

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **PI0608907-0 A2**



(22) Data de Depósito: 09/05/2006
(43) Data da Publicação: 17/02/2010
(RPI 2041)

(51) *Int.Cl.:*
A61K 31/44 (2010.01)
A61K 31/4412 (2010.01)
A61K 31/4704 (2010.01)
A61P 9/00 (2010.01)

(54) Título: **MÉTODO DE MODULAÇÃO DE SISTEMA DE PROTEÍNA CINASE ATIVADA POR ESTRESSE**

(30) Prioridade Unionista: 10/05/2005 US 60/679.741,
01/11/2005 US 60/732.230, 01/11/2005 US 60/732.230, 10/05/2005
US 60/679.741

(73) Titular(es): ITERMUNE INC

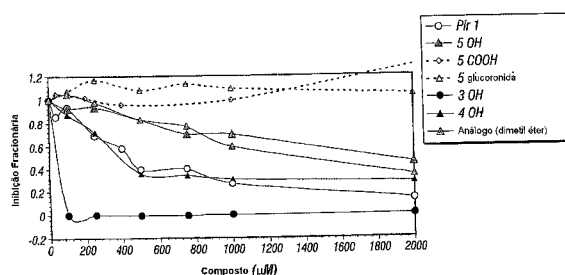
(72) Inventor(es): LAWRENCE M. BLATT, LONID BEIGELMAN,
RAMACHANDRAN RADHAKRISHNAN, SCOTT D SEIWERT

(74) Procurador(es): Orlando de Souza

(86) Pedido Internacional: PCT US2006017988 de 09/05/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/122154 de 16/11/2006

(57) Resumo: MÉTODO DE MODULAÇÃO DE SISTEMA DE PROTEÍNA CINASE ATIVADA POR ESTRESSE. São apresentados métodos de modulação de um sistema de proteína cinase ativada por estresse (SAPK) com um composto ativo, onde o composto ativo apresenta baixa potência para inibição de pelo menos uma MAPK p38; e onde o contato é realizado a uma concentração de modulação de SAPK que está a uma baixa percentagem de concentração inibitória para inibição de pelo menos uma MAPK p3B pelo composto. São também apresentados derivados de pirfenidona. Estes derivados podem modular um sistema de proteína cinase ativada por estresse (SAPK).



**MÉTODO DE MODULAÇÃO DE SISTEMA DE PROTEÍNA CINASE ATIVADA
POR ESTRESSE**

REFERÊNCIA A PEDIDOS DE PATENTE CORRELATOS

Este Pedido de Patente reivindica o benefício do
5 Pedido de Patente Provisório U.S. No. 60/679.471 depositado
em 10 de maio de 2005, e do Pedido de Patente Provisório
U.S. No. 60/732.230 depositado em 1 de novembro de 2005,
ambos expressamente incorporados aqui mediante referência
em suas totalidades.

CAMPO DA INVENÇÃO

Esta invenção refere-se a compostos e métodos úteis
no tratamento de diversas condições inflamatórias e/ou
condições fibróticas, incluindo aquelas associadas a
atividade aumentada de cinase p38.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Um grande número de condições crônicas e agudas tem
sido reconhecido por estar associado a perturbação de
resposta inflamatória. Um grande número de citocinas
participa nesta resposta, incluindo IL-1, IL-6, IL-8 e
20 TNF α . Parece que a atividade destas citocinas na regulação
de inflamação pode ser associada com a ativação de uma
enzima do trajeto de sinalização da célula, um elemento da
família cinase MAP normalmente conhecido como p38 e também
conhecido como SAPK, CSBP e RK.

25 Diversos inibidores de p38, tais como NPC 31169,
SB239063, SB203580, FR-167653, e prifenidona foram testados
in vitro e/ou *in vivo* e verificou-se serem eficazes para
modulação de respostas inflamatória.

Continua a haver uma necessidade de drogas seguras e
30 eficazes para tratar diversas condições inflamatória e/ou

condições fibróticas tais como fibrose pulmonar inflamatória e/ou fibrose pulmonar idiopática.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Uma modalidade da presente invenção é um método de modulação de um sistema de proteína cinase ativada por estresse (SAPK), que inclui colocar em contato um composto com uma proteína cinase ativada por mitogênio p38 (MAPK), em que o composto exibe um EC_{50} na faixa entre aproximadamente $1\mu M$ e aproximadamente $1.000\mu M$ para inibição de pelo menos uma MAPK p38; e em que o contato é conduzido em uma concentração de modulação SAPK que é menor do que um EC_{30} para inibição de pelo menos uma MAPK p38 pelo composto.

Outra modalidade da presente invenção é um método para tratar ou impedir um estado de doença em um objeto, incluindo identificar um objeto em risco para ou que possua uma condição selecionada a partir de uma condição inflamatória e uma condição fibrótica; administrar um composto ao objeto em uma quantidade eficaz para trará ou impedir a condição; em que o composto exibe um EC_{50} na faixa entre aproximadamente $1\mu M$ e aproximadamente $1000\mu M$ para inibição de pelo menos uma MAPK p38; e em que a quantidade eficaz produz sangue ou soro ou outra concentração de fluido que seja inferior a EC_{30} para a inibição de pelo menos uma MAPK p38.

Outra modalidade da presente invenção é um método para identificar um composto farmacologicamente ativo, que inclui: propiciar uma biblioteca de compostos, ensaiar diversos compostos a partir da biblioteca para inibição de pelo menos uma MAPK p38; e selecionar pelo menos um

composto a partir dos diversos compostos, em que o composto selecionado exiba um EC_{50} na faixa entre aproximadamente 1 μM e aproximadamente 1000 μM para a inibição de pelo menos uma MAPK p38.

5 Outra modalidade da presente invenção é um método para identificar um composto farmacologicamente ativo, que inclui: propiciar uma biblioteca de compostos; ensaiar diversos compostos a partir da biblioteca para inibição de secreção em um fluido corporal *in vivo*; e selecionar pelo
10 menos um composto dentre diversos compostos, em que o composto selecionado exibe um EC_{50} na faixa entre aproximadamente 1 μM e aproximadamente 1000 μM para inibição de secreção TNF α em um fluido corporal *in vivo*.

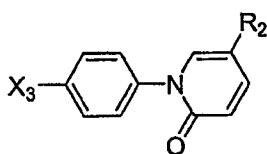
Outra modalidade da presente invenção é um método
15 para identificar um composto farmacologicamente ativo, que inclui: propiciar uma biblioteca de compostos; ensaiar diversos compostos a partir da biblioteca para inibição de secreção por células em cultura *in vitro*; e selecionar pelo menos um composto dentre diversos compostos, em que o
20 composto selecionado exibe um EC_{50} na faixa entre aproximadamente 1 μM e aproximadamente 1000 μM para inibição de secreção TNF α em um fluido corporal *in vitro*.

Outra modalidade da presente invenção é um método para identificar um composto farmacologicamente ativo, que
25 inclui: propiciar uma biblioteca de compostos; ensaiar diversos compostos a partir da biblioteca para inibição de secreção em um fluido corporal *in vivo*; e selecionar pelo menos um composto dentre diversos compostos, em que o composto selecionado exibe um EC_{50} na faixa entre
30 aproximadamente 1 μM e aproximadamente 1000 μM para

inibição de secreção TNF α por células em cultura *in vitro*.

Outra modalidade da presente invenção é um método para identificar um composto farmacologicamente ativo, que inclui: proporcionar uma biblioteca de compostos; ensaiar
5 diversos compostos a partir da biblioteca para inibição de secreção por células em cultura *in vitro*; e selecionar pelo menos um composto dentre diversos compostos, em que o composto selecionado exibe um EC₅₀ na faixa entre aproximadamente 1 μ M e aproximadamente 1000 μ M para
10 inibição de secreção TNF α em um fluido corporal *in vivo*.

