agua destilada. Las fracciones que contienen la proteína se mezclan (tamaño de la mezcla: 180 ml) y se utilizan para cromatografía en Affigel blue.

Cromatografía en Affigel blue

[0154] La mezcla de fenilsefarosa se dializa de un día para otro a 4°C contra 20 mM Tris-HCl, pH7.4, 0.01% azida de sodio. El volumen de la mezcla se reduce por ultrafiltración (Amicon YM30) a 50-60 ml y se carga en una columna en Affigel blue. Fase sólida: Affigel blue, Biorad, columna 153-7301, XK26/20, altura del lecho de gel: aprox. 13 cm; volumen de la columna: aprox. 70 ml. Velocidades de flujo: carga: 15 ml/h lavado: 50 ml/h. Equilibrar columna en tampón Tris. Aplicar mezcla de fenilsefarosa a la columna. Iniciar en paralelo para recoger las fracciones. Lavar con tampón Tris. Las fracciones mezcladas (170 ml) se utilizaron para cromatografía ConA.

Cromatografía ConA

[0155] La mezcla Affigel blue se redujo mediante Amicon (YM30) a 30-40 ml y se dializó contra tampón de partida ConA (1 mM Tris HCl pH7.4; 1 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂, 1 mM CaCl₂, 0.01% azida de sodio) de un día para otro a 4°C. Fase sólida: columna de sefarosa ConA (Pharmacia): XK26/20, altura del lecho de gel: 14 cm (75 ml). Velocidades de flujo: carga 40 ml/h lavado (con tampón de partida): 90 ml/h elución: 50 ml/h, 0.2M metil- α -D-mannósido en 1 mM Tris, pH 7.4. Las fracciones de proteína de las eluciones de mannosido se recogieron (110 ml), y el volumen se redujo por ultrafiltración (YM30) a 44 ml. La mezcla ConA se dividió en alícuotas de 2 ml, las cuales se almacenaron a -20°C.

Cromatografía de Afinidad Anti-ApoA-I

[0156] Se realizó cromatografía de afinidad Anti-ApoA-I en material Affigel-Hz (Biorad), al cual se había acoplado covalentemente la anti-ApoA-I abs. Columna: XK16/20, V = 16 ml. La columna se equilibró con PBS pH 7.4. 2ml de la mezcla ConA se dializaron durante 2 horas contra PBS antes de cargar en la columna. Velocidades de flujo: carga: 15 ml/hora lavado (PBS) 40 ml/hora. Las fracciones de proteína mezcladas (V= 14 ml) se utilizan para análisis LCAT. La columna se regenera con 0.1 M tampón de citrato (pH 4.5) para eluir la A-I fijada (100 ml), e inmediatamente después de este procedimiento se reequilibra con PBS.

Farmacocinética de los Mediadores de RCT

[0157] Los siguientes protocolos experimentales pueden usarse para demostrar que los mediadores de RCT son estables en la circulación y se asocian con el componente HDL del plasma.

Síntesis y/o Radiomarcado de Agonistas del Compuesto

[0158] La LDL ¹²⁵I-marcada se preparó por el procedimiento de monoclóruo de yodo a una actividad específica de 500-900 cpm/ng (Goldstein and Brown 1974 *J. Biol. Chem.* 249:5153-5162). Se determinaron la unión y degradación de lipoproteínas de baja densidad por fibroblastos humanos cultivados a actividades específicas finales de 500-900 cpm/ng, como se describe (Goldstein and Brown 1974 *J. Biol. Chem.*

249:5153-5162). En todo caso, >99% radioactividad fue precipitable por incubación de las lipoproteínas a 4°C con 10% (p/vol) ácido tricloroacético (TCA). El residuo Tyr se unió al N-término de cada compuesto para posibilitar su radioyodación. Los compuestos se radioyodaron con Na¹²⁵I (ICN), usando Iodo-Beads (Pierce Chemicals) y cifiéndose al protocolo del fabricante, a una actividad específica de 800-1000 cpm/ng. Luego de la diálisis, la radioactividad precipitable (10% TCA) de los compuestos fue siempre >97%.

[0159] Alternativamente, compuestos radiomarcados pudieron sintetizarse acoplando Fmoc-Pro ¹⁴C marcado como el aminoácido N-terminal. L-[U-¹⁴ C]X, actividad específica 9.25 GBq/mmol, puede emplearse para la síntesis de agonistas marcados que contengan X. La síntesis puede llevarse a cabo de acuerdo con Lapatsanis, *Synthesis*, 1983, 671-173. Concretamente, 250 μM (29.6 mg) de L-X no marcado se disuelven en 225 μl de una solución 9% Na₂CO₃ y se agregan a una solución (9% Na₂CO₃) de 9.25 MBq (250 μM) L-X ¹⁴C-marcado. El líquido se enfría a 0° C, se mezcla con 600 μM (202 mg) 9- fluorenilmetil-N-succinimidilcarbonato (Fmoc-OSu) en 0.75 ml DMF y se agita a temperatura de la sala durante 4 horas. Seguidamente, la mezcla se extrae con éter dietílico (2x5ml) y cloroformo (1x5ml), la fase acuosa restante se acidifica con 30% HCl y se extrae con cloroformo (5x8 ml). La fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄, se extrae por filtración y el volumen se reduce bajo flujo de nitrógeno a 5 ml. Se calculó la pureza por TLC (CHCl₃:MeOH:Hac, 9:1:0.1 v/v/v, HPTLC de fase estacionaria gel de sílice 60, Merck, Alemania) con detección UV, por ejemplo, pureza radioquímica: Linear Analyzer, Berthold, Alemania; los rendimientos de la reacción pueden ser aproximadamente 90% (determinado por LSC).

[0160] La solución de cloroformo que contenía el ¹⁴C-compuesto X se usa directamente para síntesis. Una resina, que contiene los aminoácidos 2-22, puede sintetizarse automáticamente, como se describe anteriormente y emplearse para la síntesis. La secuencia del péptido se determina mediante degradación de Edman. El acoplamiento se realiza

como se describe previamente, excepto que preferiblemente se utiliza HATU (hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)1-1,3,3-tetrametiluronio) en lugar de TBTU. Un segundo acoplamiento con Fmoc-L-X no marcado se lleva a cabo manualmente.

Farmacocinética en Ratones

[0161] En cada experimento, 300 - 500 $\mu\text{g/kg}$ (0.3 - 0.5 mg/kg) [o más, tal como 2.5 mg/k] de compuesto radiomarcado pueden inyectarse intraperitonealmente en ratones que se alimentaron con una comida normal para ratones o la dieta modificada de Thomas-Harcroft aterogénica (resultante en un colesterol VLDL y HDL). Se toman muestras de sangre en múltiples intervalos de tiempo para evaluación de la radioactividad en el plasma.

Estabilidad en Suero Humano

[0162] 100 μg de compuesto marcado pueden mezclarse con 2 ml de plasma humano fresco (a 37°C) y purificarse de lípido ya sea inmediatamente (muestra de control) o ya sea después de 8 días de incubación a 37°C (muestra de prueba). La purificación de lípido se lleva a cabo extrayendo los lípidos con un volumen igual de 2:1 (v/v) cloroformo metanol. Las muestras se cargan en una columna C_{18} HPLC de fase reversa y se eluyen con una gradiente lineal (25-58% durante 33 minutos) de acetonitrilo (que contiene 0.1% en peso de TFA). Los perfiles de elución se siguen por absorción (220 nm) y radioactividad.

Formación de Partículas Similares a Pre- β

[0163] HDL humana puede aislarse mediante ultracentrifugación de densidad con KBr a $d = 1.21 \text{ g/ml}$ para obtener la fracción superior, seguida por cromatografía de filtración en gel Superose 6 para separar HDL de otras lipoproteínas. HDL aislada se ajusta a una concentración final de 1.0 mg/ml con solución salina fisiológica basada en contenido de proteína, determinado mediante ensayo de proteína de Bradford. Una alícuota de 300 μl se retira de la preparación de HDL aislada y se incubó con 100 μl de compuesto marcado (0.2-1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) durante dos horas a 37°C. Se analizan múltiples incubaciones separadas, incluido una incubación en blanco que

contiene 100 μ l de solución salina fisiológica y cuatro diluyentes de compuesto marcado. Por ejemplo: (i) 0.20 μ g/ μ l relación compuesto: HDL = 1:15; (ii) 0.30 μ g/ μ l relación compuesto: HDL = 1:10; (iii) 0.60 μ g/ μ l relación compuesto: HDL = 1:5; y (iv) 1.00 μ g/ μ l relación compuesto: HDL = 1:3. Luego de la incubación de dos horas, una alícuota de 200 μ l de la muestra (volumen total = 400 μ l) se carga en una columna de filtración en gel Superose 6 para separación de lipoproteína y análisis, y 100 μ l se usan para determinar la radioactividad total cargada.

Asociación de Mediadores con Lipoproteínas Humanas

[0164] La asociación de mediadores moleculares con fracciones de lipoproteína humana puede determinarse incubando compuesto marcado con cada clase de lipoproteína (HDL, LDL y VLDL) y una mezcla de las diferentes clases de lipoproteína. HDL, LDL y VLDL se aislaron mediante ultracentrifugación de gradiente de densidad con KBr a $d = 1.21$ g/ml y se purificaron por FPLC en una columna de exclusión de tamaño Superose 6B (la cromatografía se lleva a cabo con una velocidad de flujo de 0.7 ml/min y un tampón de desplazamiento de 1 mM Tris (pH 8), 115 mM NaCl, 2 mM EDTA y 0.0% NaN_3). El compuesto marcado se incubó con HDL, LDL y VLDL con una relación compuesto: fosfolípido de 1:5 (relación de masa) durante 2 horas a 37°C. La cantidad requerida de lipoproteína (volúmenes basados en la cantidad necesaria para producir 1.000 μ g) se mezcla con 0.2 ml de solución patrón concentrada del compuesto (1 mg/ml) y la solución se llevó a 2.2 ml usando 0.9% de NaCl.

[0165] Luego de incubar durante 2 horas a 37°C, se retira una alícuota (0.1 ml) para la determinación de la radioactividad total (por ejemplo, por conteo de escintilación líquida o conteo gamma dependiendo del isótopo de marcación), la densidad de la mezcla de incubación restante se ajusta a 1.21 g/ml con KBr, y las muestras se centrifugan a 100.000 rpm (300,000 g) durante 24 horas a 4° C en un rotor TLA 100.3 usando una ultracentrífuga de mesa Beckman. El sobrenadante resultante se fracciona retirando alícuotas de 0.3 ml de la superficie de cada muestra para un total de 5 fracciones, y 0.05 ml de cada fracción se usan para el conteo. Las dos

fracciones superiores contienen las lipoproteínas flotantes, las otras fracciones (3-5) corresponden al compuesto en solución.

Unión Selectiva a Lípidos de HDL

[0166] Plasma humano (2 ml) se incuba con 20, 40, 60, 80, y 100 µg de compuesto marcado durante 2 horas a 37°C. Las lipoproteínas se separan ajustando la densidad a 1.21 g/ml y centrifugación en un rotor TLA 100.3 a 100.000 rpm (300.000 g) durante 36 horas a 4°C. La capa superior 900 µl (en fracciones de 300 µl) se toma para el análisis. 50 µl de cada fracción de 300 µl se cuenta con respecto a radioactividad y 200 µl de cada fracción se analizan mediante FPLC (columna de combinación Superose 6/Superose 12).

Uso de los Mediadores de Transporte Inverso de Colesterol en Sistemas de Modelos Animales

[0167] La eficacia de los mediadores de RCT de las incorporaciones preferidas puede demostrarse en conejos u otros modelos animales apropiados.

Preparación de Complejos Fosfolípido/Compuesto

[0168] Partículas discoidales pequeñas compuestas de fosfolípido (dipalmitoilfosfatidilcolina - DPPC) y compuesto se preparan siguiendo el método de diálisis con sal de ácido cólico. El fosfolípido se disuelve en cloroformo y se seca bajo una corriente de nitrógeno. El compuesto se disuelve en tampón (solución salina) en una concentración de 1-2 mg/ml. La película de lípido se redisuelve en tampón que contiene sal de ácido cólico (43°C), y se agrega la solución de compuesto en una relación de peso de 3:1 de fosfolípido/compuesto. La mezcla se incuba de un día para otro a 43°C y se dializa a 43°C (24 horas), temperatura de la sala (24 horas) y 4°C (24 horas), con tres cambios de tampón (volúmenes grandes) a punto de temperatura. Los complejos esterilizarse por filtración (0.22 µm) para inyección y almacenamiento a 4°C.

Aislamiento y Caracterización de las Partículas de Compuesto/Fosfolípido

[0169] Las partículas pueden separarse en una columna de filtración en gel (Superose 6 HR). La posición del pico que contiene las partículas se identifica midiendo la concentración de fosfolípido en cada fracción. A partir del volumen de elución, puede determinarse el radio Stokes. La concentración de compuesto en el complejo se determina midiendo el contenido de fenilalanina (por HPLC) luego de una hidrólisis ácida de 16 horas.

Inyección al Conejo

[0170] Conejos machos New Zealand White (2.5-3 kg) se inyectan intravenosamente con una dosis de complejo fosfolípido/compuesto (5 o 10 mg/kg peso corporal, expresado como compuesto) en una sola inyección intravenosa rápida sin exceder 10-15 ml. Los animales se sedan ligeramente antes de las manipulaciones. Se toman muestras de sangre (recogidas en EDTA) antes y 5, 15, 30, 60, 240 y 1.440 minutos luego de la inyección. El hematocrito (Hct) se determina para cada muestra. Las muestras se reparten en alícuotas y se almacenan a -20°C antes del análisis.

Análisis de Sueros de Conejo

[0171] El colesterol total en el plasma, los triglicéridos en el plasma y los fosfolípidos en el plasma se determinan enzimáticamente usando ensayos comercialmente disponibles, por ejemplo, de acuerdo con los protocolos del fabricante (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania y Biomerieux, 69280, Marcy-L'etoile, Francia).

[0172] Los perfiles de lipoproteína en el plasma de las fracciones obtenidas, luego de la separación del plasma en sus fracciones de lipoproteína, pueden determinarse agitando en una gradiente de densidad de sacarosa. Por ejemplo, se recogen las fracciones y los niveles de fosfolípido y colesterol pueden medirse por análisis enzimático convencional en las fracciones correspondientes a las densidades de lipoproteína VLDL, ILDL, LDL y HDL.

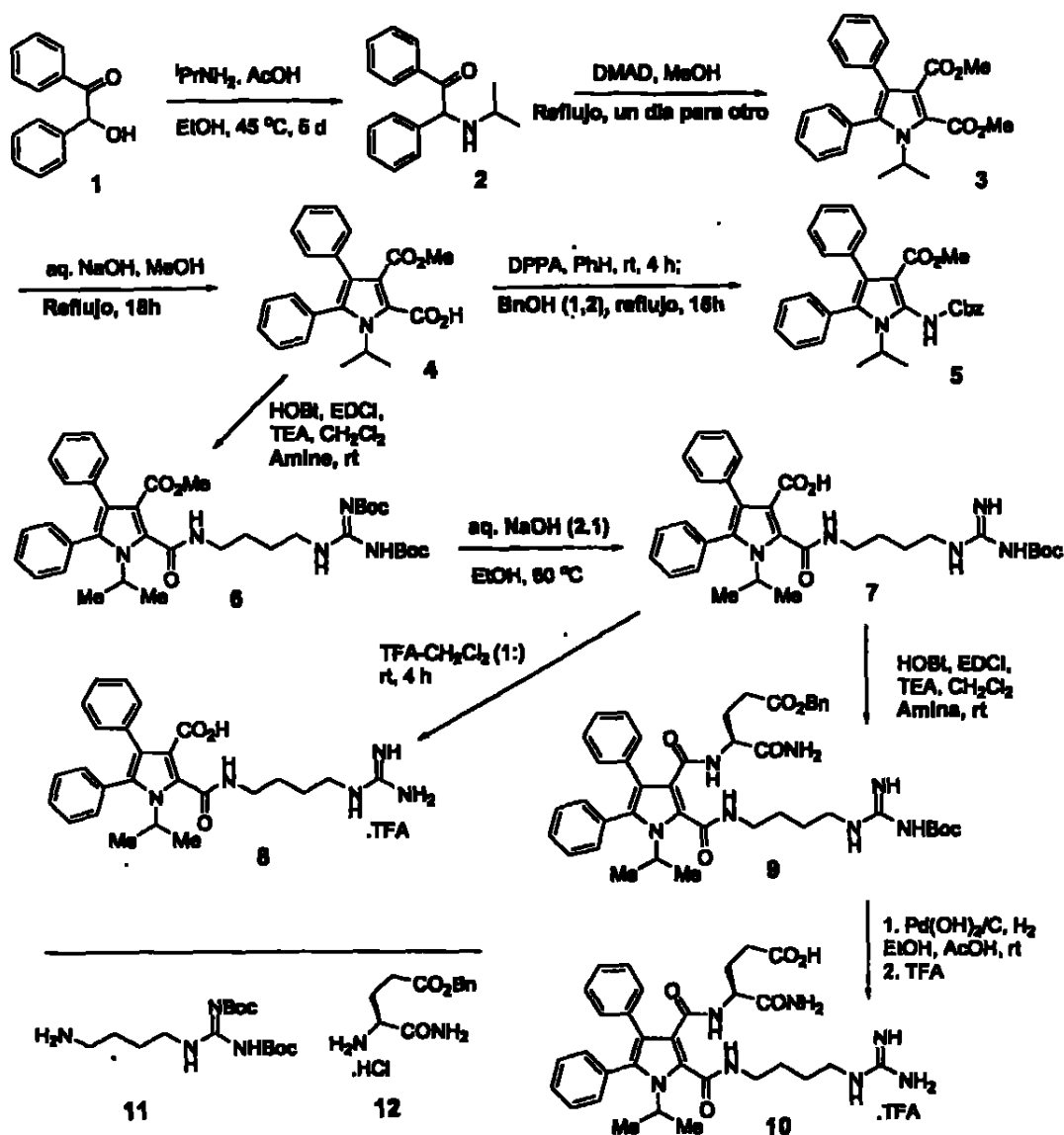
Síntesis de Mediadores de RCT que Llevan Aminoácidos Modificados o Bioisósteros de Grupo Molecular o Bioisósteros de Grupo Funcional

Síntesis de Secuencia de Péptido Modificado con Grupo Lipofílico Basada en Atorvastatina

Métodos Analíticos Generales

[0173] Todos los reactivos eran de calidad comercial. Los disolventes se secaron y purificaron por métodos estándar. Los derivados de aminoácido se obtuvieron de fuentes comerciales. Se realizó TLC analítica en hojas de aluminio recubiertas con una capa de 0.2 mm de gel de sílice 60 F₂₅₄, Merck, y TLC preparativa se llevó a cabo en placas de vidrio de 20 cm × 20 cm recubiertas con una capa de 2 mm de gel de sílice PF₂₅₄, Merck. Se utilizó gel de sílice 60 (230-400 tamaño de malla), Merck, para cromatografía de destello. Se tomaron los puntos de fusión en un aparato micro-hot-stage y no se corrigieron. Se registraron los espectros ¹H NMR con un espectrómetro Bruker 400, que operaba a 400 MHz, usando TMS o disolvente como referencia. Se llevaron a cabo análisis elementales en NuMega Resonance Laboratories, San Diego. Se realizó HPLC preparativa de fase reversa (Glison) de los productos finales en una columna Phenomenex Luna 5μ C₁₈ (2) (60 mm × 21.2 mm) con una velocidad de flujo de 15 mL/minutos, usando un detector UV ajustable a 254 nm. Mezclas de CH₃CN y H₂O se utilizaron como fases móviles en modo gradiente (CH₃CN = 5 % - 95 %). Se llevó a cabo análisis por LC/UV/ELSD/MS usando un instrumento API 150 EX de PE Sciex. Se efectuaron experimentos ESI-MS, en modo positivo.