Outra modalidade da presente invenção é um composto que possui a fórmula de Subgênero III:

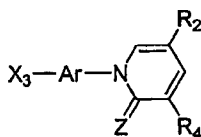


15

Subgênero III;

em que X₃ é selecionado de um grupo que consiste em H, F, e OH; e R₂ é selecionado a partir de um grupo que
20 consiste em H a CF₃; e em que o composto exibe um EC₅₀ na faixa entre 1 μ M e aproximadamente 1000 μ M para exibição de MAPK p38; ou um sal, éster, solvente ou pró-fármaco farmacologicamente aceitável do composto.

Outra modalidade da presente invenção é um composto
25 que possui a fórmula de Gênero VI:



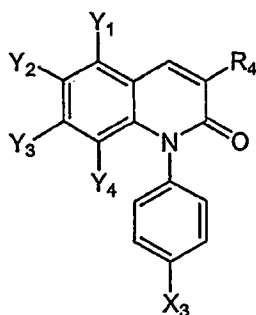
Gênero VI

30

em que Ar é piridinila ou fenila; Z é O ou S; X₃ é H,

F, Cl, OH, ou OH₂; R₂ é metila, C(=O)H, C(=O)CH₃, C(=O)O-glucosila, fluorometila, difluorometila, trifluorometila, metilmetoxila, metilhidroxila, ou fenila; e R₄ é H ou hidroxila; sob a condição de que quando R₂ for trifluorometila, Z é O, R₄ é H e Ar é fenila, a fenila não sendo substituída somente na 4ª posição por H, F ou OH; em que o composto exibe um EC₅₀ na faixa entre 1 µM e aproximadamente 1000 µM para a inibição de MAPK p38; ou um sal, éster, solvente ou pró-fármaco farmacologicamente aceitável do composto.

Outra modalidade da presente invenção é um composto que possui a fórmula de Gênero VII:



Gênero VII

em que X₃ é H, halogênio, C₁-C₁₀ alcóxi, ou OH; Y₁, Y₂, Y₃, e Y₄ são independentemente selecionados a partir do grupo que consiste em H, C₁-C₁₀ alquila, C₁-C₁₀ alquila substituída, C₁-C₁₀ alquenila, C₁-C₁₀ haloalquila, C₁-C₁₀ nitroalquila, C₁-C₁₀ tioalquila, C₁-C₁₀ hidroxialquila, C₁-C₁₀ alcóxi, fenil, fenil substituído, halogênio, hidroxila, C₁-C₁₀ alcóxialquila, C₁-C₁₀ carbóxi, C₁-C₁₀ alcoxicarbonila; R₄ é H, halogênio, ou OH; e em que o composto exibe um EC₅₀ na faixa entre 1 µM e aproximadamente 1000 µM para a inibição de MAPK p38; ou um sal, éster, solvente ou pró-fármaco

farmaceuticamente aceitável do composto.

Uma modalidade adicional da presente invenção é uma composição farmacêutica que contém um composto que possui uma fórmula como descrito acima e um excipiente
5 farmaceuticamente aceitável.

Estas e outras modalidades são descritas em maiores detalhes abaixo.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 é uma representação esquemática da MAPK
10 p38 que sinaliza cascata (estado da técnica, Figura 1 de Underwood e outros 2001 *Prog Respir Res* 31:342-345). Esta esquemática mostra ativação do p38 que sinaliza cascata através de diversos estímulos e os efeitos a jusante de ativação de p38 sobre uma resposta inflamatória através da
15 ativação transcricional e translação/estabilização de mRNA.

A Figura 2 é um esquema que mostra uma inibição fracionada de p38 γ através de diversos metabolitos e análogos de pirfenidona como uma função da concentração dos compostos. As concentrações EC50 destes compostos são
20 mostradas à direita do esquema. Uma descrição detalhada do ensaio pode ser verificada no Exemplo 5.

A Figura 3 é um esquema que mostra a inibição fracionada de p38 α através de diversos metabolitos e análogos de pirfenidona como uma função da concentração dos
25 compostos. As concentrações EC50 destes compostos são mostradas à direita do esquema. Uma descrição detalhada do ensaio pode ser verificada no Exemplo 5.

A figura 4 é um resumo dos dados bioquímicos para diversos metabolitos e análogos de pirfenidona. Os
30 metabolitos e análogos de pirfenidona mencionados nas

Figuras 2, 3, 5 e 6 são descritos pelo padrão de substituição mostrado na Figura 4. O resumo mostra o efeito de substituições nas três posições sobre as concentrações EC50 para a inibição de p38 α e p38 γ .

5 A Figura 5 é um esquema que mostra a atividade fracionada (liberação de TNF α a partir de macrófago em resposta a LPS) de diversos metabolitos e análogos de pirfenidona como uma função da concentração de cada composto. Uma descrição detalhada do ensaio pode ser
10 verificada no Exemplo 5.

A Figura 6 é uma série de gráficos de barra que mostram a citotoxicidade de diversos metabolitos e análogos de pirfenidona em diversas concentrações dos compostos. A citotoxicidade foi determinada ao medir a liberação de LDH
15 que segue a incubação de células na presença do composto. A quantidade de LDH liberado é normalizada para aquela liberada sob tratamento com Triton-X-100 e esquema versus concentração de composto.

DESCRIÇÃO DETALHADA DAS MODALIDADES PREFERIDAS

20 É descrito agora que um efeito terapêutico elevado em tratar diversas doenças associadas à atividade de cinase p38 aumentada pode ser alcançado ao utilizar um composto inibidor de cinase de p38 relativamente de baixa potência.

Por conseguinte, em uma modalidade é propiciado um
25 método de modulação de um sistema de cinase ativada por estresse (SAPK) ao contatar um composto com uma proteína cinase ativada por mitogênio p38 (MAPK). Um composto preferido exibe um EC₅₀ na faixa entre aproximadamente 1 μ M e aproximadamente 1000 μ M, de preferência aproximadamente
30 50 μ M e aproximadamente 650 μ M para a inibição de pelo

menos uma MAPK de p38. A concentração na qual o composto é posto em contato com a MAPK p38 é normalmente inferior a EC_{30} para a inibição do p38 por este composto. De preferência, a concentração é inferior a EC_{20} , ainda mais preferivelmente, a concentração é inferior a EC_{10} .

"Proteínas cinase ativadas por mitogênio (MAPKs)" são cinases de serina/treonina evolucionariamente conservadas envolvidas na regulação de muitos eventos celulares. Os diversos grupos de MAPK foram identificados em células de mamíferos, incluindo cinase regulada por sinal extracelular (ERK), p38, e SAPK/JNK. Acredita-se que MAPKs sejam ativados por sua cinase de MAPK específica (MAPKKs); ERK por MEK1 e MEK2, p38 por MKK3 e MKK6, e SAPK/JNK por SEK1 (também conhecido como MKK4) e MKK7 (SEK2). Estas MAPKKs podem ser também ativadas por diversas cinases de MAPKK (MAPKKKs) tais como Raf, MLK, MEKK1, TAK1, e ASK1.

Acredita-se que a rede de MAPK envolva pelo menos doze cinases de serina/treonina direcionadas por prolina, altamente conservadas clonadas que, quando ativadas por estresses celulares (estresse oxidativa, dano de DNA, calor ou choque osmótico, irradiação ultravioleta, reperfusão de isquemia), agentes exógenos (anisomicina, arsenita Na, lipopolisacarídeo, LPS) ou citocinas pró-inflamatórias, TNF- α e IL-1 β , podem fosforilar e ativar outras cinases ou proteínas nucleares tais como fatores de transcrição tanto no citoplasma quanto no núcleo (Fig. 1).