Esquema 12

2-(Isopropilamino)-1,2-difeniletanona (2)

[0174] A una solución de benjúl (8.0 g, 37.7 mmol) en EtOH (150 mL) se agregó isopropilamina (2.45 g, 41.5 mmol), seguido por AcOH glacial (unas pocas gotas). La reacción se calentó a 45°C durante 5 días. Se retiraron los materiales volátiles en un evaporador rotatorio y se secaron *in vacuo*. El material crudo se utilizó en la siguiente reacción.

Dimetil 1-isopropil-4,5-difenil-1H-pirrol-2,3-dicarboxilato (3)

[0175] Dimetil acetilendicarboxilato (DMAD, 7.0 g, 57 mmol) se agregó a la amina anterior 2 (8.0 g, 32 mmol) en MeOH (100 mL) y la

reacción se calentó a reflujo de un día para otro bajo argón. La mezcla de reacción se enfrió en un baño helado y se filtró. Los sólidos se lavaron con MeOH frío (20 mL) y se secaron para proporcionar pirrol 3 como un polvo blanco (9.8 g, 82%).

Ácido 3-(metoxycarbonil)-1-isopropil-4,5-difenil-1H-pirrol-2-carboxílico
(4)

[0176] Al diéster 2 (6.12 g, 16.1 mmol) se agregaron MeOH (100 mL) y 1 M NaOH (acuoso, 17.05 mL). La mezcla se calentó a reflujo durante 18 horas. Los volátiles se retiraron en un evaporador rotatorio. El residuo se absorbió en agua (100 mL) y se extrajo con éter (2 × 50 mL) y se reservó para obtener el material de partida sin reaccionar. La fase acuosa se acidificó con 4 M HCl a pH ~3 y se extrajo con éter (3 × 60 mL), se lavó con agua (50 mL) y se secó (Na₂SO₄). Luego de la evaporación y el secamiento, se obtuvo el monoácido 4 (5.02 g, 85%) como un sólido blanco.

Bencil 3-(metoxycarbonil)-1-isopropil-4,5-difenil-1H-pirrol-2-il-carbamato
(5)

[0177] A una solución del monoácido anterior 4 (0.1 g, 0.27 mmol) en benceno (3 mL), se agregaron trietilamina (45 µL, 0.33 mmol) y difenilfosforilazida (DPPA, 0.091 g, 0.33 mmol) y se agitaron a temperatura de la sala durante 4 horas. Luego se agregó alcohol bencílico (35 µL, 33 mmol) y la mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 15 horas. Se dejó enfriar la reacción a temperatura de la sala y se agregó 5 % NaHCO₃ (5 mL) y se extrajo con éter (2 × 10 mL). Luego de la concentración, produjo el carbamato 5.

Metil 2-(4-(N,N'-di(Boc)guanidinil)butilcarbamoil)-1-isopropil-4,5-difenil-1H-pirrol-3-carboxilato (6)

[0178] A una solución del ácido 4 (0.1 g, 0.27 mmol) en CH₂Cl₂ (3 mL), se agregaron EDCI (0.053 g, 0.27 mmol), HOBT (0.037 g, 0.27 mmol), Et₃N (38 µL, 0.27 mmol) y amina 11 (0.086 g, 0.26 mol) en ese orden y se agitaron de un día para otro. La reacción se diluyó con CH₂Cl₂ (10 mL) y se

lavó con NaHCO_3 saturado (5 mL), salmuera (5 mL) y se secó (Na_2SO_4) para obtener amida 6 (0.165 g, 88.8%) como un sólido blanco.

Ácido 2-(4-(N(Boc)guanidinil)butilcarbamoil)-1-isopropil-4,5-difenil-1H-pirrol-3-carboxílico (7)

[0179] Al éster 6 (0.16 g, 0.237 mmol) se agregaron MeOH (10 mL) y 1 M NaOH (acuoso, 1.0 mL). La mezcla se calentó a reflujo durante 18 horas. Los volátiles se retiraron en un evaporador rotatorio. El residuo se absorbió en agua (10 mL), se acidificó con 4 M HCl a pH ~3 y se extrajo con éter (3×10 mL), se lavó con agua (10 mL) y se secó (Na_2SO_4). Luego de la evaporación y el secamiento, se obtuvo el ácido 7 (0.121 g, 91%).

Ácido 2-(4-(guanidinil)butilcarbamoil)-1-isopropil-4,5-difenil-1H-pirrol-3-carboxílico. TFA (8)

[0180] A una solución del anterior compuesto Boc-prottegido 7 (0.10 g, 0.178 mmol) en CH_2Cl_2 (3 mL) se agregó ácido trifluoroacético (3 mL) y se agitó a temperatura de la sala durante 4 horas. Los volátiles se retiraron en un evaporador rotatorio. Cromatografía de fase reversa ($\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}/0.1$ % TFA) del crudo proporcionó el producto deseado 8 (0.075 g, 91 %) como sal de ácido trifluoroacético.

(S)-(4-(N3-(1-carbamoil-3-carbobenciloxipropil)-1-isopropil-4,5-difenil-1H-pirrol-2,3-dicarboxamido)butil)-N-(Boc)guanidina (9)

[0181] A una solución del ácido 7 (0.132 g, 0.23 mmol) en CH_2Cl_2 (10 mL), se agregaron EDCI (0.051 g, 0.23 mmol), HOBt (0.032 g, 0.23 mmol), Et_3N (65 μL , 0.23 mmol) y amina 12 (0.061 g, 0.22 mol) en ese orden y se agitaron a temperatura de la sala de un día para otro. La reacción se diluyó con CH_2Cl_2 (10 mL) y se lavó con NaHCO_3 saturado (5 mL), salmuera (5 mL) y se secó (Na_2SO_4) para obtener la amida sólida blanca 6 (0.127 g, 69 %).

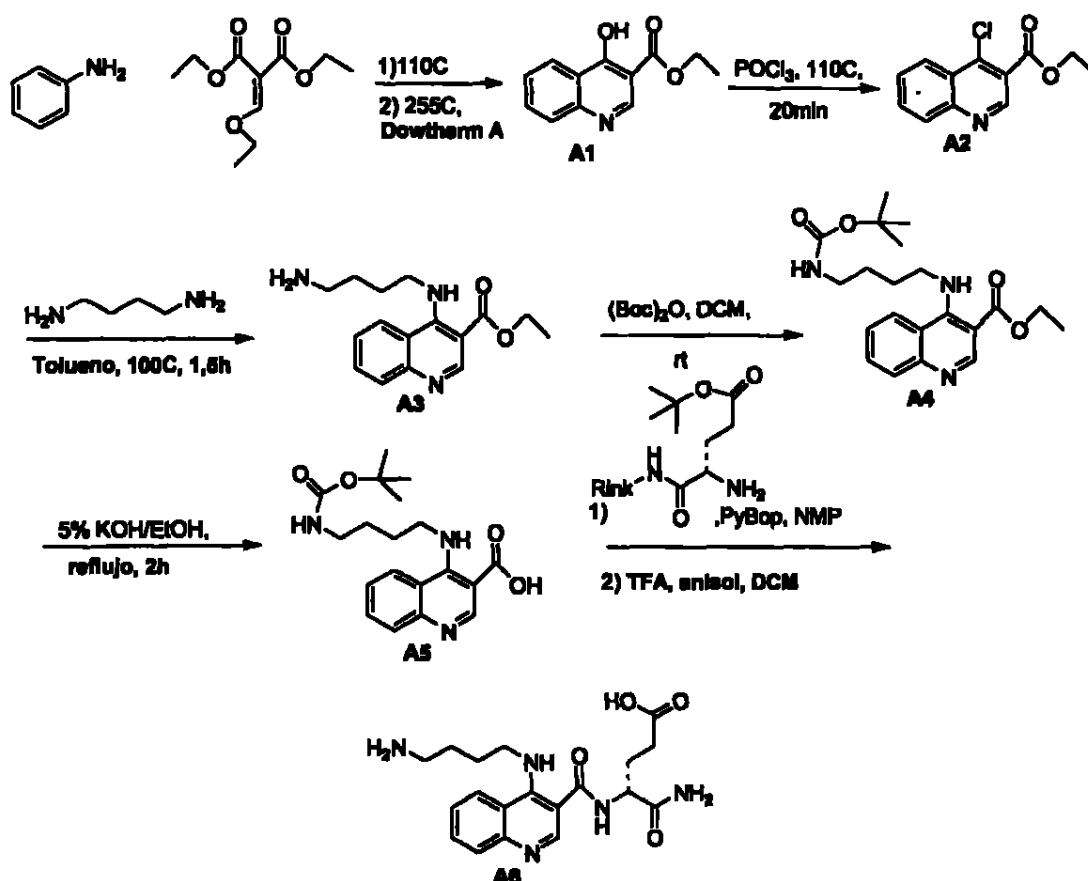
(S)-(4-(N3-(1-carbamoil-3-carboxipropil)-1-isopropil)-4,5-difenil-1H-pirrol-2,3-dicarboxamido)butil)guanidina. TFA (10)

[0182] A una solución del éster bencílico 9 (0.02 g, 0.025 mmol) en EtOH (10 mL), se agregaron ácido acético (0.1 mL) y 10 % $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$

(0.01 g) y se agitaron a temperatura de la sala bajo hidrógeno (balón). Luego de agitar durante la noche, la reacción se filtró, se lavó con EtOH y se evaporó para obtener el crudo, el cual se tomó en TFA (2 mL) y se agitó a temperatura de la sala durante 4 horas. Luego de la evaporación y purificación por cromatografía de fase reversa ($\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}/0.1\%$ TFA) se obtuvo el producto deseado como sal de ácido trifluoroacético.

Síntesis de Secuencia de Péptido Modificado con Grupo Lipofílico Basado en Nisvastatina

Esquema A



Esquema A

Etil 4-hidroxiquinolin-3-carboxilato (A1)

[0183] Anilina (2.15g, 23mmol) y dietil etoximetilen malonato (5g, 23mmol) se mezclaron puros y se calentaron a 110°C durante 2 horas, luego se enfriaron y se dejaron reposar a temperatura de la sala durante 15 horas. Durante este tiempo la mezcla de reacción cristalizó.

[0184] Dowtherm A (70 mL) se calentó a 255°C y los cristales fundidos se agregaron y la mezcla se calentó a 255°C durante 20 minutos. La mezcla se vertió entonces en un recipiente de acero inoxidable enfriado a 0°C con un baño helado. Se agregaron hexanos a la solución fría para precipitar el producto, el cual se recogió por filtración y se enjuagó con otra porción de hexanos. El producto se recrystalizó de EtOH para proporcionar el producto como un sólido blanco (1.6g, 7.3mmol, 32%, M.P. 309°C), que se utilizó sin purificación posterior en el siguiente paso.

Etil 4-cloroquinolin-3-carboxilato (A2)

[0185] A etil 4-hidroxiquinolin-3-carboxilato sólido (A1) (1.5g, 7mmol) se agregó POCl₃ (2.2g, 1.3mL, 14mmol) y la mezcla se calentó a 110°C durante 20 minutos. La mezcla se vertió en NH₃ (acuoso, 28-30%) y hielo y luego se agitó hasta volverse granular. La mezcla de hielo fundida se extrajo con éter (3x40mL) y las capas orgánicas combinadas se secaron (MgSO₄), se filtraron y se concentraron para proporcionar el producto como un aceite que cristalizó al reposar (1.44g, 6mmol, 87%), que se utilizó tal como estaba sin purificación posterior.

Etil 4-(4-aminobutilamino)quinolin-3-carboxilato (A3)

[0186] A una solución de etil 4-cloroquinolin-3-carboxilato (A2) (0.5g, 2.1mmol) en tolueno (10mL) se agregó diaminobutano (10x, 1.85g, 21mmol) y la mezcla se calentó a 110°C durante 1.5 hora. Durante este tiempo se formó una sal, que se retiró por filtración mientras estaba caliente, y el filtrado se concentró bajo presión reducida para producir un aceite. Se agregó agua y la mezcla se extrajo con DCM (2x25mL). Las capas orgánicas combinadas se secaron (MgSO₄), se filtraron y se concentraron para producir un aceite que cristalizó al reposar (476mg, 1.66mmol, 79%), que se utilizó en pasos subsiguientes sin purificación posterior.

terc-Butil 4-(3-(etoxicarbonil)quinolin-4-ilamino)butilcarbarnato (A4)

[0187] A una solución de etil 4-(4-aminobutilamino)quinolin-3-carboxilato (A3) en DCM (60mL) se agregó di-terc-butil dicarbonato y la mezcla se agitó a temperatura de la sala durante 8 horas. La mezcla se lavó

con 2M Na₂CO₃ (20mL), agua (20mL), NaCl saturado (20mL), se secó (MgSO₄), se filtró, y se concentró para proporcionar el producto como un aceite amarillo (4g), que se utilizó, tal como estaba, en el paso subsiguiente.

Ácido 4-(4-*tert*-butoxicarbonilamin-butilamino)-quinolin-3-carboxílico (A5)

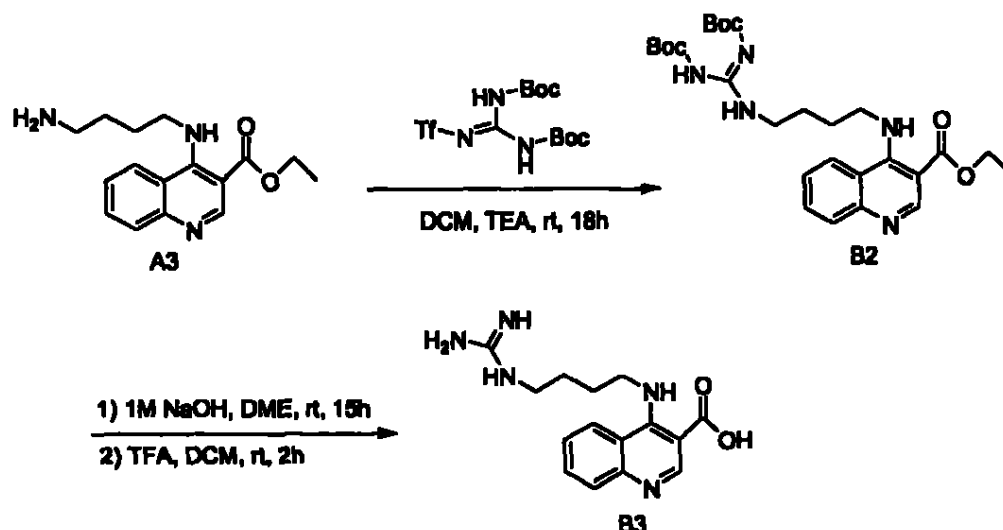
[0188] Una solución de *tert*-butil 4-(3-(etoxicarbonil)quinolin-4-ilamino)butilcarbamato (A4) en KOH etanólico (5%, 100mL) se hizo refluir durante 2 horas y luego se concentró bajo presión reducida. El residuo se disolvió en agua (25mL) y se usó HCl (20%) para ajustar la mezcla resultante a pH 8. Apareció un sólido y se recogió por filtración y el sedimento resultante se lavó con agua y se secó bajo vacío para proporcionar el producto como un polvo blanco (2.763g), que se utilizó en el siguiente paso.

Ácido 4-{[4-(4-aminobutilamino)-quinolin-3-carbonil]-amino}-4-carbamoil-butírico (A6)

[0189] *Tert*butil éster de ácido D-glutámico ligado a resina MBHA de amida de Rink (2g, 1.32 mmol), ácido 4-(4-*tert*-butoxicarbonilamin-butilamino)-quinolin-3-carboxílico (A5) (2 equivalentes, 950mg, 2.64 mmol), y PyBop (1.4g, 2.64mmol) se agregaron a un matraz de fondo redondo de 50mL, secado a la llama. Se agregó NMP (25mL) y la solución se agitó durante 18 horas a temperatura de la sala. La mezcla se filtró y se enjuagó sucesivamente con DCM, MeOH alternando 3x cada uno y se secó con aire. Las microesferas resultantes se suspendieron en TFA (10mL) y se agregó anisol (0.2mL) y se agitó a temperatura de la sala durante 1 hora. El sólido se extrajo por filtración y el filtrado se concentró bajo presión reducida para producir un aceite. La purificación usando HPLC de fase reversa usando ACN/H₂O/0.1 %TFA (gradiente de 5% a 95% ACN) proporcionó el producto como un sólido blanco luego de la liofilización (127mg, 0.33mmol, 13%). MP 108°C, ¹H NMR (400MHz) 58.96 (d, J=7.6Hz, 1H), 8.72 (br s, 1H), 8.58 (d, J=8.4Hz, 1H), 7.94 (m, 2H), 7.71 (m, 4H), 7.63 (s, 1H), 7.18 (s, 1H), 4.35 (m, 1H), 2.81 (br s, 2H), 2.37 (m,

2H), 2.07-2.00 (serie de m, 2H), 1.75 (m, 2H), 1.60 (m, 2H) EIMS m/z M^{+} 388.7. Anal. $C_{19}H_{25}N_5O_4 + 2 \text{ TFA} + 2 \text{ H}_2\text{O}$

Esquema B



Esquema B

Etil éster de ácido 4-(4-bis-boc-guanidino-butilamin)-quinolin-3-carboxílico (B2)

[0190] A una solución de 1,3-Di-boc-2-(trifluorometilsulfonyl) guanidina (391mg, 1mmol) en DCM seco (4mL) se agregó etil 4-(4-aminobutilamino)quinolin-3-carboxilato (A3) (0.3g, 1.05mmol) puro y la mezcla se agitó a temperatura de la sala durante 15 horas. La mezcla se diluyó con DCM y se lavó con 2M NaHSO_4 (20mL), NaHCO_3 saturado (20mL), NaCl saturado (20mL), se secó (MgSO_4), se filtró y se concentró para proporcionar el producto como una espuma blanca (225mg), que se utilizó en el estado en que estaba en el paso subsiguiente.

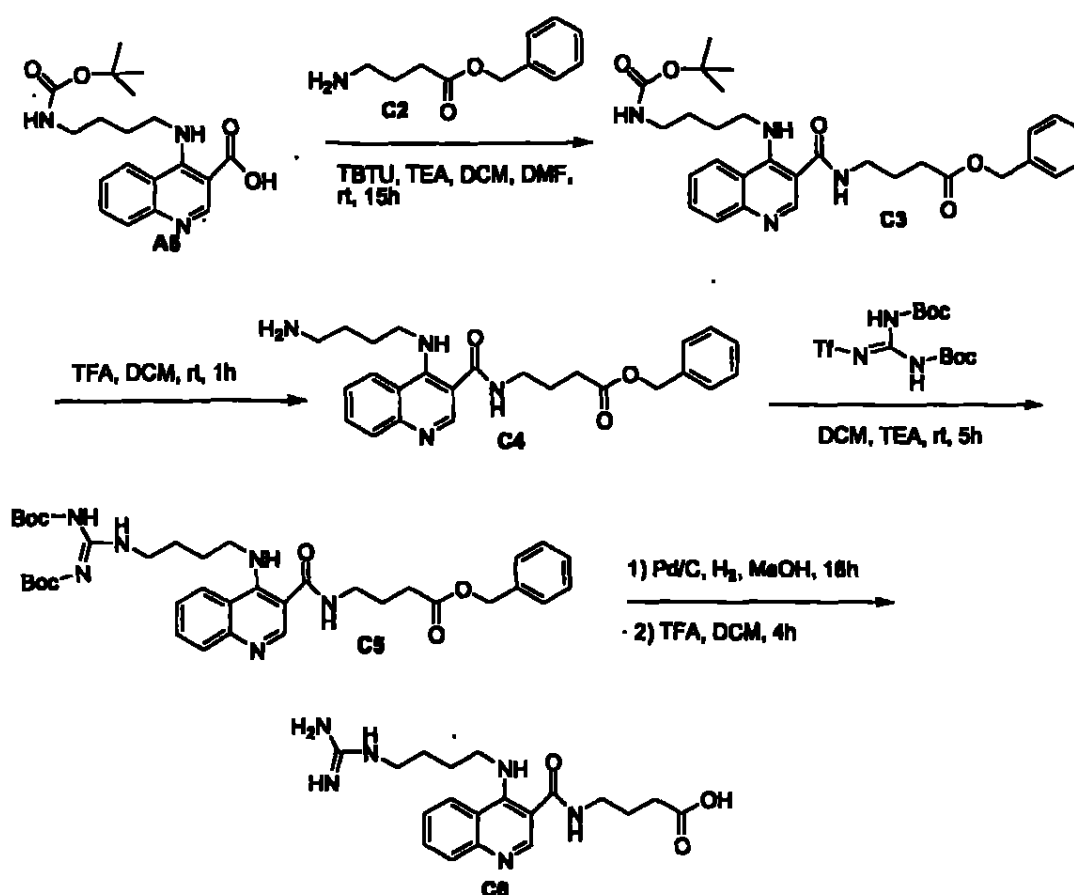
Ácido 4-(4-guanidino-butilamin)quinolin-3-carboxílico (B3)

[0191] A una solución de etil éster de ácido 4-(4-Bis-boc-guanidino-butilamin)-quinolin-3-carboxílico (B2) (255mg, 0.43 mmol) en DME (2mL) se agregó 1M NaOH (2mL) y la solución se agitó a temperatura de la sala durante 6 horas. A esta solución se agregaron 2 gotas de 20% solución de KOH y se continuó la agitación durante 15 horas. La solución se concentró a un 1/3 del volumen y se ajustó el pH a pH 6 con 1

M HCl, y las ppt blancas resultantes se recogieron por filtración y se secaron para proporcionar el producto como un sólido blanco (0.132g, 0.26mmol, 61%)

[0192] A una solución del sólido blanco (152mg, 0.27mmol) en DCM (2mL) se agregó TFA (2mL) y la mezcla se agitó a temperatura de la sala durante 2 horas. La mezcla se concentró bajo presión reducida y el residuo resultante se purificó por HPLC de fase reversa, H₂O/ACN/0.1%TFA (5% -95%ACN) y las fracciones resultantes se concentraron por liofilización para proporcionar el producto como un sólido blanco (43mg, 0.1mmol, 34%). MP-98°C, ¹H NMR (400MHz) δ 8.82 (s, 1H), 8.49 (d, J=8.4Hz, 1H), 8.08 (s, 1H), 7.86 (m, 2H), 7.56 (t, J=7.6, 7.2Hz, 4H), 7.31 (br s, 4H), 3.98 (s, 2H), 3.20 (d, J=5.6Hz, 3H), 1.75 (dd, J=6.4, 36.4Hz, ELMS m/z M⁺ 302.3. Anal. C₁₃H₁₉N₃O₂ + 1 TFA + 2 H₂O

Esquema C



Esquema C

Éster bencílico de ácido 4-{[4-(4-*terc*-butoxicarbonilamino-butilamino)-quinolin-3-carbonil]-amino}-butírico (C3)

[0193] A una suspensión de ácido 4-(4-*terc*-butoxicarbonilaminobutilamino)-quinolin-3-carboxílico (A5) (0.5g, 1.4mmol) en DCM (20mL) se agregó TBTU (1.1 equivalentes, 1.53mmol, 482mg) y la solución se agitó y se agregó DMF (20mL) después de 8 horas. Luego de 28 horas de agitación continua la solución se aclaró, y se agregó TEA (155mg, 0.213mL, 1.53mmol) seguido por bencil 4-aminobutanoato (C2) (1.1equivalente, 0.559g, 1.53mmol) y la mezcla se agitó durante 15 horas. El DCM se retiró bajo presión reducida y el resto se diluyó con agua. Esta solución acuosa se extrajo con éter (3x50mL) y luego DCM (3x50mL). Las capas orgánicas se combinaron, se secaron (MgSO₄), se filtraron, y se concentraron. El residuo se purificó por cromatografía de destello sobre sílice usando DCM/MeOH (9:1) para proporcionar el producto como un aceite (0.484g) de pureza suficiente para uso en los siguientes pasos.

Éster bencílico de ácido 4-{[4-(4-amino-butilamino)-quinolin-3-carbonil]-amino}-butírico (C4)

[0194] A una solución de éster bencílico de ácido 4-{[4-(4-*terc*-butoxicarbonilamino-butilamino)-quinolin-3-carbonil]-amino}-butírico (C3) (0.454mg, 0.9mmol) en DCM (10mL) se agregó TFA (4mL) y la mezcla se agitó durante 1 hora. La solución se concentró, se neutralizó con NaHCO₃ saturado, y se extrajo con DCM. Las capas orgánicas se combinaron, se secaron (MgSO₄), se filtraron, y se concentraron bajo presión reducida para proporcionar el producto como un aceite claro (227mg, 0.52mmol).

Éster bencílico de ácido 4-{[4-(4-bis-Boc-guanidino-butilamino)-quinolin-3-carbonil]-amino}-butírico (C₅)

[0195] A una solución de éster bencílico de ácido 4-{[4-(4-amino-butilamino)-quinolin-3-carbonil]-amino}-butírico (C4) (227mg, 0.52mmol) en DCM (7mL) se agregó TEA (53mg, 0.72mL) seguido por 1,3-Di-boc-2-(trifluorometilsulfonyl)guanidina (204mg, 0.52mmol) y la mezcla se agitó a temperatura de la sala durante 5 horas. La solución orgánica se diluyó con

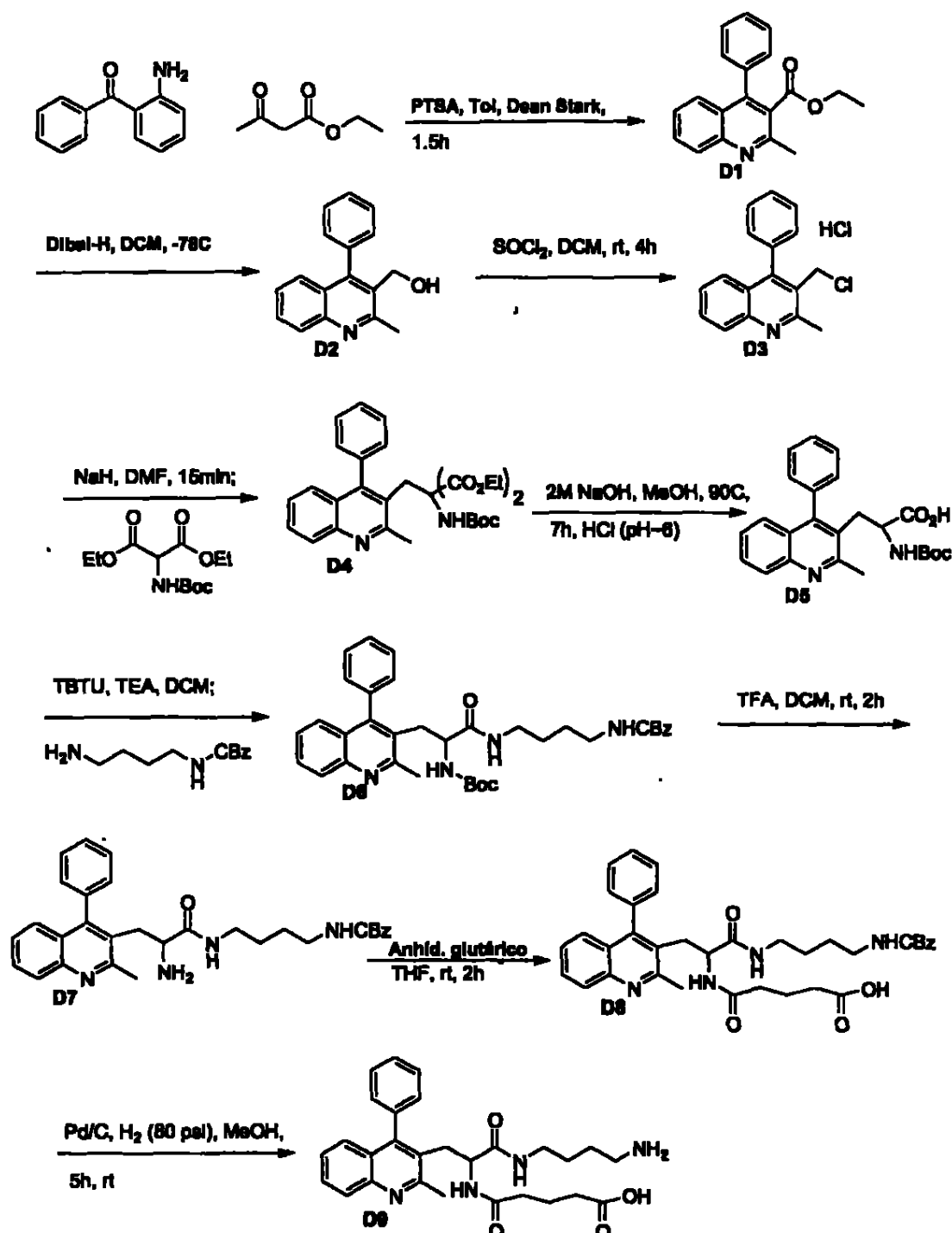
más DCM, se lavó con 2M NaHSO₄ (25mL), NaHCO₃ (25mL), se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró bajo presión reducida para proporcionar el producto como una espuma blanca (305mg), que se utilizó tal como estaba.

Ácido 4-{{[4-(4-guanidino-butilamino)-quinolin-3-carbonil]-amino}-butírico (C6)}

[0196] A una solución de éster bencílico de ácido 4-{{[4-(4-bis-Boc-guanidino-butilamino)-quinolin-3-carbonil]-amino}-butírico (C5) (305mg) in MeOH (10mL) se agregó Pd/C (10 % en peso, 10 % p/p, 30mg) y la mezcla se purgó por vacío 5x con gas H₂ y se agitó bajo H₂ durante 18 horas. El Pd/C se retiró por filtración a través de celita y el filtrado se concentró bajo presión reducida para proporcionar un residuo de espuma blanca.

[0197] El residuo anterior se disolvió en DCM (5mL) y se agregó TFA (5mL) y la mezcla se agitó a temperatura de la sala durante 4 horas. Los disolventes se retiraron bajo presión reducida y el residuo se trituró con éter. El aceite resultante se purificó por HPLC de fase reversa usando ACN/H₂O/TFA (0.1%) como eluyente (gradiente de 5%-95% ACN) para proporcionar el producto como un sólido higroscópico sólido (70mg, 0.018mmol). MP no determinado, ¹H NMR (400MHz) δ 9.86 (br s, 1H), 8.92 (t, J=5.2, 5.6Hz, 1H), 8.56 (d, J=8.8Hz, 1H), 7.91 (m, 2H), 7.76 (t, J=5.6, 5.6Hz, 1H), 7.68 (m, 1H), 7.37-7.06 (br m, 4H), 3.29 (m, 6H), 3.12 (q, J=6.4, 12.8Hz), 2.33 (t, J=7.2, 7.2Hz, 2H), 1.76 (m, 4H), 1.54 (m, 2). EIMS m/z M⁺ 387.5. Anal. No determinado.

Esquema D



Esquema D

Etil 2-metil-4-fenilquinolin-3-carboxilato (D1)

[0198] A una solución de 2-aminobenzofenona (10g, 51mmol) y etilacetoacetato (5.3g, 63.8mmol, 8mL) en tolueno (100mL) se agregó PTSA (0.3g) y la mezcla de reacción se calentó a reflujo usando un aparato Dean Stark durante 1.5 horas, cuando no se detectó más agua. El disolvente

se retiró bajo presión reducida y el residuo recrystalizó de EtOH para proporcionar el producto como cristales amarillo claro (8.14g, 28mmol).

(2-Metil-4-fenilquinolin-3-il)metanol (D2)

[0199] A una solución de etil 2-metil-4-fenilquinolin-3-carboxilato (D1) (5g, 17.2mmol) en DCM (50mL) a -78°C se agregó gota a gota 1M Dibal-H (2.5 equivalentes, 43mmol, 43mL) en DCM y la agitación se continuó a esta temperatura durante 1.5 horas. Una solución de Na₂SO₄ (6.1g, 43mmol) en agua (10mL) se agregó cuidadosamente a -78°C y la mezcla se dejó calentar a temperatura de la sala y se agitó durante 1 hora. El sólido se extrajo por filtración y se enjuagó con EtOAc caliente. Los filtrados se combinaron y se concentraron bajo presión reducida para proporcionar el producto como un residuo sólido amarillo (3.62g, 14.5mmol)

3-(Clorometil)-2-metil-4-fenilquinolina (D3)

[0200] A una solución de (2-metil-4-fenilquinolin-3-il)metanol (D2) en DCM (50mL) se agregó SOCl₂ (10.4mL, 17g, 140mmol) y la mezcla se agitó a temperatura de la sala durante 4 horas. La mezcla se concentró bajo presión reducida para producir una sal HCl del cloruro como un sólido amarillo (2.266g). El producto se almacenó como la sal HCl y se convirtió en la base libre tratando con NaHCO₃ saturado y extrayendo con éter.

tert-Butil 1,1-di(etoxicarbonil)-2-(2-metil-4-fenilquinolin-3-il)etilcarbamato (D4)

[0201] A una solución de 3-(clorometil)-2-metil-4-fenilquinolina (D3) (0.958g, 3.6mmol) como la base libre en DMF (12mL) se agregó una solución DMF (40mL) de *tert*-butil di(etoxicarbonil)etilcarbamato (4.32mmol, 1.19g), que se había deprotonado tratando con NaH (4.32mmol, 104mg) durante 15 minutos. Esta mezcla se agitó de un día para otro y luego se concentró bajo presión reducida, se disolvió en H₂O y la solución se extrajo con éter (3x50mL). Los extractos se combinaron, se secaron (MgSO₄), se filtraron, se concentraron bajo presión reducida para

proporcionar el producto como un aceite marrón, que se usó tal como estaba.