MAPK p38

Como utilizado aqui, "MAPK p38" é um elemento da família de proteína cinase ativada por estresse, que inclui pelo menos 4 isoformas ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$), diversas das quais são

consideradas importantes em processos críticos para a resposta inflamatória e remodelação de tecidos (Lee e outros 2000 *Immunopharmacol.* 47:185-201). As cinases predominantes em monócitos e macrófagos, p38 α e p38 β ,
 5 parecem mais amplamente expressas comparadas a p38 γ (músculo esquelético) e p38 δ (testes, pâncreas, próstata, intestino pequeno, e em glândulas salivar, pituitária e adrenal). A isoforma p38 γ é expressa em miofibroblastos, que possuem algumas similaridades fenotípicas a células
 10 musculares que incluem expressão de ação de músculo alfa-suave. Diversos substratos de cinase de MAP p38 foram identificados incluindo outras cinase (MAPKAP K2/3, PRAK, MNK $\frac{1}{2}$, MSK1/RLPK, RSK-B), fatores de transcrição (ATF2/6, fator aumentador de miócito 2, fator- β de transcrição
 15 nuclear, CHOP/GADD153, Elk1 e SAP-1A1) e proteínas citosólicas (estatmina), muitos dos quais são importantes fisiologicamente.

Jiang, Y. e outros 1996 *J Biol Chem* 271:17920-17926 relatou caracterização de p38 β como uma proteína de
 20 aminoácido-372 proximamente relacionada a p38- α . Ambos p38 α e p38 β são ativados por citocinas pró-inflamatórias e estresse ambiental, p38 β é de preferência ativado por cinase-6 de cinase de MAP (MKK6) e de preferência fator 2 de transcrição ativada de fosforilato (ATF2). Kumar, S. e
 25 outros 1997 *Biochem Biophys Res Comm* 235:533-538 e Stein, B. e outros 1997 *J Biol Chem* 272:19509-19517 relataram uma segunda isoforma de p38 β , p38 β 2, que contém 364 aminoácidos com 73% de identidade com p38 α . Acredita-se que p38 β seja
 30 ativado por citocinas pró-inflamatórias e estresse ambiental, embora a segunda isoforma p38 β relatada, pareça

ser de preferência expressa no sistema nervoso central (CNS), coração e músculo esquelético, comparado à expressão de tecidos mais ubíqua de p38 α . Além disso, acredita-se que o fator-2 de transcrição ativada (ATF-2) seja um substrato
5 melhor para p38 β 2 do que para p38 α .

A identificação de p38 γ foi relatada por Li, Z. e outros 1996 *Biochem Biophys Res Comm* 228:334-340 e de p38 δ por Wang e outros 1997 *J Biol Chem* 272:23668-23674 e por Kumar, S. e outros 1997 *Biochem Biophys Res Comm*
10 235:533-538. Estas duas isoformas de p38 (γ e δ) representam um subgrupo único da família MAPK com base em seus padrões de expressão de tecidos, utilização de substrato, resposta à estímulos diretos e indiretos, e suscetibilidade a inibidores de cinase. Com base na
15 conservação de seqüência primária, p38 α e β são proximamente relacionados, porém divergem de γ e δ , que são mais proximamente relacionados entre si.

Normalmente o caminho de cinase de MAP de p38 é direta ou indiretamente ativado por receptores de
20 superfície de célula, tais como cinases de tirosina receptora, quemoquina ou receptores acoplados por proteína G, que foram ativados por um ligante específico, por exemplo, citoquinas, quemoquinas ou lipopolissacarídeo (LPS) que se ligam a um receptor cognato. Subseqüentemente,
25 uma cinase de MAP p38 é ativada por fosforilação sobre resíduos específicos de treonina e tirosina. Após ativação, a cinase de MAP de p38 pode fosforilar outras proteínas intracelulares, incluindo proteína cinase, e pode ser translocado para o núcleo celular, onde fosforila e ativa
30 fatores de transcrição que conduzem à expressão de

citoquinas pró-inflamatórias e outras proteínas que contribuem para a resposta inflamatória, adesão celular, e degradação proteolítica. Por exemplo, em células de linhagem mielóide, tal como macrófagos e monócitos, ambos
5 Il-1 β e TNF α são transcritos em resposta à ativação de p38. Translação e secreção subseqüentes destas e outras citocinas iniciam uma resposta inflamatória local ou sistêmica em tecido adjacente e através de infiltração de leucócitos. Embora esta resposta seja uma parte normal de
10 respostas fisiológicas para estresse celular, a estresse aguda e crônica conduz à expressão em excesso, irregular, ou em excesso irregular de citocinas pró-inflamatórias. Isto, por sua vez, conduz a dano de tecido, freqüentemente resultando em dor e debilitação.

15 Em macrófagos alveolares, a inibição de cinases de p38 com inibidor de p38, SB203580, reduz produtos de gene de citocina. Acredita-se que citocinas inflamatórias (TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-5) e quemoquinas (IL-8, RANTES, eotaxina) são capazes de regular ou sustentar inflamação de
20 vias aéreas crônica. A produção e ação de muitos dos mediadores potenciais de inflamação de vias aéreas parecem ser dependentes do sistema de cinase de MAP ativado por estresse (SAPK) ou cascata de cinase de p38 (Underwood e outros 2001 *Prog Respir Res* 31:342-345). A ativação do
25 caminho de cinase de p38 através de diversos resultados de estímulos ambientais na elaboração de mediadores inflamatórios reconhecidos cuja produção é considerada como sendo translacionalmente regulada. Além disso, uma variedade de mediadores inflamatórios ativos MAPK de p38
30 que pode em seguida ativar alvos a jusante do sistema de

MAPK que incluem outras cinases ou fatores de transcrição, criando desse modo o potencial para um processo inflamatório amplificado no pulmão.

Substratos a jusante de grupo de p38 de cinases MAP

5 Substratos de proteína cinase de p38 α ou p38 β : cinase 2 de proteína ativada por cinase (MAPKAPK2 ou M2), proteína cinase de interação de cinase MAP (MNK1), cinase regulada/ativada de p38 (PRAK), cinase ativada por mitogênio- estresse- (MSK: RSK-B ou RLPK).

10 Fatores de transcrição ativados por p38: fator de transcrição de ativação (ATF)-1, 2 e 6, proteína acessória SRF 1 (SAP 1), CHO (atraso de crescimento e gene passível de indução de dano de DNA 153, ou GADD153), p53, C/EBP β , fator de aumento de miócito 2C (MEF2C), MEF2A, MITF1,
15 DDIT3, ELK1, NFAT, e proteína de caixa de grupo de mobilidade elevada (HBP1).

Outros tipos de substratos para p38: cPLA2, isoforma 1 de permutador de Na⁺/H⁺, tau, queratina 8, e estatmina.

Genes regulados pela trajetória de p38: c-jun, c-fos,
20 junB, IL-1, TNF, IL-6, IL-8, MCP-1, VCM-1, iNOS, PPAR γ , ciclooxygenase (COX)-2, collagenase-1 (MMP-1), Collagenase-3 (MMP-13), HIV-LTR, Fgl-2, peptídeo natriurético cerebral (BNP), CD23, CCK, fosfoenolpiruvato carbóxi-cinase-citosólico, ciclin D1, receptor de LDL (Ono e outros 200
25 *Sinalização Celular* 12:1-13).