Ácido 2-*terc*-butoxicarbonilamino-3-(2-metil-4-fenil-quinolin-3-il)-propiónico (D5)

[0202] A una solución de *terc*-butil 1,1-di(etoxicarbonil)-2-(2-metil-4-fenilquinolin-3-il)etilcarbamato (D4) (0.85g, 1.7mmol) en MeOH (10mL) se agregó 2M NaOH (2.1 equivalentes, 1.8mL) y la mezcla se calentó a 90°C durante 7 horas. El disolvente se retiró bajo presión reducida y el residuo se diluyó con agua. La mezcla resultante se ajustó a pH 5.5 usando 20% HCl acuoso y la solución blanca lechosa se extrajo con EtOAc (3x50mL), se secó (MgSO₄), se filtró, y se concentró para proporcionar el producto como una espuma marrón (0.404g, 1 mmol), que se utilizó tal como estaba.

Fenil éster de ácido (3-[2-*terc*-butoxicarbonilamin-3-(2-metil-4-fenil-quinolin-3-il)-propionilamino]-propil}-carbámico (D6)

[0203] A una solución de ácido 2-*terc*-butoxicarbonilamino-3-(2-metil-4-fenil-quinolin-3-il)-propiónico (D5) (200mg, 0.5mmol) en DCM (15mL) se agregó TBTU (1.1 equivalentes, 174mg, 0.54mmol) y TEA (2 equivalentes, 1.08mmol, 110mg, 150uL) y la mezcla se dejó agitar a temperatura de la sala durante 10 minutos. A esta mezcla se agregó fenil 4-aminobutilcarbamato (1.1equivalentes, 0.54mmol, 140mg) y la mezcla se agitó a temperatura de la sala durante 4 horas. Se agregó agua y la capa orgánica se separó, se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró para proporcionar un residuo amarillo. El residuo se purificó sobre sílice usando primero 2% DCM/MeOH, luego 4% DCM/MeOH, luego 8% DCM/MeOH, 250mL cada uno para proporcionar el producto como un aceite amarillo (228mg).

Fenil éster de ácido (3-[*amino*-3-(2-metil-4-fenil-quinolin-3-il)-propionilamino]-butil}-carbámico (D7).

[0204] A una solución de fenil éster de ácido {3-[2-*terc*-butoxicarbonilamin-3-(2-metil-4-fenil-quinolin-3-il)-propionilamino]-

154

propil}-carbámico (D6) (220mg, 0.36mmol) en DCM (5mL) y se agregó una mezcla de TFA/DCM (3.5mL/5mL), y la mezcla se agitó a temperatura de la sala durante 2 horas. El disolvente se retiró bajo presión reducida y el residuo se absorbió en EtOAc (50mL) y se lavó con NaHCO₃ saturado (35mL), agua (2x25mL), se secó (MgSO₄), se filtró, y se concentró para proporcionar el producto como un aceite amarillo claro (161mg, 0.32mmol, 88%).

Ácido 4-[2-(2-metil-4-fenil-quinolin-3-il)-1-(4-fenoxicarbonil amino-butil carbamoil)-etilcarbamoil]-butírico (D8)

[0205] A una solución de fenil éster de ácido {3-[-amino-3-(2-metil-4-fenil-quinolin-3-il)-propionilamino]-butil}-carbámico (D7) (161mg, 0.32mmol) en THF se agregó anhídrido glutárico (1.5 equivalentes, 0.5mmol, 57mg) y la solución se agitó a temperatura de la sala durante 2 horas. El disolvente se retiró bajo presión reducida y el residuo se absorbió en EtOAc (25mL) y se lavó con agua, se secó (MgSO₄), se filtró, y se concentró para proporcionar el producto como un aceite anaranjado claro que solidificó lentamente (213mg), el cual se utilizó, en el estado en que se encontraba, sin caracterización adicional.

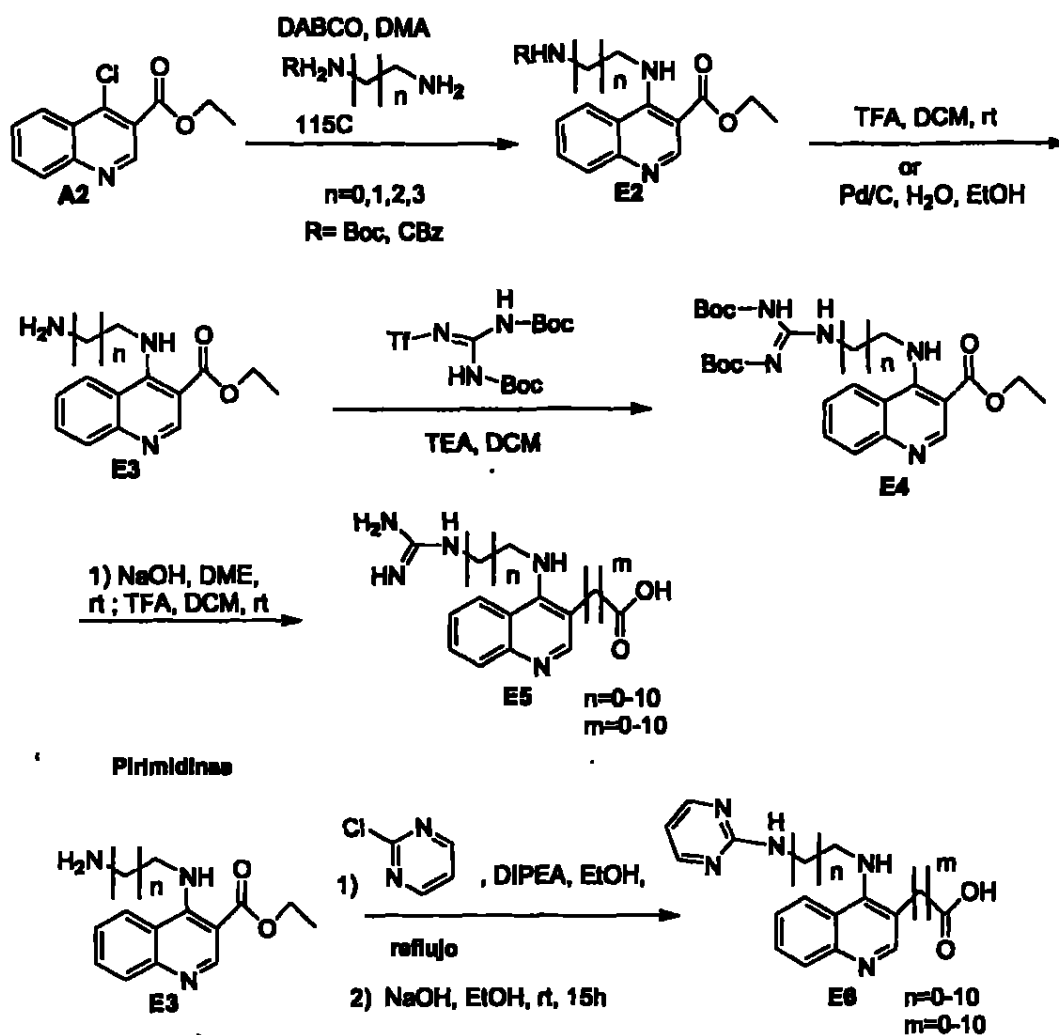
Ácido 4-[1-(4-amino-butilcarbamoil)-2-(2-metil-4-fenil-quinolin-3-il)-etil carbamoil]-butírico (D9)

[0206] A una solución de ácido 4-[2-(2-metil-4-fenil-quinolin-3-il)-1-(4-fenoxicarbonil amino-butil carbamoil)-etil carbamoil]-butírico (D8) (213mg, 0.34mmol) en MeOH (10mL) y THF (5mL) se agregó Pd/C y se puso en un agitador Parr a 80 psi gas H₂ durante 5 horas. El Pd/C se retiró por filtración a través de celita y se concentró. El residuo resultante se purificó usando HPLC de fase reversa que utilizaba H₂O/ACN (5-95%ACN), lo cual proporcionó el producto como un sólido blanco después de la liofilización (13.3mg). MP 129°C, ¹H NMR (400MHz) δ 7.91 (m, 2H), 7.64 (m, 2H), 7.54 (m, 4H), 7.36 (m, 2H), 7.26 (d, J=6.4Hz, 1H), 7.08 (d,

155

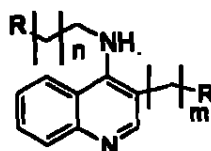
J=8Hz, 1H), 4.352 (m, 1H), 3.1-2.6 (series de m, 8H), 2.03 (m, 4H), 1.55 (m, 2H), 1.22 (m, 4H). EIMS m/z M^{+1} 491.7. Anal. $C_{28}H_{34}N_4O_4 + 3H_2O$

Esquema E



Primidinas

Modificaciones sintéticas propuestas



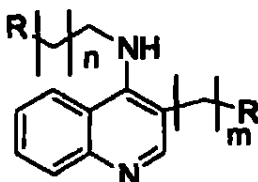
R = Grupos básicos o grupos ácidos, sus Bioisómeros, aminas o amidas.
 $n = 0,1, 2,3,4...$ etc.
 $m = 0, 1, 2, 3,4...$ etc.

Esquema E

Etil éster de ácido 4-(5-benciloxycarbonilamino-pentilamino)-quinolin-3-carboxílico (E2, $n=4$)

[0207] A una solución de etil 4-cloroquinolin-3-carboxilato (A2) (1g, 4.26mmol) en DMA (20mL) se agregó N-CBz-diaminopentano (1.4g, 5.1mmol) y DABCO (1.4g, 13mmol) y la solución se calentó a 115°C durante 2.5 horas. El DMA se retiró bajo presión reducida y el residuo se suspendió en agua y se extrajo con éter (3x25mL), se secó (MgSO₄), se filtró, y se concentró para proporcionar el producto como un aceite marrón claro (1.88g, 4.3mmol), que se utilizó tal como estaba.

Modificaciones sintéticas propuestas



R= Grupos básicos o grupos ácidos,
sus ésteres, aminas o amidas.
n=0,1,2,3,4...etc.
m=0,1,2,3,4...etc.

Etil éster de ácido 4-(5-amino-pentilamino)-quinolin-3-carboxílico (E3, n=4)

[0208] A una solución de etil éster de ácido 4-(5-bencilloxycarbonilamino-pentilamino)-quinolin-3-carboxílico (E2, n=4) (1.88g, 4.3mmol) en EtOH (30mL) se agregó Pd/C (180mg, 10% en peso Pd) y la mezcla se agitó bajo gas H₂ durante 3 días rellenando el balón como fuera necesario. Se retiró el catalizador filtrando a través de celita y se concentró para proporcionar el producto como un aceite color miel (1.3g, 4.2mmol), que se utilizó tal como estaba sin purificación posterior.

Etil éster de ácido 4-(5-bis-Boc-guanidino-pentilamino)-quinolin-3-carboxílico (E4, n=4)

[0209] A una solución de etil éster de ácido 4-(5-amino-pentilamino)-quinolin-3-carboxílico (E3, n=4) (0.64g, 2.1mmol) en DCM seco (10mL) se agregó TEA (322ul, 233mg) y 1,3-Di-boc-2-(trifluorometilsulfonil)guanidina (1.1 equivalentes, 0.9g, 2.31mmol) y la mezcla se agitó a temperatura de la sala durante 2.5 horas. La solución se diluyó con más DCM y se lavó con 2M NaHSO₃ (20mL), NaHCO₃ saturado

(20mL), NaCl saturado, se secó (Na_2SO_4), se filtró y se concentró para proporcionar el producto como una espuma blanca (1.2g, 2.1mmol), que se utilizó tal como estaba.

Ácido 4-(5-guanidino-pentilamino)-quinolin-3-carboxílico (E5, n=4)

[0210] A una solución de etil éster de ácido 4-(5-bis-Boc-guanidino-pentilamino)-quinolin-3-carboxílico (E4, n=4) (1.2g, 2.1mmol) en DME (20mL) se agregó 1M NaOH (15mL) y la mezcla se agitó a temperatura de la sala durante 2 días. La mezcla se concentró para retirar el DME y la mezcla acuosa restante se ajustó a pH~5-6 con HCl (20% acuoso). El sólido resultante se recogió por filtración y se secó con aire.

[0211] El sólido crudo se suspendió en DCM (15mL) y se agregó TFA (3.5mL) y la mezcla se agitó a temperatura de la sala durante 2.5 horas. Se agregó más TFA y la solución se agitó durante 3.5 horas y luego se concentró. El residuo se suspendió en agua y se agregó 2M Na_2CO_3 para ajustar a pH~7-8 y el sólido resultante se recogió por filtración y se secó bajo vacío. El crudo se purificó por HPLC de fase reversa sobre C18 usando $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}/0.5\%\text{TFA}$ para proporcionar el compuesto como un sólido blanco luego de la liofilización (40mg, 0.09mmol) como la sal mono TFA. MP 72°C, ^1H NMR (400MHz) δ 8.79 (s, 1H), 8.48 (d, J=8.8Hz, 1H), 7.86 (m, 2H), 7.78 (m, 1H), 7.55 (m, 1H), 7.24 (br s, 4H), 3.94 (m, 3H), 3.14 (d, J=6.4, 6.8Hz, 2H), 1.77 (m, 2H), 1.55 (m, 4H) EIMS m/z M^{+1} 316.3. Anal. $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O} + 1\text{TFA}$

Ácido 4-(3-guanidino-propilamino)-quinolin-3-carboxílico (E5, n=2)

[0212] Este compuesto se elaboró en una manera similar al ácido 4-(5-guanidino-pentilamino)-quinolin-3-carboxílico (E5, n=4) usando t-butil éster de ácido n-(3-aminopropil)-carbámico y desprotegiendo con TFA. MP 231°C, ^1H NMR (400MHz) δ 10.48 (m, 1H), 9.52 (br s, 1H), 9.00 (s, 1H), 8.20 (d, J=8.4Hz, 1H), 7.75 (d, J=8.4Hz, 1H), 7.60 (t, J=6.8, 8.4Hz, 2H), 7.35 (t, J=7.6, 8Hz, 2H), 3.75 (m, 3H), 3.22 (t, J=7.2, 7.2Hz, 2H), 1.90 (m, 2H) EIMS m/z M^{+1} 288.4. Anal. $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$

Ácido 4-(2-guanidino-etilamino)-quinolin-3-carboxílico (E5, n=1)

158

[0213] Este compuesto se elaboró en una manera similar al ácido 4-(5-guanidino-pentilamino)-quinolin-3-carboxílico (E5, n=4) usando n-Boc-etilen diamina y desprotegiendo con TFA. MP 267°C, ¹H NMR (400MHz) 68.77 (s, 1H), 8.42 (d, J=8.4Hz, 1H), 7.84 (m, 3H), 7.57 (t, J=8.4Hz, 7.2Hz 1H), 7.28 (br s, 3H), 4.08 (br s, 2H). EIMS *m/z* M⁺ 274.5. Anal. C₁₃H₁₅N₅O₂ + 2H₂O + 1TFA

Pirimidinas

Ácido 4-[3-(pirimidin-2-il-amino)-propilamino]-quinolin-3-carboxílico (E6, n=2, R=H)

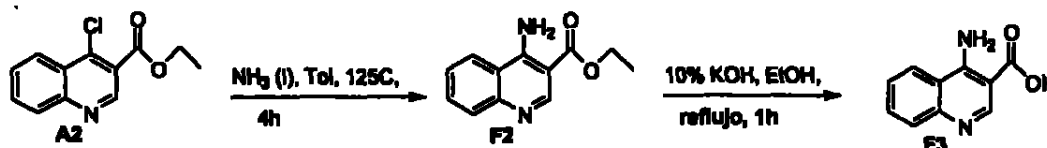
[0214] A una solución de etil éster de ácido 4-(3-amino-propilamino)-quinolin-3-carboxílico (E3, n=2, 177mg, 0.65mmol) en EtOH (35mL) se agregó DIPEA (1mmol, 129mg, 173uL) y 2-cloropirimidina (90mg, 0.78mmol) y la mezcla se calentó a reflujo durante 15 horas. La solución se concentró y se absorbió en EtOH (15mL) y se agregó 1M NaOH (5mL) y la solución se agitó durante 15 horas. La mezcla se concentró y el residuo se ajustó a pH~5 usando 20% HCl. El sólido resultante se recogió y se purificó en HPLC de fase reversa, ACN/H₂O 5-95% en C18 para proporcionar el producto como un sólido blanco luego de la liofilización (135mg). MP 269°C. ¹H NMR (400MHz) 58.47 (d, J=8.8Hz, 1H), 8.19 (d, J=4.8Hz, 2H), 7.80 (m, 2H), 7.50 (m, 1H), 7.26 (m, 1H), 6.52 (t, J=4.4, 5.2Hz, 1H), 3.99 (m, 2H) 2.00 (m, 2H). EIMS *m/z* M⁺ 324.5. Anal. C₁₇H₁₇N₅O₂ + 1H₂O + 1TFA

Etil éster de ácido 4-[5-(pirimidin-2-il-amino)-pentilamino]-quinolin-3-carboxílico (E6, n=4, R=CH₂CH₃)

[0215] A una solución de etil éster de ácido 4-(5-amino-pentilamino)-quinolin-3-carboxílico (E3, n=4, 505mg, 1.7mmol) en EtOH (20mL) se agregó DIPEA (323mg, 2.5mmol, 435uL) y 2-cloropirimidina (231mg, 2mmol) y la mezcla se calentó a reflujo durante 15 horas. La mezcla se concentró y el residuo se purificó por HPLC de fase reversa, C18, ACN/H₂O, 5-95% para proporcionar el producto como un sólido amarillento blancuzco (135mg, 0.36mmol, 21%). MP 108°C ¹H NMR

(400MHz) δ 8.92 (m, 1H), 8.83 (s, 1H), 8.34 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 8.19 (d, $J=4.8$ Hz, 2H), 7.8 (m, 1H), 7.71 (m, 1H), 7.44 (m, 1H), 7.09 (t, $J=6$, 5.6Hz, 1H), 6.50 (t, $J=4.8$, 4.8Hz, 1H), 3.68 (m, 2H), 3.22 (q, $J=6.8$, 12.8Hz, 2H), 1.68 (m, 2H), 1.52 (m, 2H), 1.41 (m, 2H). EIMS m/z M^{+1} 380.5. Anal. $C_{21}H_{25}N_5O_2$

Esquema F



Esquema F

Etil éster de ácido 4-amino-quinolin-3-carboxílico (F2)

[0216] A una solución de etil-4-cloro quinolin-3-carboxilato (A2, 1.44g, 0.6mmol) en tolueno (10mL) se agregó NH_3 condensado y la mezcla se selló en un bombo de acero y se calentó a 125°C durante 4 horas. El bombo se enfrió y el sólido blanco resultante se recogió por filtración de vacío y se secó para proporcionar el producto (1.5g).