Conseqüências biológicas de ativação de p38

P38 e inflamação

 Acredita-se que inflamações crônicas e agudas sejam centrais à patogênese de muitas doenças tais como artrite
30 reumatóide, asma, doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD)

e síndrome de doença respiratória aguda (ARDS). A ativação da trajetória de p38 pode desempenhar um papel central em: (1) produção de citocinas pró-inflamatórias tais como IL-1 β , TNF- α e IL-6; (2) indução de enzimas tais como COX-2, 5 que controla a remodelação de tecido conectivo em condição patológica; (3) expressão de uma enzima intracelular tal como iNOS, que regula a oxidação; (4) indução de proteínas aderentes tais como VCAM-1 e muitas moléculas relacionadas a inflamação. Além destas, a trajetória de p38 pode 10 desempenhar um papel regulador na proliferação e diferenciação de células do sistema imune. P38 pode participar em GM-CSF, CSF, EPO, e proliferação e/ou diferenciação de célula induzida por CD-40.

O papel da trajetória de p38 nas doenças relacionadas 15 a inflamação foi estudado em diversos modelos animais. A inibição de p38 por SB203580 reduziu a mortalidade em um modelo de murina de choque induzido por endotoxina e inibiu o desenvolvimento de artrite induzida por colágeno em camundongos e artrite coadjuvante em ratos. Um estudo 20 recente mostrou que SB220025, que é um inibidor de p38 mais potente, provocou uma diminuição de dependência de dose significativa em densidade vascular do granuloma. Estes resultados indicam que p38 ou os componentes de trajetória de p38 podem ser alvos terapêuticos para doença 25 inflamatória.

P38 e apoptose

Parece que a ativação concomitante de p38 e apoptose é induzida por uma variedade de agentes tais como retirada NGF e ligação Fas. Proteases de cisteína (caspases) são 30 centrais para a trajetória apoptótica e são expressas como

zimogênios inativos. Inibidores de caspase podem em seguida bloquear a ativação de p38 através de ligação transversal de Fas. Contudo, a superexpressão de MKK6b ativo dominante pode também induzir a atividade de caspase e a morte celular. O papel de p38 em apoptose é dependente de estímulo e de tipo celular. Embora a sinalização de p38 tenha sido mostrada para promover a morte celular e algumas linhas de células, em linhas de célula diferentes p38 tem sido mostrado para aumentar a sobrevivência, o crescimento celular, e diferenciação.

P38 no ciclo celular

A super-expressão de p38 α em levedura conduz a redução significativa de proliferação, que indica envolvimento de p38 α em crescimento celular. Uma proliferação mais lenta de células de mamíferos em cultura foi observada quando as células foram tratadas com inibidor de p38 α/β , SB203580.

P38 e hipertrofia cardiomiócita

A ativação e função de p38 em hipertrofia cardiomiócita têm sido estudadas. Durante a progressão de hipertrofia, ambos os níveis de p38 α e p38 β foram aumentados e as respostas hipertróficas omitidas por MKK3 e MKK3 constitutivamente ativas aumentadas por organização sarcomérica e expressão de fator natriurético atrial elevado. Além disso, a sinalização reduzida de p38 no coração promove a diferenciação de miócitos de um mecanismo que envolve a sinalização calcineurin-NFAT.

P38 e desenvolvimento

Apesar da não viabilidade de p38 abater camundongos, existe evidência relacionada ao papel diferencial de p38 em

desenvolvimento. P38 foi ligado a angiogênese de placenta, porém não ao desenvolvimento cardiovascular em diversos estudos. Além disso, p38 foi também ligado à expressão de eritropoietina que sugere um papel em eritropoiese. PRAK
 5 foi recentemente associado ao desenvolvimento celular em implantação de murina. PRAK mRNA, bem como isoformas de p38, foram verificadas como expressos através de desenvolvimento de blastocisto.

P38 e diferenciação celular

10 Verificou-se que p38 α e/ou p38 β desempenham um papel importante em diferenciação celular para diversos tipos de células diferentes. Ambas a diferenciação de células 3T3-L1 em adipócitos e a diferenciação de células PC12 em neurônios exigem p38 α e/ou β . Verificou-se que a trajetória
 15 de p38 é necessária e suficiente para a diferenciação de SKT6 em células hemoglobinizadas bem como a diferenciação de C2C112 em miotubulares.

P38 em senescência e supressão de tumor

O p38 possui um papel em tumorigênese e senescência.
 20 Houve muitos relatos de que a ativação de MKK6 e MKK3 conduz a fenótipo senescente dependente de atividade de MAPK de p38. Além disso, a atividade de MAPK de p38 foi mostrada como responsável por senescência em resposta ao encurtamento de telomere, exposição de H₂O₂, e sinalização
 25 de oncogene RAS. Uma característica comum de células de tumor é uma perda de senescência e p38 é ligado a tumorigênese em certas células. Foi relatado que a ativação de p38 é reduzida em tumores e que a perda de componentes da trajetória de p38 tal como MKK3 e MKK6 resultaram em
 30 proliferação aumentada e semelhança de conversão

tumorigênica independente da linha de célula ou do agente de indução de tumor utilizado nestes estudos.

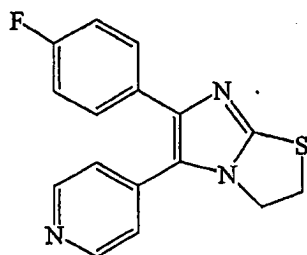
Inibidores de cinase de MAP de p38

Um "inibidor de MAPK de p38" é um composto que inibe a atividade de p38. Os efeitos inibidores de um composto sobre a atividade de p38 podem ser medidos por diversos métodos bem conhecidos àquele versado na técnica. Por exemplo, os efeitos inibitórios podem ser medidos ao medir o nível de inibição de produção de citocina estimulada por lipopolisacarídeo (LPS) (Lee e outros 1988 *Int J Immunopharmacol* 10:835-843; Lee e outros 1993 *Ann NY Acad Sci* 696:149-170; Lee e outros 1994 *Nature* 372:739-746; Lee e outros 1999 *Pharmacol Ther* 82:389-397).

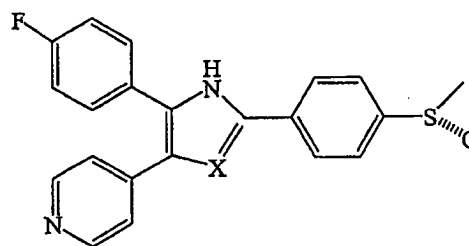
Esforços em desenvolver inibidores de MAPK de p38 focalizaram em aumentar potência. Verificou-se que SB203580 e outros imidazóis de 2,4,5-triaril são potentes inibidores de cinase de p38 com valores de EC_{50} em faixa nanomolar. Por exemplo, verificou-se que para SB203580 o EC_{50} é 48nM. Os piridinilimidazóis SKF 86002 (P1) e SB 203582 (P2) mostrados abaixo foram utilizados como o gabarito para a maioria de inibidores de p38. Publicações recentes (Lee e outros 200 *Imunofarmacologia* 47:185-201) descreveram os inibidores de p38 (P3-P6) mostrados abaixo. Notável dentre estes inibidores é a potência e seletividade relativamente elevadas descritas para o composto P4 (p38 EC_{50} = 0,19 nM) e a inibição de angiogênese acionada por inflamação por SB 220025 (P6).

Dois inibidores de p38 relatados como estando em desenvolvimento clínico são HEP689 (P7) e VX-75 (P8). VX-75 está de forma relatada em testes de Fase II para artrite

reumatóide. A atividade antiinflamatória tópica potente foi descrita para HRP689, que possui desenvolvimento clínico comprovadamente introduzido para explorar seu potencial como um agente tópico para o tratamento de psoríase e 5 outras doenças de pele.

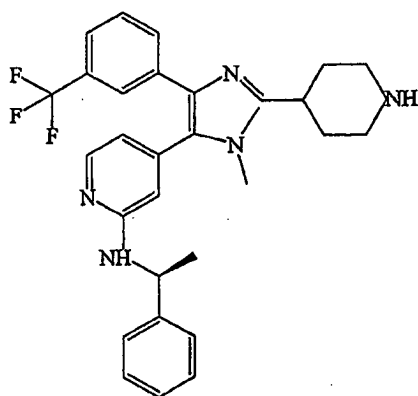


P1 SK&F 86002

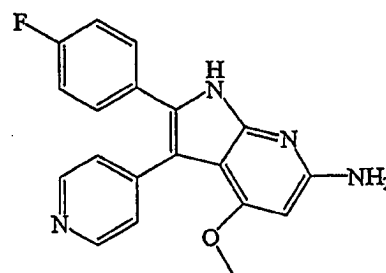


P2 X = N; SB 203580

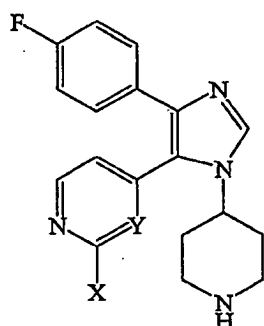
P3 X = CH; L-167307



P4

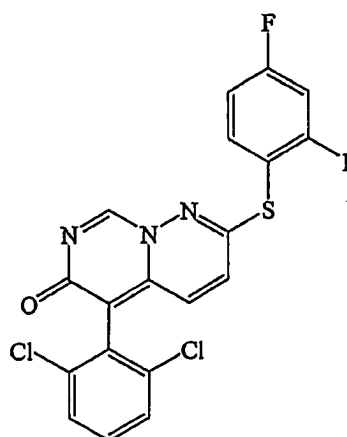


P5 RWJ 68354



P6 X = H, Y = CH; HEP 689 (SB 235699)

P7 X = HN₂, Y = N; SB 220025



P8 VX-745

podem ser encontradas em Boehm e outros 200 *Exp Opin Ther Pat* 10:25-37; e Salituro e outros 1999 *Curr Med Chem* 6:807-823.

Inibidores de p38 preferidos descritos aqui são derivados e análogos de pirfenidona que exibem potência relativamente baixa de inibição de p38 embora, surpreendentemente, ainda tendo um efeito terapêutico relativamente elevado (por exemplo, para modulação de um sistema de SAPK) como resultado de tal inibição. De preferência, os inibidores de p38 das modalidades exibem EC₅₀ na faixa entre aproximadamente 1 µM e aproximadamente 1000 µM, de preferência entre aproximadamente 50 µM e aproximadamente 650 µM para a inibição da MAPK de p38.

DERIVADOS E ANÁLOGOS DE PIRFENIDONA

A própria pirfenidona (5-metil-1-fenil-2-(1H)-piridona) é um composto conhecido e seus efeitos farmacológicos são descritos, por exemplo, nos Pedidos de Patente Japonês KOKAI (em aberto) Nos. 87677/1974 e 1284338/1976. O Pedido de Patente U.S. No. 3.839.346, depositado em 1º de outubro de 1974; Patente U.S. No. 3.974.281, depositada em 10 de agosto de 1976; Patente U.S. No. 4.042.699, depositada em 16 de agosto de 1977; e Patente U.S. No. 4.052.509, depositada em 4 de outubro de 1977, todos os quais são aqui incorporados mediante referência em suas totalidades, descrevem métodos de fabricação de 5-metil-1-fenil-2-(1H)-piridona e sua utilização como um agente antiinflamatório.

Pirfenidona e derivados da mesma são compostos úteis para a modulação de um sistema de proteína cinase ativada por estresse (SAPK).

O termo "alquila" utilizado aqui se refere a uma força monovalente ou radical e cadeia ramificada de um a dez átomos de carbono, incluindo, metila, etila, n-propila, isopropila, n-butila, isobutila, terc-butila, n-hexila, e
5 similares, porém sem se limitar aos mesmos.

O termo "alquenila" utilizado aqui se refere a uma força monovalente ou radical de cadeia ramificada de dois a dez átomos de carbono que contêm uma aglutinação de carbono dupla que inclui, 1-propenila, 2-propenila, 2-metil-1-propenila, 1-butenila, 2-butenila, e similares, porém sem
10 se limitar aos mesmos.

O termo "halogênio" utilizado aqui se refere a fluorina, clorina, bromina, ou iodina.

O termo "haloalquila" utilizado aqui se refere a um ou mais grupos de halogênio anexados a um radical de alquila.
15

O termo "nitroalquila" utilizado aqui se refere a um ou mais grupos de nitro em anexados a um radical de alquila.

O termo "tioalquila" utilizado aqui se refere a um ou mais grupos de tio anexados a um radical de alquila.
20

O termo "hidroxialquila" utilizado aqui se refere a um ou mais grupos de hidróxi anexados a um radical de alquila.

O termo "alcóxi" utilizado aqui se refere a força ou radical de alquila de cadeia ramificada aglutinado à molécula mãe através de uma ligação --O--. Exemplos de grupos de alcóxi incluem metóxi, etóxi, propóxi, isopropóxi, butóxi, n-butóxi, sec-butóxi, t-butóxi e
25 similares.
30

O termo "alcoxialquila" utilizado aqui se refere a um ou mais grupos de alcóxi anexados a um radical de alquila.

O termo "carbóxi" utilizado aqui se refere a $-\text{COOH}$ opcionalmente anexado a um grupo de alquila. Exemplos de grupos de carbóxi incluem, COOH , $-\text{CH}_2\text{COOH}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$, $-\text{CH}(\text{COOH})(\text{CH}_3)$, e similares, porém sem se limitar aos mesmos.

O termo "alcoxicarbonila" utilizado aqui se refere a $-(\text{CO})-\text{O}$ -alquila. Exemplos de grupos de alcoxicarbonila incluem grupo de metoxicarbonila, grupo de etoxicarbonila, grupo de propoxicarbonila e similares, porém sem se limitar aos mesmos.

Carboidratos são aldeídos ou cetonas de polihidróxi, ou substâncias que produzem tais compostos sob hidrólise. Carboidratos compreendem os elementos carbono (C), hidrogênio (H) e oxigênio (O) com uma razão de hidrogênio duas vezes aquela se carbono e oxigênio.

Em sua forma básica, carboidratos são açúcares simples ou monossacarídeos. Estes açúcares simples podem combinar entre si para formar carboidratos mais complexos. A combinação de dois açúcares simples é um dissacarídeo. Carboidratos que consistem em dois a dez açúcares simples são chamados de oligossacarídeos, e aqueles com um grande número são chamados de polissacarídeos.

O termo "uronida" utilizado aqui se refere a um monossacarídeo que possui um grupo de carboxila ($-\text{COOH}$) sobre o carbono que não é parte do anel. O nome uronida retém a raiz do monossacarídeo, porém o sufixo de açúcar -ose é alterado para -uronida. Por exemplo, a estrutura de glucoronida corresponde a glicose.

Conforme utilizado aqui, um radical indica espécie com um eletro desaparelhado, único de tal modo que a espécie que contém o radical possa ser covalentemente aglutinada à outra espécie. Uma vez, neste contexto, um radical não é necessariamente um radical livre. Ao invés disso, um radical indica uma porção de espécie de uma molécula maior. O termo "radical" pode ser utilizado de forma permutável com o termo "grupo".