Ácido 4-amino-quinolin-3-carboxílico (F3)

[0217] A una solución de etil éster de ácido 4-amino-quinolin-3-carboxílico (F2) (250mg, 1.2mmol) en EtOH (5mL) se agregó 20% KOH (10mL) y la mezcla se calentó a reflujo durante 1 hora. El EtOH se retiró bajo presión reducida y la solución acuosa se ajustó a pH~6.5-7 usando 20%HCl. El sólido blanco se recogió y se secó para proporcionar el producto, (161mg). El producto se cristalizó de EtOH y se secó. MP 305°C. ^1H NMR (400MHz) δ 8.89 (s, 1H), 8.42 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 7.83 (m, 2H), 7.60 (m, 1H). EIMS m/z M^{+1} 189.4. Anal. $C_{10}H_8N_2O_2 + 0.5 H_2O$

[0218] Muchas modificaciones y variaciones de las incorporaciones descritas en esta solicitud pueden hacerse sin apartarse del ámbito, como es evidente para aquellas personas expertas en el arte. Las incorporaciones específicas descritas en esta solicitud se ofrecen a modo de ejemplo únicamente.

REFERENCIAS CITADAS (e incorporadas en esta solicitud por referencia a ellas):

- Alam et al. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 15641-15649
- Anantharamaiah et al. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 10248-10255
- Anantharamaiah et al. (1987) *J. Lipid Res.* 29, 309-318
- Anantharamaiah et al. (1990) *Arteriosclerosis*, 10, 95-105
- Arai et al. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 2366-2371
- Argraves et al. (1997) *J. Clin. Invest.* 100, 2170-2181
- Austin et al. (1988) *JAMA*, 260, 1917-1921
- Austin et al. (1990) *Circulation*, 82, 495-506
- Banka et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 10288-10297
- Barbaras et al. (1987) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 142, 63-69
- Barter P (2000) *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.* 20, 2029
- Berneis and Krauss (2002) *J. Lipid Res.* 43, 1363-1379
- Bhatnagar A. (1999) in *Lipoproteins and Health Disease*, pp. 737-752, Arnold, Loudon
- Bolibar et al. (2000) *Thromb. Haemost.* 84, 955-961
- Boren et al. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 9214-9218
- Brouillette and Anantharamaiah (1995) *Biochim. Biophys. Acta.* 1256, 103-129
- Brunzell JD (1995) in *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disorders*, pp. 1913-1932, McGraw-Hill, Inc., New York
- Buchko et al. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 3039-3045
- Camejo et al. (1985) *Atherosclerosis*, 55, 93-105
- Campos et al. (1992) *Arteriosclerosis Thrombosis*, 12, 187-193
- Canner et al. (1986) *JACC*, 8, 1245-1255
- Cao et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 39561-39565
- Castelli et al. (1986) *JAMA*, 256, 2835-2838
- Castro and Fielding (1998) *Biochemistry*, 27, 25-29
- Chait et al. (1993) *Am. J. Med.* 94, 350-356
- Chambenoit et al. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 9955-9960;
- Chang et al. (1997) *Annu Rev Biochem.* 66, 613-638

- Chapman et al. (1998) *Eur Heart J, Suppl A*: A24-30
- Chen and Albers (1985) *Biochim Biophys. Acta*, 836, 275-285
- Chen et al. (2000) *J Biol. Chem.* 275, 30794-30800
- Cohen et al. (1999) *Curr Opin Lipidol.* 10, 259-268
- Collet et al. (1997) *J. Lipid Res.* 38, 634-644
- Collet et al. (1999) *J. Lipid Res.* 40, 1185-1193
- Curtiss and Boisvert (2000) *Curr. Opin. Lipidol.* 11, 243-251
- Datta et al. (2001) *J. Lipid Res.* 42, 1096-1104
- Davis et al. (2002) *J. Lipid Res.* 43, 533-543
- de Graaf et al. (1993) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 76, 197-202
- Downs et al. (1998) *JAMA*, 279, 1615-1622
- Duverger et al. (1996) *Circulation*, 94, 713-717
- Ehnholm et al. (1998) *J Lipid Res.* 39, 1248-1253
- Epand et al. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 9389-9396
- Eriksson et al. (1999) *Circulation*, 100, 594-598
- Fan et al. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 40071-40079
- Fidge NH (1999) *J. Lipid Res.* 40, 187-201
- Fielding et al. (1994) *Biochemistry*, 33, 6981-6985
- Fitch WM (1977) *Genetics*, 86, 623-644
- Fogelman et al. (2003) United States Patent Application Publication, US 2003/0045460 A1
- Föger et al. (1996) *Arterioscler Thromb Vase Biology*, 16, 1430-1436
- Föger et al. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 36912-36920
- Frank and Marcel (2000) *J. Lipid Res.* 41, 853-872
- Frick et al. (1987) *N. England J. Medicine*, 317, 1237-1245
- Fuskushima et al. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 10651-10657
- Gamble et al. (1978) *J. Lipid Res.* 16, 1068-1070
- Garber et al. (1992) *Arteriosclerosis and Thrombosis*, 12, 886-894
- Garber et al. (2001) *J. Lipid Res.* 42, 545-552
- Garcia et al. (1996) *Biochemistry*, 35, 13064-13071
- Genest et al. (1991) *Am J Cardiol.* 67, 1185-1189
- Genest et al. (1992) *Circulation*, 85, 2025-2033

- Genest et al. (1999) *J. Invest. Med.* 47, 31-42
- Gibbons et al. (1995) *Am. J Med.* 99, 378-385
- Gillotte et al. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 2021-2028
- Glomset JA (1968) *J. Lipid Res.* 9, 155-167
- Goldberg I. (1996) *J. Lipid Res.* 37, 693-707
- Golder-Novoselsky et al. (1995) *Biochim. Biophys. Acta*, 1254, 217-220
- Goldstein and Brown (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 5153-5162
- Gordon et al. (1989) *N Engl. J. Med.* 321, 1311-1315
- Gotto AM (2001) *Circulation*, 103, 2213
- Griffin et al. (1994) *Atherosclerosis*, 106, 241-253
- Groen et al. (2001) *J. Clin. Invest.* 108, 843-850
- Hajjar and Haberland (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 22975-22978
- Hara and Yokoyama (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 3080-3086
- Hedrick et al. (2001) *J. Lipid Res.* 42, 563-570
- Huang et al. (1995) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biology*, 15, 1412-1418
- Huang et al. (1997) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17, 2010-2015
- Hulley et al. (1998) *JAMA*, 280, 605-613
- Huuskonen and Ehnholm (2000) *Curr. Opin. Lipidol.* 11, 285-289
- Huuskonen et al. (2000) *Atherosclerosis*, 151, 451-461
- Ikewaki et al. (1993) *J Clin. Invest.* 92, 1650-1658
- Ikewaki et al. (1995) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biology*, 15, 306-312
- Ishigami et al. (1994) *J. Biochem. (Tokyo)* 116, 257-262
- Jaakkola et al. (1993) *Coron. Artery Dis.* 4, 379-385
- Jauhianen et al. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 4032-4036
- Jiang et al. (1996) *J. Clin. Invest.* 98, 2373-2380
- Jiang et al. (1999) *J. Clin. Invest.* 103, 907-914
- Jonas A (1991) *Biochim. Biophys. Acta*, 1084, 205-220
- Jones et al. (1998) *Am. J. Cardiol.* 81, 582-587
- Kaiser and Kézdy (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 1137-1140
- Kanellis et al. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 11464-11472
- Kawano et al. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 29477-29481
- Kozarsky et al. (2000) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biology*, 20, 721-727

- Krauss and Burke (1981) *J. Lipid Res.* 23, 97-104
- Krieger M. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 4077-4080
- La Belle and Krauss (1990) *J. Lipid Res.*, 31, 1577-1588
- Lindholm et al. (1998) *Biochemistry*, 37, 4863-4868
- Liu and Krieger (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 34125-34135
- Lund-Katz et al. (1993) In "*Peptides: Chemistry and Biology*" (R. Haughten, ed.) ESCOM Press, Leiden, The Netherlands
- Lusa et al. (1996) *Biochem. J.* 313, 275-282
- Main et al. (1996) *Biochim Biophys Acta*, 29, 17-24
- Marotti et al. (1993) *Nature*, 364, 73-75
- Martin-Jadraque et al. (1996) *Arch. Intern. Med.* 156, 1081-1088
- Marzal-Casacuberta et al. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 6720-6728
- Matsumoto et al. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 16778-16782
- McLachlan AD (1977) *Nature*, 267, 465-466
- McLean et al. (1991) *Biochemistry*, 30, 31-37
- McManus et al. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 5043-5051
- Mendez et al. (1994) *J. Clin. Invest.* 94, 1698-1705
- Meng et al. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 8588-8596
- Merkel et al. (2002) *J. Lipid Res.* 43, 1997-2006
- Miccoli et al. (1997) *J. Lipid Res.* 38, 1242-1253
- Miettinen et al. (1997) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biology*, 17, 3021-3032
- Miller et al. (1987) *Am Heart J.* 113, 589-597
- Milner et al. (1991) *Biochim Biophys Acta*, 26, 1082, 71-78
- Mishra et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 7185-7191
- Mishra et al. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 1602-1611
- Mishra et al. (1998) *Biochemistry*, 37, 10313-10324
- Morton RE (1999) *Curr Opin Lipidol.* 10, 321-327
- Nagano et al. (2002) *J. Lipid Res.* 43, 1011-1018
- Naito HK (1985) *Ann. NY Acad. Sci.* 454, 230-238
- Nakagawa et al. (1985) *J. Am. Chem. Soc.* 107, 7087-7092
- Ohnishi and Yokoyama (1993) *Biochemistry*, 32(19), 5029-5035
- Oka et al. (2000) *Clin. Chem.* 46, 1357-1364

- Oka et al. (2000) *J. Lipid Res.* 41, 1651-1657
- Oka et al. (2002) *J. Lipid Res.* 43, 1236-1243
- Okamoto et al. (2000) *Nature*, 13, 406 (6792): 203-7
- Oram and Lawn (2001) *J. Lipid Res.* 42, 1173-1179
- Oram and Yokoyama (1997) *J. Lipid Res.* 37, 2473-2491
- Packard and Shepherd (1997) *Arteriosclerosis, Thromb, Vasc. Biology*, 17, 3542-3556
- Palgunachari et al. (1996) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16, 328-338
- Plump et al. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 9607-9611
- Ponsin et al. (1986a) *J. Biol. Chem.* 261, 9202-9205
- Ponsin et al. (1986b) *J. Clin. Invest.* 77, 559-567
- Pownall et al. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77(6), 3154-3158
- Pownall et al. (1985) *Biochim. Biophys. Acta*, 833, 456-462
- Puchois et al. (1987) *Atherosclerosis*, 68, 35-40
- Pussinen et al. (1997) *J. Lipid Res.* 38, 12-21
- Pussinen et al. (1998) *J. Lipid Res.* 39, 152-161
- Qin et al. (2000) *J. Lipid Res.* 41, 269-276
- Ramsamy et al. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 33480-33486
- Remaley et al. (1997) *Arterioscler Thromb. Vasc. Biology*, 17, 1813-1821
- Reschly et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 9645-9654
- Riemens et al. (1998) *Atherosclerosis*, 140, 71-79
- Riemens et al. (1999) *J. Lipid Res.* 40, 1459-1466
- Rinninger et al. (1998) *J. Lipid Res.* 39, 1335-1348
- Ross R. (1993) *Nature*, 362, 801-809
- Rothblat et al. (1999) *J. Lipid Res.* 40, 781-796
- Rubin et al. (1991) *Nature*, 353, 265-267
- Rubins, et al. (1999) *N. Engl. J Med.* 341, 410-418
- Santamarina-Fojo and Dugi (1994) *Curr. Opin. Lipidol.* 5, 117-125
- Santamarina-Fojo et al. (2000) *Curr. Opin. Lipidol.* 11, 267-275
- Schissel et al. (1996) *J. Clin. Invest.* 98, 1455-1464
- Second Report of the Expert Panel (1994) *Circulation*, 89, 1329-1445
- Segrest et al. (1983) *Journal Biol Chem.* 258, 2290-2295

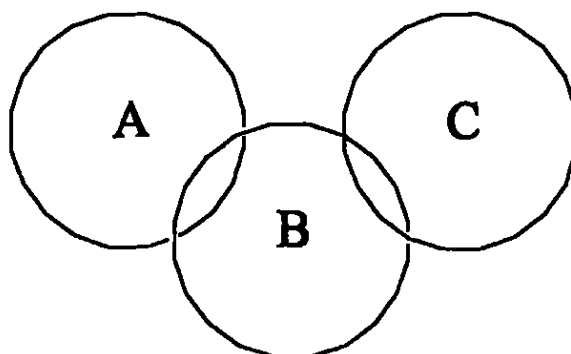
165

- Segrest et al. (1994) *Advances in Protein Chem.* 45, 303-369
- Segrest et al. (2001) *J. Lipid Res.* 42, 1346-1367
- Segrest JP (1974) *FEBS Lett.* 38, 247-253
- Settasation et al. (2000) *J. Biol. Chem.* 276, 26898-26905
- Shaefer EJ (1994) *Eur. J. Clin. Invest.* 24, 441-443
- Shatara et al. (2000) *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 78, 367-371
- Shepherd et al. (1995) *N. Engl. J. Med.* 333, 1301-1307
- Sorci-Thomas et al. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 2665-2670
- Sorci-Thomas et al. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 12156-12163
- Sparks et al. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 25839-25847
- Sparrow et al. (1981) In: "*Peptides: Synthesis-Structure-Function*," Roch and Gross, Eds., Pierce Chem. Co., Rockford, IL. 253-256
- Sparrow et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 10021-10027
- Srinivas et al. (1990) *Virology*, 176, 48-57
- Stein and Stein (1999) *Atherosclerosis*, 144, 285-303
- Steiner et al. (1987) *Circulation*, 75, 124-130
- Steinmetz and Utermann (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 2258-2264
- Sviridov et al. (1996) *Biochemistry*, 35, 189-196
- Sviridov et al. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 19707-19712
- Sviridov et al. (2000) *J. Lipid Res.* 41, 1872-1882
- Swinkels et al. (1989) *Arteriosclerosis*, 9, 604-613
- Tall and Wang (2000) *J. Clin. Invest.* 106, 1205-1207
- Tall et al. (2000) *Arterioscler. Thromb, Vasc. Biol.* 20, 1185-1188
- Tall et al. (2001) *J. Clin. Invest.* 108, 1273-1275
- Tall et al. (2001) *J. Clin. Invest.* 108, 1273-1275
- Tangirala et al. (1999) *Circulation*, 100, 1816-1822
- Temel et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 26565-26572
- The BIP study group (2000) *Circulation*, 102, 21-27
- The International Task Force for Prevention of Coronary Heart Disease (1998) *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 8, 205-271
- Thuahnai et al. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 43801-43808
- Tribble et al. (1992) *Atherosclerosis*, 93, 189-199

- Trigatti et al. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 9322-9327
- Tu et al. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 23098-23105
- Utermann et al. (1984) *Eur. J. Biochem.* 144, 325-331
- Vakkilainen et al. (2002) *J. Lipid Res.* 43, 598-603
- van Eck et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99, 6298-6303
- Venkatachalapathi et al. (1993) *Proteins*, 15, 349-359
- von Eckardstein A. (1996) *Curr Opin Lipidol* 7, 308-319
- von Eckardstein and Assmann (2000) *Curr Opin Lipidol.* 11, 627-637
- von Eckardstein et al. (1995) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15, 690-701
- von Eckardstein et al. (1996) *Biochim. Biophys. Acta*, 1301, 255-262
- von Eckardstein et al. (2001) *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.* 21, 13
- Webb et al. (2002) *J. Lipid Res.* 43, 1890-1898
- Whayne et al. (1981) *Atherosclerosis*, 39, 411-424
- Yamashita et al. (1991) *Metabolism*, 40, 756-763
- Yamazaki et al. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 5847-5853
- Zhong et al. (1994) *Peptide Research*, 7(2): 99-106
- (1984) *JAMA*, 251, 365-374