Como utilizado aqui, um grupo substituído é derivado da estrutura mãe não substituída na qual tenha havido uma permuta de um ou mais átomos de hidrogênio de outro átomo ou grupo. Quando substituído, o(s) grupo(s) substituinte(s) é (são) um ou mais grupos individualmente e independentemente selecionados dentre C₁-C₁₀ alquila, C₁-C₁₀ cicloalquila, arila, arila fundida, heterociclila, heteroarila, hidróxi, C₁-C₁₀ alcóxi, arilóxi, mercapto, C₁-C₁₀ alquiltio, ariltio, ciano, halogênio, carbonila, tiocarbonila, C₁-C₁₀ alcoxicarbonila, nitro, silila, trialometanosulfonila, trifluorometila, e amino, incluindo grupos de amino mono- e di-substituídos, e os derivados protegidos dos mesmos. Os grupos de proteção que podem formar derivados protetores dos substituintes acima são conhecidos daqueles versados na técnica e podem ser encontrados em referências tais como Greene e Wuts *Protective Groups in Organic Synthesis* (Grupos Protetores em Síntese Orgânica) John Wiley e Filhos: nova Iorque, 1999. Onde quer que um substituinte seja descrito como "opcionalmente substituído" aquele substituinte pode ser substituído pelos substituintes acima.

O termo "purificado" se refere a um composto que foi

separado de outros compostos de tal modo que o mesmo compreende pelo menos 95% da substância medida quando ensaiada.

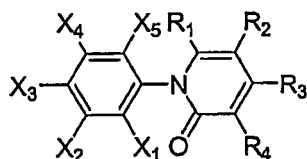
Átomos de carbono assimétrico podem estar presentes nos compostos descritos aqui. Todos tais isômeros, que incluem diastereômeros e enantiômeros, bem como a mistura dos mesmos destinam-se a serem incluídos no âmbito o composto recitado. Em certos casos, compostos podem existir em formas tautoméricas. Todas as formas tautoméricas destinam-se a serem incluídas no âmbito do composto recitado. Da mesma forma, quando compostos contêm um grupo de alquênila ou alquênileo, existe a possibilidade de formas isoméricas cis- e trans- dos compostos. Ambos os isômeros cis- e trans-, bem como as misturas de isômeros cis- e trans-, são contemplados. Sendo assim, a referência aqui a um composto inclui todas as formas isoméricas antes mencionadas a não ser que o contexto claramente indique de outra forma.

Diversas formas são incluídas nas modalidades, incluindo polimorfos, solventes, hidratos, conformadores, sais, e derivados de pró-fármaco. Um polimorfo é uma composição que possui a mesma fórmula química, porém uma estrutura diferente. Um solvente é uma composição formada por solvação (a combinação de moléculas de solvente com moléculas ou íons de soluto). Um hidrato é um composto formado por uma incorporação de água. Um conformador é uma estrutura que é um isômero conformacional. Isomerismo conformacional é o fenômeno de moléculas com a mesma fórmula estrutural, porém conformações diferentes (conformadores) de átomos em torno de uma aglutinação

giratória. Sais de compostos podem ser preparados por métodos conhecidos daqueles versados na técnica. Por exemplo, sais de compostos podem ser preparados ao reagir a base ou ácido apropriado com um equivalente estequiométrico do composto. Um pró-fármaco é um composto que sujeita bio-
 5 transformação (conversão química) antes de exibir seus efeitos farmacológicos. Por exemplo, um pró-fármaco pode desse modo ser visualizado como uma droga que contém grupos protetores especializados utilizados de uma forma transitória para alterar ou para eliminar propriedades indesejadas na molécula mãe. Sendo assim, a referência aqui a um composto inclui todas as formas abaixo mencionadas a não ser que o contexto claramente indique outra forma.

Os compostos descritos acima são úteis nos métodos descritos aqui. Em uma modalidade, um composto como descrito abaixo exibe um EC_{50} na faixa entre aproximadamente 1 μM e aproximadamente 1000 μM para inibição de MAPK de p38.

Uma modalidade propicia uma família de compostos representada pelo gênero que se segue (Gênero Ia):



25 Gênero Ia;

onde

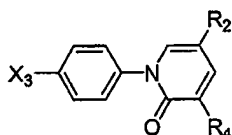
R_1 , R_2 , R_3 e R_4 são independentemente selecionados dentre o grupo que consiste de H, C_1 - C_{10} alquila, C_1 - C_{10} alquila substituída, C_1 - C_{10} alquenila, C_1 - C_{10} haloalquila, C_1 - C_{10} nitroalquila, C_1 - C_{10} tioalquila, C_1 - C_{10} hidroxialquila,
 30

C₁-C₁₀ alcóxi, fenila, fenila substituída, halogênio, C₁-C₁₀ alcoxialquila, C₁-C₁₀ carbóxi, alcoxycarbonila, CO-uronida, CO-monossacarídeo, CO-oligossacarídeo, e CO-polissacarídeo; e

5 X₁, X₂, X₃, X₄, e X₅ são independentemente selecionados a partir do grupo que consiste em H, halogênio, C₁-C₁₀ alcóxi e hidróxi.

Outra modalidade fornece uma família de compostos representada pelo gênero que se segue (Gênero Ib):

10



Gênero Ib

onde

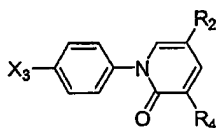
15 X₃ é selecionado a partir do grupo que consiste em H, halogênio, C₁-C₁₀ alcóxi, e OH;

 R₂ é selecionado do grupo que consiste em H, halogênio, C₁-C₁₀ alquila, C₁-C₁₀ alquila substituída, C₁-C₁₀ hidroxialquila, C₁-C₁₀ alcoxialquila, C₁-C₁₀ carbóxi, C₁-C₁₀ alcoxycarbonila, CO-uronida, CO-monossacarídeo, CO-oligossacarídeo, e CO-polissacarídeo; e

20 R₄ é selecionado do grupo que consiste em H, halogênio, e OH.

Outra modalidade propicia uma família de compostos representada pelo gênero que se segue (Gênero Ic):

25



Gênero Ic,

30

onde

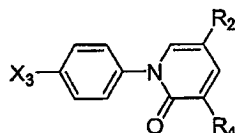
X_3 é selecionado do grupo que consiste em H, F, OH, e OCH_3 ;

R_2 é selecionado do grupo que consiste em H, CF_3 , CHF_2 , CH_2F , CH_2OH , $COOH$, CO-Glucoronida, Br, CH_3 , e CH_2OCH_3 ;

5 e

R_4 é selecionado do grupo que consiste em H e OH; sob a condição de que quando R_4 e X_3 são H, R_2 não é CH_3 .

10 Outra modalidade propicia uma família de compostos representados pelo subgênero que se segue (Subgênero II):



Subgênero II;

15 onde

X_3 é selecionado do grupo que consiste em H, OH, e OCH_3 ;

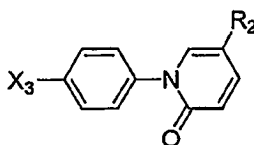
R_2 é selecionado do grupo que consiste em H, CF_3 , CHF_2 , CH_2F , CH_2OH , $COOH$, CO-Glucoronida, Br, CH_3 , e CH_2OCH_3 ;

20 e

R_4 é selecionado do grupo que consiste em H e OH, sob a condição de que quando R_4 e X_3 são H, R_2 não é CH_3 .

Outra modalidade propicia uma família de compostos representada pelo subgênero que se segue (Subgênero III):

25



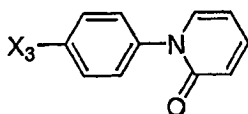
Subgênero III;

30 em que

X_3 é selecionado do grupo que consiste em H, F, e OH;
e

R_2 é selecionado do grupo que consiste em H, Br, CH_2F , CHF_2 , e CF_3 .

5 Outra modalidade propicia uma família de compostos representada pelo subgênero que se segue (Subgênero IV):

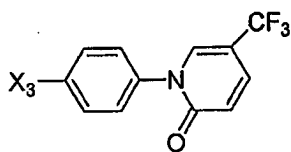


10

Subgênero IV;

onde X_3 é selecionado do grupo que consiste em H, halogênio, C_1-C_{10} alcóxi, C_1-C_{10} alquila, C_1-C_{10} alquila substituída, C_1-C_{10} alquenila, C_1-C_{10} haloalquila, C_1-C_{10} nitroalquila, C_1-C_{10} tioalquila, C_1-C_{10} hidroxialquila, fenil, fenil substituído, C_1-C_{10} alcoxialquila, C_1-C_{10} carbóxi, C_1-C_{10} alcoxycarbonila, CO-uronida, CO-monossacarídeo, CO-oligossacarídeo, e CO-polissacarídeo.