LO QUE SE REIVINDICA ES:

1. Un mediador de transporte inverso de colesterol, que contiene la estructura:



en donde A, B y C pueden estar en cualquier orden, y en donde:

A comprende una fracción ácida, que contiene un grupo ácido o su bioisómero;

B comprende una fracción aromática o lipófila, que contiene por lo menos una porción de inhibidor de HMG CoA reductasa o su análogo; y

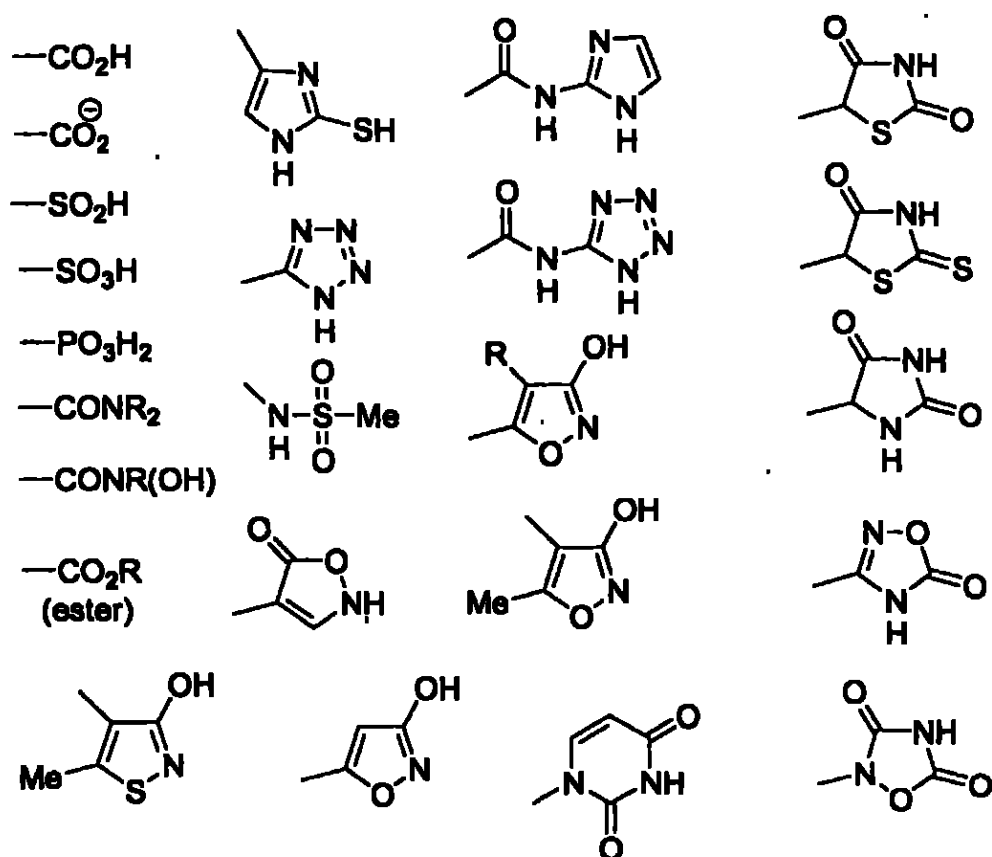
C comprende una fracción básica, que contiene un grupo básico o su bioisómero.

2. El mediador de la reivindicación 1, en donde por lo menos uno de los grupos alfa amino o alfa carboxi se han eliminado de sus respectivas fracciones de terminal amino o carboxi.

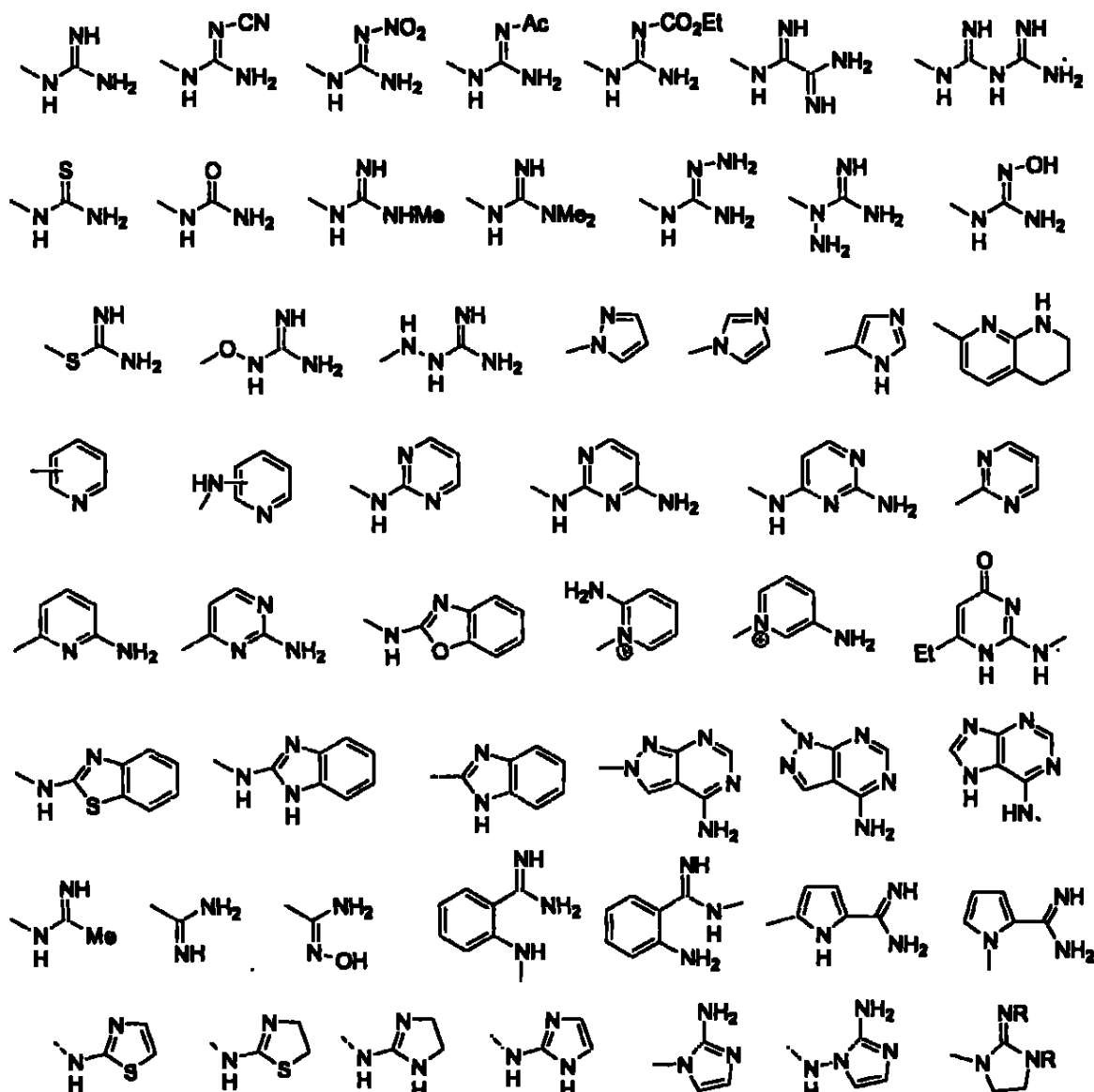
3. El mediador de la reivindicación 1 ó 2, en donde si no se elimina, el grupo alfa amino se tapona con un grupo protector seleccionado del grupo conformado por formilo, acetilo, fenilacetilo, benzoilo, pivolilo, 9-fluorenilmetiloxycarbonilo, ácido 2-naftílico, ácido nicotínico, un $\text{CH}_3\text{—}(\text{CH}_2)_n\text{—CO—}$ donde n varía de 1 a 20, di-*terc*-butil-4-hidroxi-fenilo, naftilo, naftilo sustituido, Fmoc, bifenilo, fenilo sustituido, heterociclos sustituidos, alquilo, arilo, arilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo fusionado, heteroarilo saturado, y heteroarilo saturado sustituido.

4. El mediador de la reivindicación 1 o 2, en donde si no se elimina, el grupo alfa carboxi se tapona con un grupo protector seleccionado del grupo conformado por una amina, tal como RNH₂ donde R = H, di-*tert*-butil-4-hidroxi-fenilo, naftilo, naftilo sustituido, Fmoc, bifenilo, fenilo sustituido, heterociclos sustituidos, alquilo, arilo, arilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo fusionado, heteroarilo saturado, y heteroarilo saturado sustituido.

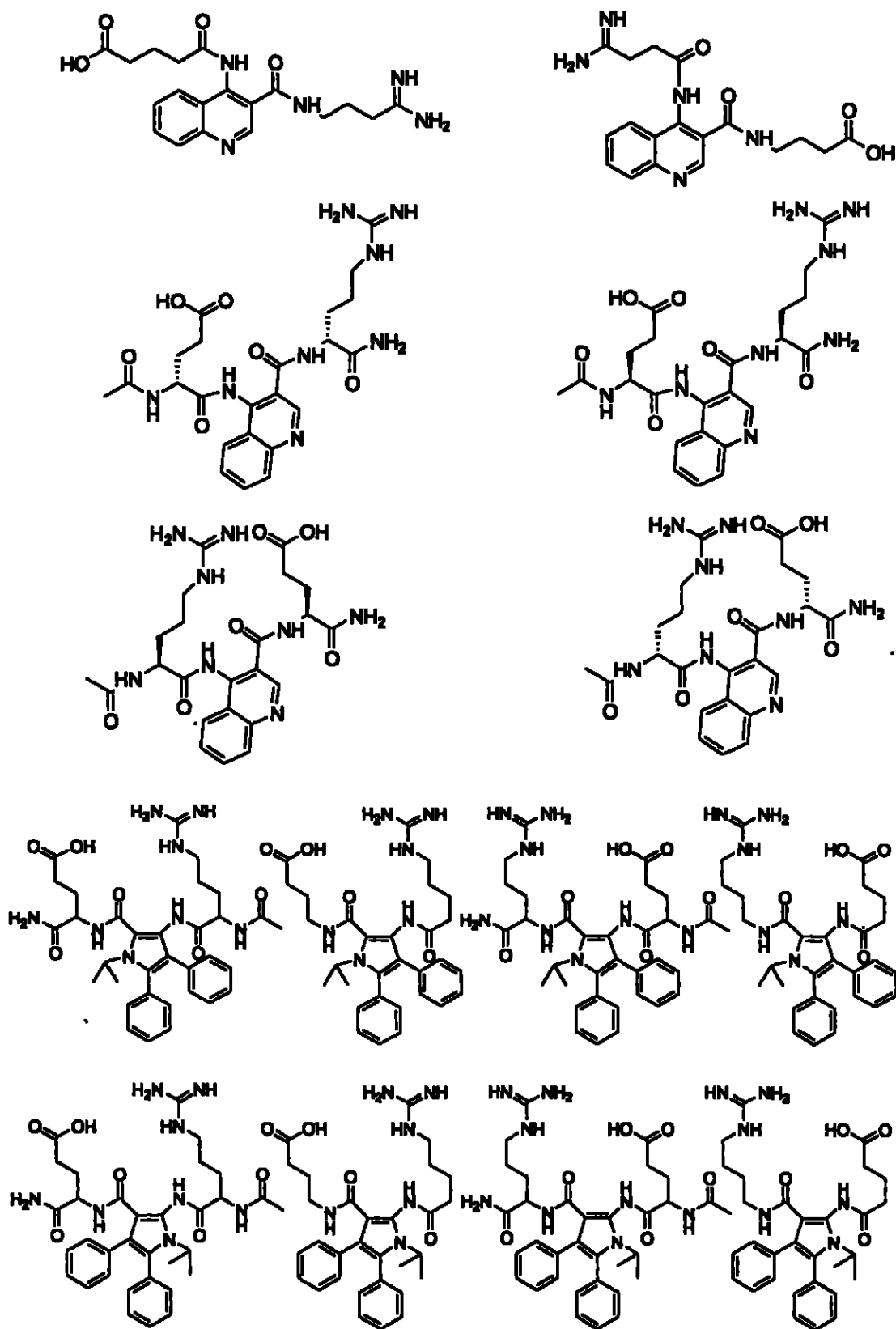
5. El mediador de la reivindicación 1, en donde el bioisótero del grupo ácido se selecciona del grupo conformado por:

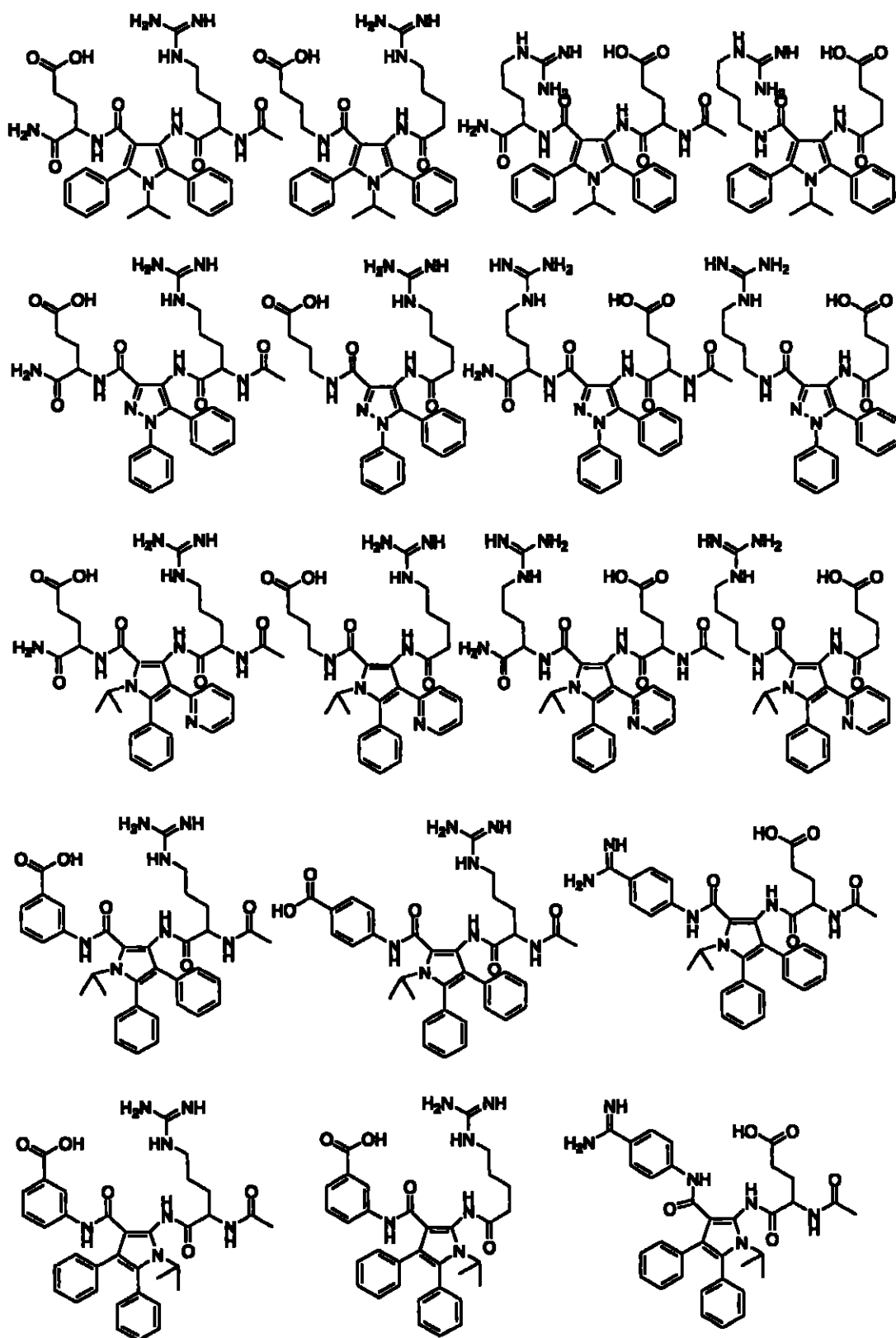


6. El mediador de la reivindicación 1, en donde el bioisótero del grupo básico se selecciona del grupo conformado por:

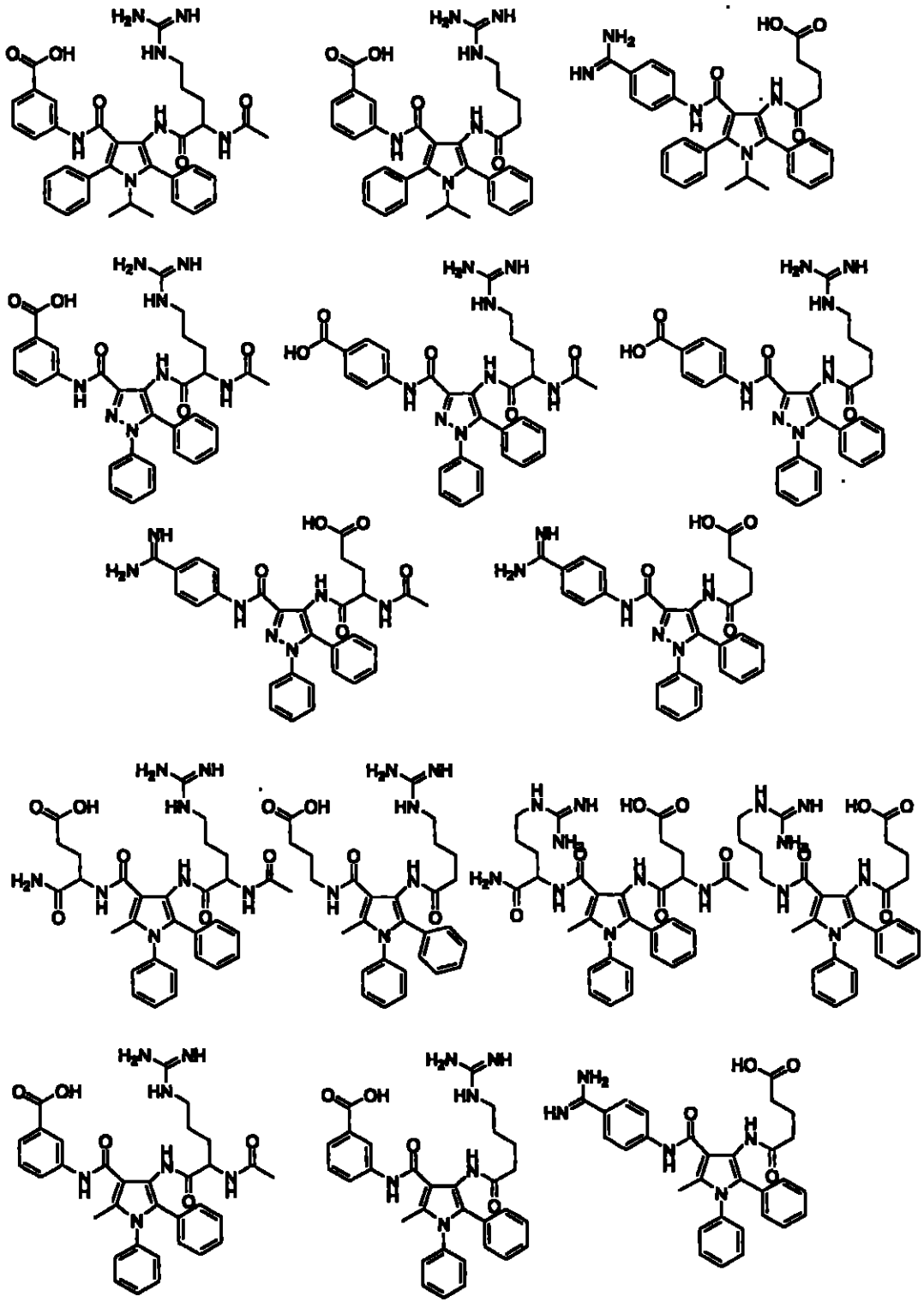


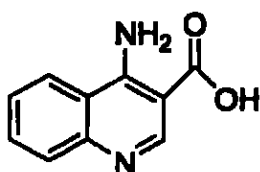
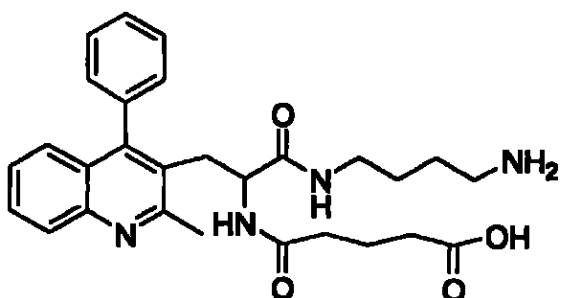
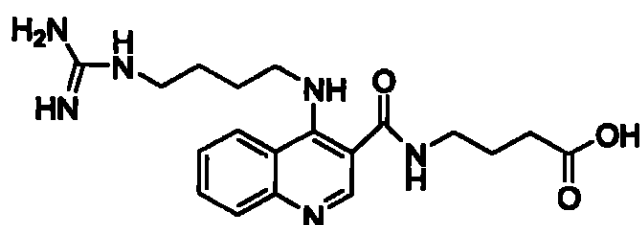
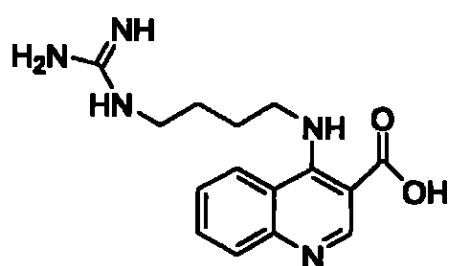
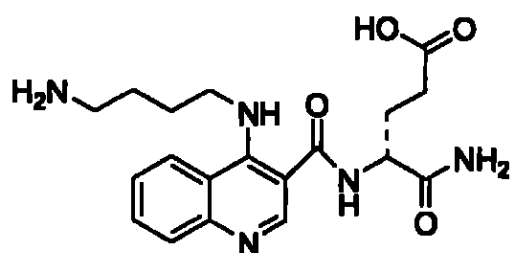
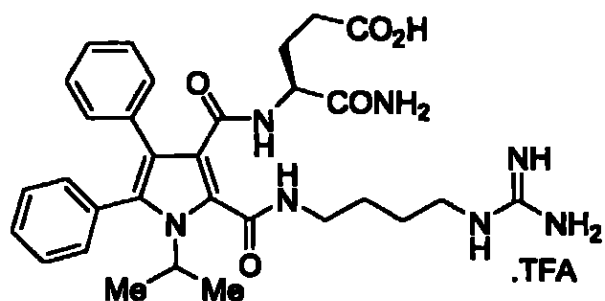
7. El mediador de la reivindicación 1, en donde el mediador se selecciona del grupo conformado por:





172

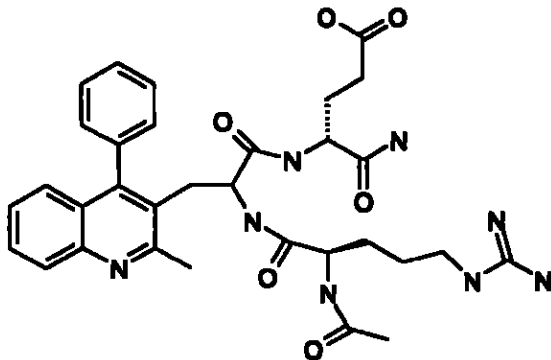




8. El compuesto 4-Agmatina-3-amidoGABAquinolina.

9. El compuesto ácido 4-(1-(4-aminobutilcarbamoil)-2-(2-metil-4-fenilquinolin-3-il)etilcarbamoil)butanoico.

10. El compuesto:



11. El compuesto ácido 4-(5-guanidinopentilamino)quinolin-3-carboxílico.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference AVANIR.138VP	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US2005/020660	International filing date (day/month/year) 09/06/2005	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 09/06/2004
Applicant AVANIR PHARMACEUTICALS		

This International Search Report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This International Search Report consists of a total of 4 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

- a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.

☐ The international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).

- b. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ Certain claims were found unsearchable (See Box II).

3. ☐ Unity of invention is lacking (see Box III).

4. With regard to the title,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regard to the drawings,

- a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. _____

☐ as suggested by the applicant.

☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.

☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.

- b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US2005/020660

176

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07D215/54 C07D207/34 C07D231/14 C07D401/04 A61K31/4706
A61K31/40 A61K31/415 A61P3/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07D A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, PAJ, CHEM ABS Data, WPI Data, EMBASE, BEILSTEIN Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SCHAEFER H ET AL: "ZUR SYNTHESE VON 4-AMINOCHINOLINEN. DURCH INTRAMOLEKULARE FRIEDEL-CRAFTS-REAKTION" MONATSHEFTE FUR CHEMIE, SPRINGER VERLAG. WIEN, AT, vol. 109, no. 3, 1978, pages 527-535, XP000945286 ISSN: 0026-9247 compound 7A	1-7
A	EP 1 419 770 A (SHIONOGI & CO., LTD) 19 May 2004 (2004-05-19) paragraph '0012!	1-11
	----- -/-- -----	



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"A" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 October 2005

Date of mailing of the international search report

11/10/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 apo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Usue111, A

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US2005/020660 177

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 1999, no. 03, 31 March 1999 (1999-03-31) & JP 10 316641 A (SANKYO CO LTD), 2 December 1998 (1998-12-02) abstract	1-11
P,A	US 2004/235888 A1 (YAMAMORI TERUO ET AL) 25 November 2004 (2004-11-25) paragraph '0188! - paragraph '0194!; claim 1	1-11
P,A	WO 2004/094471 A (AVANIR PHARMACEUTICALS; SIRCAR, JAGADISH, C; ALISALA, KASHINATHAM; NIK) 4 November 2004 (2004-11-04) claim 1	1-11
X	BOLTON G L ET AL: "Synthesis of Conformationally Constrained Macrocyclic Analogues of the Potent and Selective CCK-B Antagonist CI-988" TETRAHEDRON, vol. 49, no. 3, 1993, pages 525-535, XP002346854 compounds 10A-D	1
X	ALTMAN J ET AL: "Synthesis of Pyridine Derivatives of L-Phenylalanine as Antisickling Reagents" J. MED. CHEM., vol. 27, 1984, pages 596-600, XP002346853 compound 4	1
X	DATABASE BEILSTEIN BEILSTEIN INSTITUTE FOR ORGANIC CHEMISTRY, FRANKFURT-MAIN, DE; XP002347034 Database accession no. BRN: 7669359 abstract & BIOORG. MED. CHEM. LETT., vol. 6, no. 13, 1996, pages 1601-1606,	1
X	DATABASE BEILSTEIN BEILSTEIN INSTITUTE FOR ORGANIC CHEMISTRY, FRANKFURT-MAIN, DE; XP002347033 Database accession no. BRN:3631250 abstract & SYNTH. COMMUN., vol. 20, no. 5, 1990, pages 773-781,	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US2005/020660

178

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1419770	A	19-05-2004	US 2004248950 A1	09-12-2004
JP 10316641	A	02-12-1998	NONE	
US 2004235888	A1	25-11-2004	NONE	
WO 2004094471	A	04-11-2004	NONE	

PATENT COOPERATION TREATY

179

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To:

see form PCT/ISA220

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY (PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/US2005/020660

International filing date (day/month/year)
09.06.2005

Priority date (day/month/year)
09.06.2004

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
C07D215/54, C07D207/34, C07D231/14, C07D401/04, A61K31/4708, A61K31/40, A61K31/415, A61P3/00

Applicant
AVANIR PHARMACEUTICALS

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☒ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA"). However, this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of three months from the date of mailing of Form PCT/ISA220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Authorized Officer

Usueli, A

Telephone No. +49 89 2399-7366



**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2005/020660

Box No. 1 Basis of the opinion

1. With regard to the language, this opinion has been established on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.
☐ This opinion has been established on the basis of a translation from the original language into the following language , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rules 12.3 and 23.1(b)).
2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
☐ a sequence listing
☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
☐ in written format
☐ in computer readable form
 - c. time of filing/furnishing:
☐ contained in the international application as filed.
☐ filed together with the international application in computer readable form.
☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
3. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
4. Additional comments:

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2005/020660

181

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application,

☒ claims Nos. 1-6

because:

☐ the said international application, or the said claims Nos. relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

☒ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos. 1-6

☐ the nucleotide and/or amino acid sequence listing does not comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions in that:

the written form ☐ has not been furnished

☐ does not comply with the standard

the computer readable form ☐ has not been furnished

☐ does not comply with the standard

☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in computer readable form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.

☐ See separate sheet for further details

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2005/020660

182

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(I) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	8-11
	No: Claims	7
Inventive step (IS)	Yes: Claims	8-11
	No: Claims	7
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	7-11
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Box No. VI Certain documents cited

1. Certain published documents (Rules 43bis.1 and 70.10)

and / or

2. Non-written disclosures (Rules 43bis.1 and 70.9)

see form 210

Re Item III

Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1- The initial phase of the search revealed a very large number of documents relevant to the issue of novelty of the compounds claimed. So many documents were retrieved that it is impossible to determine which parts of the claims may be said to define subject-matter for which protection might legitimately be sought (Art. 6 PCT).

Furthermore, present claims 1 to 6 relate to an extremely large number of possible compounds. Support within the meaning of Art. 6 PCT and disclosure within the meaning of Art. 5 PCT is to be found, however, for only a very small proportion of the compounds claimed. Additionally, the meaning of the expression "at least a portion of HMG CoA reductase inhibitor or analog thereof" cannot be regarded as a limiting feature in that even a small radical, such as a single atom, a methyl group or a phenyl could be regarded as a "portion of a HMG CoA reductase inhibitor" (e.g. Atorvastatin).

For these reasons, a meaningful search over the whole breadth of the claims is impossible. Accordingly, the search has been limited to the subject-matter of claims 7 to 11.

The preliminary examination will concern only in the parts of the claims which have been searched (Rule 66.1 (e) PCT).

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1- Reference is made to the following documents:

- d1: MONATSHFTE FUR CHEMIE, SPRINGER VERLAG. WIEN, AT, vol. 109, no. 3, 1978, pages 527-535
- d2: EP-A-1 419 770
- d3: PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 1999, no. 03, 31 March 1999 (1999-03-31) & JP 10 316641 A

d6: TETRAHEDRON, vol. 49, no. 3, 1993, pages 525-535
d7: J. MED. CHEM., vol. 27, 1984, pages 596-600,
d8: DATABASE BEILSTEIN Database accession no. BRN: 7669359
d9: DATABASE BEILSTEIN Database accession no. BRN:3631250

2- Novelty

The compound 7a of d1 is identical to the last compound listed in claim 7. Accordingly, this claim does not meet the requirements of Art. 33.2 PCT.

Documents d6 to d9 represent a small selection of the many documents retrieved in the initial phase of the search and disclosing compounds included in claim 1 (cf. compound 4 of d7, compounds 10a-d of d8 and the compounds disclosed in d8 and d9).

3- Inventive step

3.1- D2 and d3 disclose agents which lower the cholesterol level and have a mechanism of action which is similar or identical to the one of the present compounds since they promote the apolipoprotein A-1 secretion. D2 is regarded as the closest state of the art.

The technical problem underlying the invention, can be seen in the provision of mediators of reverse cholesterol transport (RCT).

For the purpose of assessing the inventive activity in the international phase, it is accepted that the compounds of the invention indeed mimic the activity of the apolipoprotein A-1 and mediate the RCT. Accordingly, during the international phase it is accepted the technical problem defined above has been solved by the provision of the compounds of claims 7 to 11..

3.2- Neither d1 nor d2 disclose compounds structurally close to the compounds claimed. Accordingly, it is considered that the skilled person faced with the problem defined above would not find in the cited documents any relevant hint for preparing the compounds of the present invention.

Nevertheless, claim 7 must be regarded as non inventive since it contains a compound which lacks of novelty.

Re Item VI

Certain documents cited

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

185
International application No.

PCT/US2005/020660

- d4: US 2004/235888 A1 (YAMAMORI TERUO ET AL) 25 November 2004
d5: WO 2004/094471 A (AVANIR PHARMACEUTICALS; SIRCAR, JAGADISH, C;
ALISALA, KASHINATHAM; NIK) 4 November 2004

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

Date of mailing (day/month/year) 15 September 2005 (15.09.2005)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference AVANIR.138VP	
International application No. PCT/US2005/020660	
International publication date (day/month/year)	
Applicant AVANIR PHARMACEUTICALS et al	

To:

DELANEY, Karoline, A.
Knobbe, Martens, Olson & Bear, LLP
2040 Main Street, 14th Floor
Irvine, California 92614
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

1. By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).

2. (If applicable) The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

3. (If applicable) An asterisk (*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as the priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
09 June 2004 (09.06.2004)	80/578,227	US	22 July 2005 (22.07.2005)

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Kishan SINGH RAM

Facsimile No. +41 22 338 82 70

Facsimile No. (41-22) 338.87.40

Telephone No. +41 22 338 8450

Form PCT/IB/304 (January 2004)

CK0WPN52

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

0	For receiving Office use only	
0-1	International Application No.	
0-2	International Filing Date	
0-3	Name of receiving Office and "PCT International Application"	
0-4	Form PCT/RQ/101 PCT Request	
0-4-1	Prepared Using	PCT-SAFE [EASY mode] Version 3.50 (Build 0002.170)
0-5	Petition The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty	
0-6	Receiving Office (specified by the applicant)	United States Patent and Trademark Office (USPTO) (RO/US)
0-7	Applicant's or agent's file reference	AVANIR.138VP
I	Title of invention	HETEROCYCLIC DERIVATIVES FOR TREATMENT OF HYPERLIPIDEMIA AND RELATED DISEASES
II	Applicant	
II-1	This person is	applicant only
II-2	Applicant for	all designated States except US
II-4	Name	AVANIR PHARMACEUTICALS
II-5	Address	11388 Sorrento Valley Road Suite 200 San Diego, California 92121 United States of America
II-6	State of nationality	US
II-7	State of residence	US
III-1	Applicant and/or inventor	
III-1-1	This person is	applicant and inventor
III-1-2	Applicant for	US only
III-1-4	Name (LAST, First)	SIRCAR, Jagadish, C.
III-1-5	Address	4832 Riding Ridge Road San Diego, California 92130 United States of America
III-1-6	State of nationality	US
III-1-7	State of residence	US

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

II-2	Applicant and/or inventor	
III-2-1	This person is	applicant and inventor
III-2-2	Applicant for	US only
III-2-4	Name (LAST, First)	THOMAS, Richard, J.
III-2-5	Address	12627 Sarsaparilla Street San Diego, California 92129 United States of America
III-2-6	State of nationality	US
III-2-7	State of residence	US
III-3	Applicant and/or inventor	
III-3-1	This person is	applicant and inventor
III-3-2	Applicant for	US only
III-3-4	Name (LAST, First)	KHATUYA, Haripada
III-3-5	Address	13624 Via Cima Bella San Diego, California 92129 United States of America
III-3-6	State of nationality	IN
III-3-7	State of residence	US
III-4	Applicant and/or inventor	
III-4-1	This person is	applicant and inventor
III-4-2	Applicant for	US only
III-4-4	Name (LAST, First)	NIKOULIN, Igor
III-4-5	Address	3845 Elijah Court, #635 San Diego, California 92130 United States of America
III-4-6	State of nationality	RU
III-4-7	State of residence	US
IV-1	Agent or common representative; or address for correspondence	
	The person identified below is hereby/ has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:	agent
IV-1-1	Name (LAST, First)	DELANEY, Karoline, A.
IV-1-2	Address	Knobbe, Martens, Olson & Bear, LLP 2040 Main Street, 14th Floor Irvine, California 92614 United States of America
IV-1-3	Telephone No.	949-760-0404
IV-1-4	Facsimile No.	949-760-9502
IV-1-5	e-mail	kdelaney@kmob.com
IV-1-6	Agent's registration No.	44,058

V	DESIGNATIONS		
V-1	The filing of this request constitutes under Rule 4.9(a), the designation of all Contracting States bound by the PCT on the international filing date, for the grant of every kind of protection available and, where applicable, for the grant of both regional and national patents.		
VI-1	Priority claim of earlier national application		
VI-1-1	Filing date	09 June 2004 (09.06.2004)	
VI-1-2	Number	60/578,227	
VI-1-3	Country	US	
VI-2	Priority document request The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) identified above as item(s):	VI-1	
VII-1	International Searching Authority Chosen	European Patent Office (EPO) (ISA/EP)	
VIII	Declarations	Number of declarations	
VIII-1	Declaration as to the identity of the inventor	-	
VIII-2	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent	-	
VIII-3	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application	-	
VIII-4	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)	-	
VIII-5	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty	-	
IX	Check list	number of sheets	electronic file(s) attached
IX-1	Request (including declaration sheets)	4	✓
IX-2	Description	94	-
IX-3	Claims	8	-
IX-4	Abstract	1	✓
IX-5	Drawings	0	-
IX-7	TOTAL	107	

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

	Accompanying Items	paper document(s) attached	electronic file(s) attached
IX-8	Fee calculation sheet	✓	-
IX-17	PCT-SAFE physical media	-	✓
IX-19	Figure of the drawings which should accompany the abstract		
IX-20	Language of filing of the international application	English	
X-1	Signature of applicant, agent or common representative		
X-1-1	Name (LAST, First)	DELANEY, Karoline, A.	
X-1-2	Name of signatory		
X-1-3	Capacity		

FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

10-1	Date of actual receipt of the purported international application	
10-2	Drawings:	
10-2-1	Received	
10-2-2	Not received	
10-3	Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application	
10-4	Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2)	
10-5	International Searching Authority	ISA/EP
10-6	Transmittal of search copy delayed until search fee is paid	

FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

11-1	Date of receipt of the record copy by the International Bureau	
------	--	--

Brigard & Castro

BOGOTA - COLOMBIA

PODER

Yo (nosotros)

domiciliado(s) en

Nombre(amos) a JUAN PABLO CADENA SARMIENTO y/o CARLOS H. PALACIO EASTMAN y/o HECTOR GOMEZ MEJIA, de Bogotá, Colombia, apoderados verdaderos y legales con poder especial, amplio y suficiente, para recibir de las oficinas y autoridades colombianas administrativas, judiciales y de policía, en cualquier instancia o recurso, la obtención de patentes de invención, registros de marcas, diseños industriales, modelos de utilidad, depósitos de nombres comerciales y enseñas, registros de derechos de autor y contratos sobre los mismos, obtención de certificados de obtención de variedades vegetales, así como sus prórogas, renovaciones, anotaciones de traspaso, cambios de nombre y/o domicilio; elaborar, tramitar y registrar contratos de licencia y licencias de cualesquiera clases; intervenir como demandante o como demandado en cualquier instancia y recurso ante cualquier juez, corporación, funcionario público o autoridad en acciones judiciales, administrativas y de policía tales como: oposiciones al registro de marcas; acciones de caducidad, cancelación y nulidad; acciones reivindicatorias, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias; acciones de competencia desleal; demandas penales; acciones de indemnización de perjuicios, reclamos y observaciones a explotaciones de patentes, diseños industriales, modelos de utilidad, en el ejercicio de medidas cautelares y en otras acciones o medidas similares.

A este efecto, lo(s) faculta(amos) para elevar solicitudes, formular descripciones, emendaciones, protestas, declaraciones, oposiciones, cancelaciones, nulidades, apelaciones y reclamos; pagar impuestos, cuotas y gravámenes prescritos por la ley; renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión; recibir toda clase de documentos y valores, dando el descargo respectivo, y, en general, para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al efecto indicado y tomar todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de mis (nuestros) intereses, con todas las demás facultades legales necesarias.

Esta poder comprende la facultad de ratificar o confirmar en mí (nuestro) nombre lo actuado así como la facultad de desistir, transigir, comprometer, y la de sustituir en todo o en parte y revocar sustituciones. Asimismo nombre(amos) a: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO y/o CARLOS H. PALACIO EASTMAN y/o HECTOR GOMEZ MEJIA, domiciliado(s) en la Carrera 7 No. 18-58 Piso 9, mis (nuestros) apoderados en Colombia, con facultades para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales.

Otorgado y firmado en

hoy de de 200_

Firma

Nombre

POWER OF ATTORNEY

I (We) AVANIR PHARMACEUTICALS

domiciled in 11388 Sorrento Valley Road
Suite 200, San Diego, CA 92121

Hereby appoints JUAN PABLO CADENA SARMIENTO and/or CARLOS H. PALACIO EASTMAN and/or HECTOR GOMEZ MEJIA, of Bogotá, Colombia, my (our) true and lawful attorneys with special, ample and sufficient power to obtain from the Colombian administrative, judicial and police offices and authorities, in any instance, privileges of patents of invention, registration of trademarks, industrial designs and utility models; registration of commercial names and emblems, registration of copyright and contracts related thereto, certificates of obtainment of vegetables varieties, as well as extensions, renewals and records of assignments and changes of name and domicile related to the above; to prepare, prosecute and register licenses of any kind; to act as plaintiff or defendant in any instance or recourse, and before any judge, corporation, public official or authority in judicial, administrative and police actions, such as: oppositions to the registration of trademarks; caducity, cancellation and nullity actions; claim actions derived from the obtaining or exploitation of licenses, action of unfair competition; criminal proceedings, actions for payment of damages; claims or observations on patent applications, models, industrial designs and utility models; in the exercise of preventive measures and in other actions or similar proceedings.

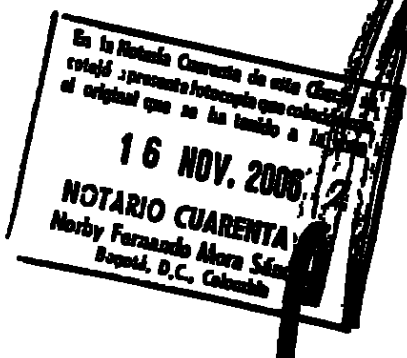
To that effect they hereby empowered to file applications, formulate descriptions, amendments, protests, declarations, oppositions, cancellations, nullities, appeals and claims; to pay taxes, quotas and assessments prescribed by law, renounce or waive the rights granted or in the process of granting; to receive all kinds of documents and valuables, giving the respective release of receipt, and, in general, to take before said authorities the necessary steps to such effect, and any measures that they may deem pertinent to the safeguard of my (our) interest(s) with all the other necessary legal powers.

This power includes the faculty to ratify or confirm desist, settle and compromise on my (our) behalf, and to substitute this power in whole or in part and to revoke substitutions. At the same time I (We) hereby appoint JUAN PABLO CADENA SARMIENTO and/or CARLOS H. PALACIO EASTMAN, and/or HECTOR GOMEZ MEJIA domiciled in Carrera 7 No. 18-58, Piso 9, my (our) attorney(s) in fact, with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys.

Granted and signed in San Diego, CA, USA

7th day of Nov. 2005

Signature of Gregory P. Hanson



State of California

SECRETARY OF STATE

APOSTILLE

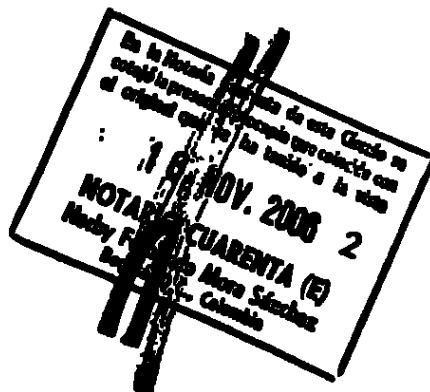
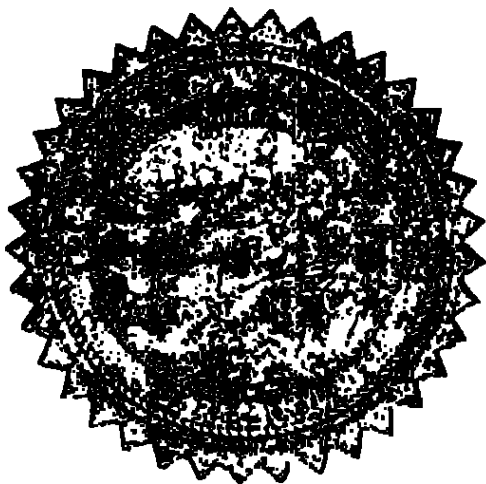
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America
This public document
2. has been signed by KIYOKO SHIMIZU
3. acting in the capacity of Notary Public, State of California
4. bears the seal/stamp of KIYOKO SHIMIZU, Notary Public,
State of California

CERTIFIED

5. At Sacramento, California
6. the 23rd day of November 2005
7. by Deputy Secretary of State, State of California
8. No. 264720
9. Seal/Stamp:

10. Signature



[Signature]
Secretary of State

193

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

Hoy de
personalmente compareció ante mí Gregory P. Hanson de

On this 7th day of November 2005 of
personally appeared before me Gregory P. Hanson

a quien conozco, y de quien me consta que firmó el anterior documento, debidamente juramentado declaró y dijo que él (ella) es VP & CFO

to me known, and known to me to be the person who signed the foregoing instrument who being by me duly sworn did depose and say that he (she) is the VP & CFO

de Avanir Pharmaceuticals

of Avanir Pharmaceuticals

Sociedad legalmente constituida para un periodo de duración que aún no ha terminado; que el declarante está autorizado por dicha compañía para conferir este poder; que el sello estampado por él al pie de tal poder, en nombre y representación de la expresada compañía, es el sello oficial de ella; y que el objeto para el cual se confiere este instrumento está comprendido dentro del objeto social de la sociedad.

Which is legally constituted for a term not yet expired, that deponent is authorized by said Company to confer this Power of Attorney: that the seal affixed hereunto by the deponent in the name and on behalf of said Corporation is the corporate seal thereof; and that the purpose for which this instrument is granted is included within the corporate purpose of company.

El suscrito Notario hace constar que tuvo a la vista las pruebas de la existencia de la sociedad.

The undersigned Notary Public attests that he has seen the documents that prove the existence of the company.

Estado de
con fecha

State of California, U.S.A.
under date of Nov. 7, 2005.

y que quien confiere el presente poder es su representante.

and that he (she) who grants the present power of attorney is its Representative.

[Signature]

Notario Público (sello)

Public Notary (Seal)

LEGALIZACION POR APOSTILLA ES REQUERIDA.

LEGALIZATION BY APOSTILLE IS REQUIRED.



STATE

197
194

**TRADUCCION AL ESPAÑOL del Documento de Poder otorgado por
AVANIR PHARMACEUTICALS, domiciliada en 11388 Sorrento Valley
Road, Suite 200, San Diego, CA 92121, Estados Unidos de América.**

ESTADO DE CALIFORNIA

SECRETARIO DE ESTADO

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
Este documento público
2. ha sido firmado por KIYOKO SHIMIZU
3. actuando en capacidad de notario público, Estado de California
4. lleva el sello/timbre de KIYOKO SHIMIZU, notario público, Estado de California

CERTIFICADO

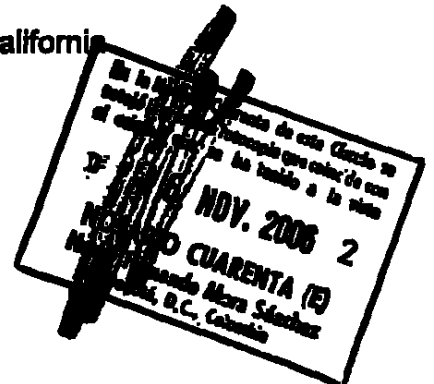
5. En Sacramento, California
6. el 23 de noviembre de 2005
7. por el Secretario de Estado Suplente, Estado de California
8. No. 264720
9. Sello/timbre:

10. Firma

(Firma)

Secretario de Estado

POR: (Firma)



PETITORIO

AS: 102.483



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rrd: 06-117703- JUDUJ-0000
Fec: 2005-11-21 16:22:46 Ddp: 2005 MUECREACIONES
Ttr: 11 PATENTE VIII
Ere: 375 FASE NACIONAL I
Act: 111 PRESENTACION Fono: 195

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE

PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

09/01/07

1

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención.

☐ Patente de Modelo de Utilidad.

☒ Capítulo I.

☐ Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: AVANIR PHARMACEUTICALS

Dirección: 11388 Sorrento Valley Road, Suite 200, San Diego, California 92121, US

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América

Lugar de Constitución: Estados Unidos de América
Teléfono: Fax
E-mail

IDENTIFICACION

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Número Cual

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

Dirección: Cra. 7 No. 71-21, Torre B, Piso 4

Teléfono: 744-2200 Fax 742-2200
E-mail:

IDENTIFICACION

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Número 80 410.337 TP 57492

4

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: Jagadish C. SIRCAR, Richard J. THOMAS, Haripada KHATUYA, Igor NIKOULIN

Dirección: 4832 Riding Ridge Road, San Diego, CA 92130, US; 12627 Sarsaparilla Street, San Diego, CA 92129, US; 13624 Via Clima Bella, San Diego, CA 92129, US; 3845 Elijah Court, #635, San Diego, CA 92130, Estados Unidos de América (Respectivamente)

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América (Respectivamente)

5 PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2005/020680

Fecha 09-08-2005

Publicación Internacional No. WO/2005/123686 A1

Fecha 29-12-2005

6 Título (54): DERIVADOS HETEROCICLICOS PARA TRATAMIENTO DE HIPERLIPIDEMIA Y ENFERMEDADES RELACIONADAS

7 Clasificación Internacional (51) A61K 31/41/06

8 Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

09-06-2004

(31) Número de Solicitud

60/578.227

9 Comprobante de pago No. 08-76.845

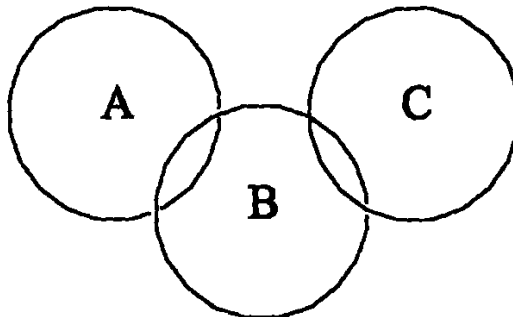
Fecha 20-11-2006

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

LO QUE SE REIVINDICA ES:

196

1. Un mediador de transporte inverso de colesterol, que contiene la estructura:



en donde A, B y C pueden estar en cualquier orden, y en donde:

A comprende una fracción ácida, que contiene un grupo ácido o su bioisómero;

B comprende una fracción aromática o lipófila, que contiene por lo menos una porción de inhibidor de HMG CoA reductasa o su análogo; y

C comprende una fracción básica, que contiene un grupo básico o su bioisómero.

2. El mediador de la reivindicación 1, en donde por lo menos uno de los grupos alfa amino o alfa carboxi se han eliminado de sus respectivas fracciones de terminal amino o carboxi.

3. El mediador de la reivindicación 1 ó 2, en donde si no se elimina, el grupo alfa amino se tapona con un grupo protector seleccionado del grupo conformado por formilo, acetilo, fenilacetilo, benzoilo, pivolilo, 9-fluorenilmetiloxycarbonilo, ácido 2-naftílico, ácido nicotínico, un $\text{CH}_3\text{---}(\text{CH}_2)_n\text{---CO---}$ donde n varía de 1 a 20, di-*tert*-butil-4-hidroxi-fenilo, naftilo, naftilo sustituido, Fmoc, bifenilo, fenilo sustituido, heterociclos sustituidos, alquilo, arilo, arilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo fusionado, heteroarilo saturado, y heteroarilo saturado sustituido.

**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT**

PATENTE DE INVENCION

☒

MODELO DE UTILIDAD ☐

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente ☒
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☒
- ◆ Descripción de la invención ☒
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes ☒
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☒

COMPLETA ☒

INCOMPLETA ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

F L B
Firma Responsable

Fecha 21 NOV 6

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@slc.gov.co
www.slc.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

198

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCI

Bogotá,
2020

Doctor(a)
CADEMA SARMIENTO JUAN PABLO
Apoderado(a) y/o Representante de
AVANIR PHARMACEUTICALS

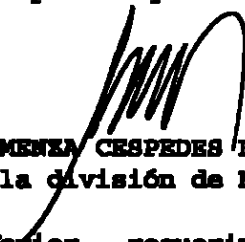
REFERENCIA	Radicación No.	6 117703
	Solicitud internacional	PCT/US2005/020660
	Fecha inicio fase nacional	09/01/2007
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	1488

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 02 FEB. 2007
lerazo