15 Outra modalidade propicia uma família de compostos representada pelo subgênero que se segue (Subgênero V):



25

Subgênero V;

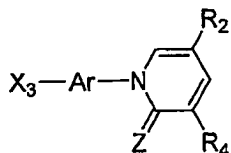
em que X_3 é selecionado do grupo que consiste em H, halogênio, C_1-C_{10} alcóxi, C_1-C_{10} alquila, C_1-C_{10} alquila substituída, C_1-C_{10} alquenila, C_1-C_{10} haloalquila, C_1-C_{10} nitroalquila, C_1-C_{10} tioalquila, C_1-C_{10} hidroxialquila, fenila, fenila substituída, C_1-C_{10} alcoxialquila, C_1-C_{10}

30

carbóxi, C₁-C₁₀ alcóxicarbonila, CO-uronida, CO-monossacarídeo, CO-oligossacarídeo, e CO-polissacarídeo.

Outra modalidade propicia uma família de compostos representada pelo subgênero que se segue (Subgênero VI):

5



Gênero VI;

10

onde

Ar é piridinila ou fenila;

Z é O ou S;

X₃ é H, F, Cl, OH, CH₃, ou OCH₃;

R₂ é metila, C(=O)H, C(=O)CH₃, C(=O)OCH₃, C(=O)O-glucosila, fluorometila, difluorometila, trifluorometila, bromo, metilmetoxila, metilhidroxila, ou fenila; e

15

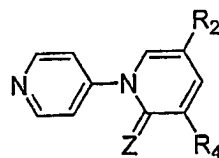
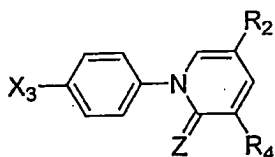
R₄ é H ou uma hidroxila;

20

Sob a condição de que quando R₂ é trifluorometil, Z é O, R₄ é H e Ar é fenila, a fenila não é apenas substituída na posição 4' por h, F, ou OH.

O Gênero VI inclui as famílias de compostos representada pelo Subgênero VIa e o Subgênero VIb:

25



Subgênero VIa

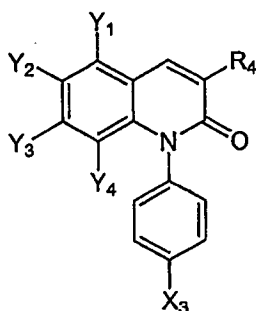
Subgênero VIb

onde Z, X₃, R₂ e R₄ são definidos como em Gênero VI.

Será reconhecido que o anel de fenila na estrutura

representada por Subgênero VIA é substituída por X_3 na posição 4'.

Outra modalidade propicia uma família de compostos representada pelo gênero que se segue (Gênero VII):



Gênero VII

em que

X_3 é selecionado do grupo que consiste em H, halogênio, C_1 - C_{10} alcóxi, e OH;

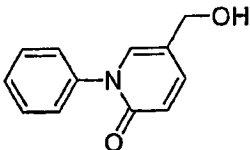
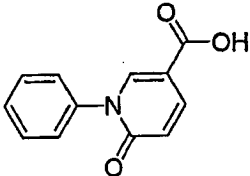
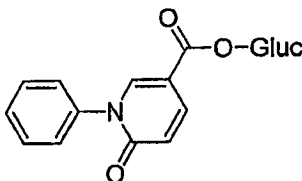
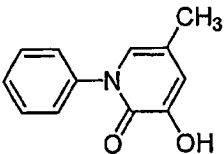
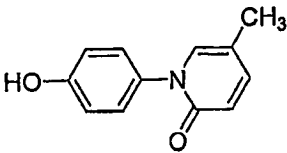
Y_1 , Y_2 , Y_3 e Y_4 são independentemente selecionados dentre o grupo que consiste de H, C_1 - C_{10} alquila, C_1 - C_{10} alquila substituída, C_1 - C_{10} alquenila, C_1 - C_{10} haloalquila, C_1 - C_{10} nitroalquila, C_1 - C_{10} tioalquila, C_1 - C_{10} hidroxialquila, C_1 - C_{10} alcóxi, fenila, fenila substituída, halogênio, hidroxila, C_1 - C_{10} alcoxialquila, C_1 - C_{10} carbóxi, C_1 - C_{10} alcoxycarbonila; e

R_4 é selecionado do grupo que consiste em H, halogênio, e OH.

Será reconhecido que um composto específico descrito aqui pode ser um elemento de mais do que um dos diversos gêneros descritos acima. Os compostos descritos aqui são úteis para modular um sistema de proteína cinase ativada por estresse (SAPK). Compostos exemplificativos de gêneros Ia-c, Subgêneros II-V e gêneros VI e VII que são úteis para

modular um sistema de proteína cinase ativada por estresse (SAPK) são estabelecidos adiante na Tabela 1 abaixo. Os compostos 1-6 são exemplos de compostos de Subgênero II. Compostos 7-12 são exemplos de compostos de Subgênero III. O composto 13 é pirfenidona, um exemplo de um composto do Subgênero II. Compostos 14-32 são exemplos de compostos de Gênero VI. O composto 33 é um exemplo de Gênero VII.

Tabela 1

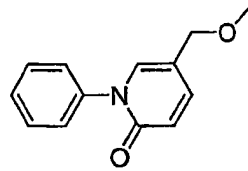
Número do composto	Número do composto	Composto
10	1	
15	2	
20	3	
25	4	
30	5	
Número do		

Composto

composto

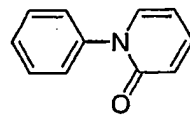
5

6



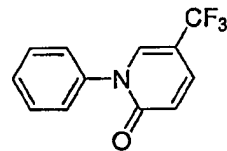
10

7



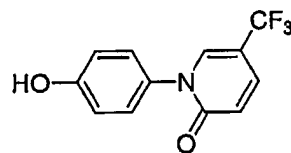
15

8



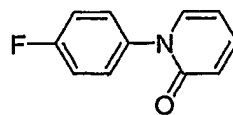
20

10

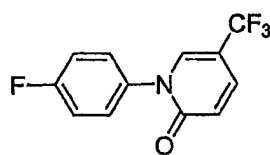


25

11



12

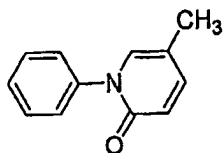


Número do
composto

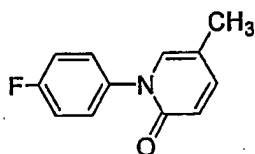
Composto

5

13

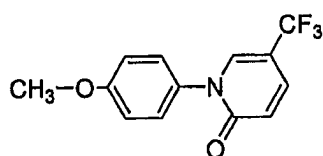


14

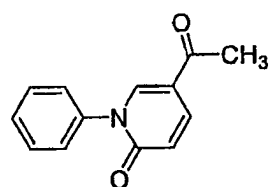


10

15

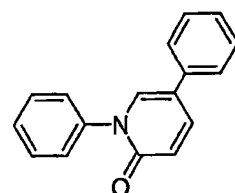


16



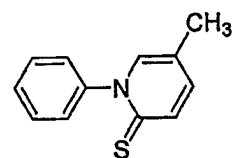
15

17

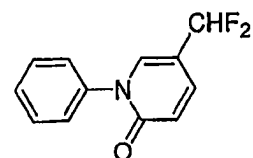


20

18

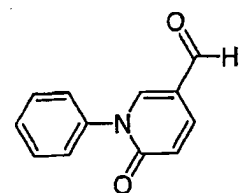


19

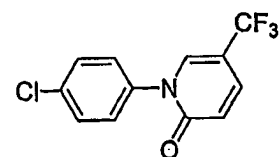


25

20



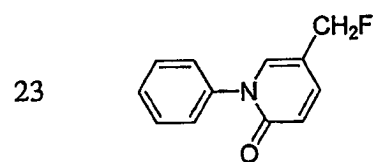
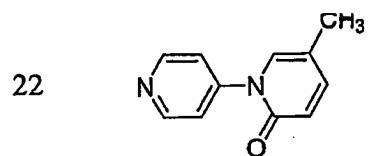
21



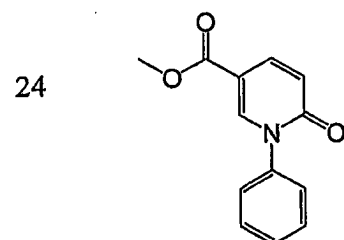
30

Número do composto	Composto
-----------------------	----------

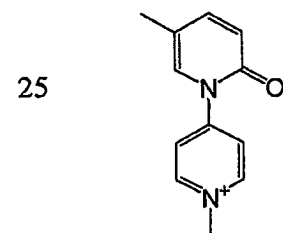
5



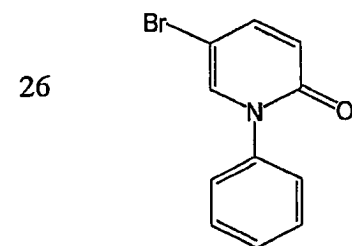
10



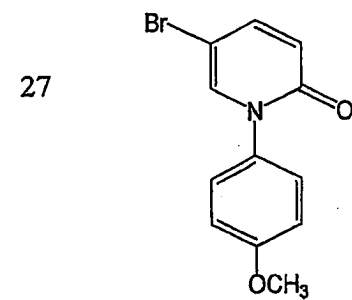
15



20



25



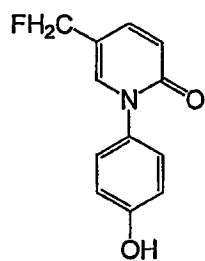
30

Número do
composto

Composto

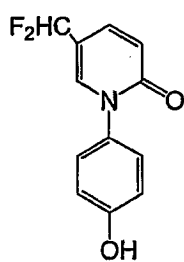
5

28



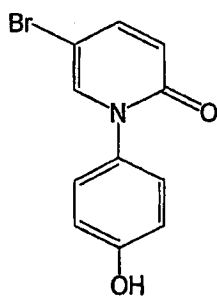
10

29



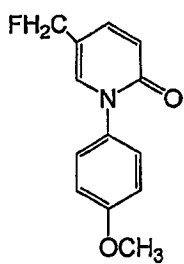
15

30



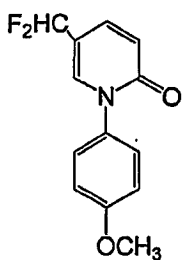
20

31



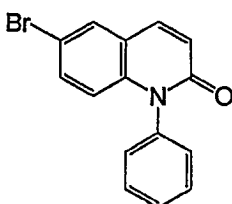
25

32



30

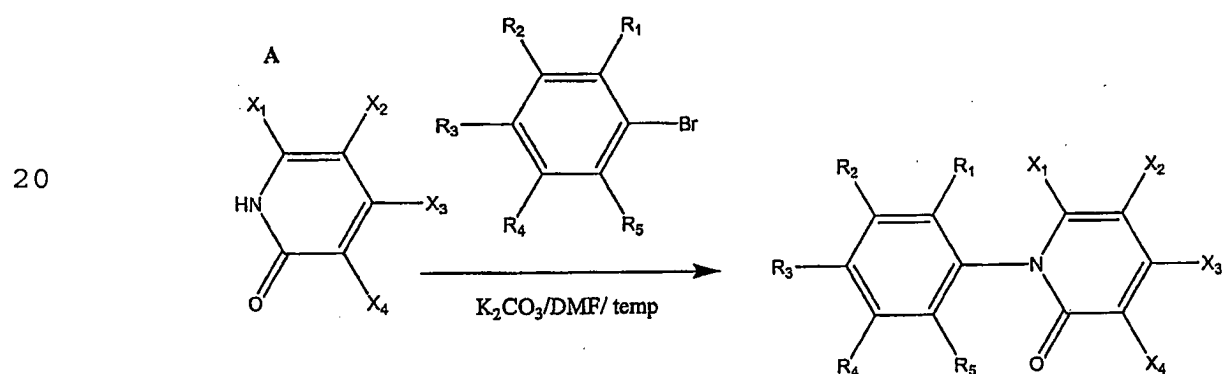
33



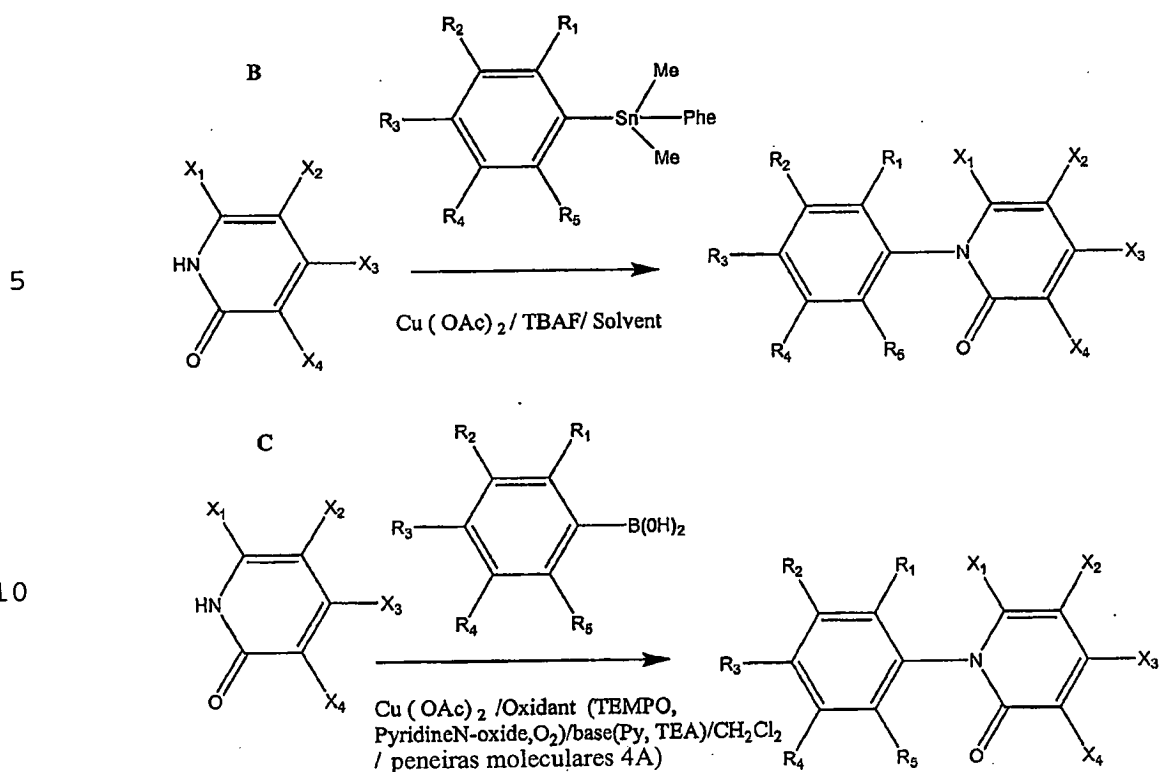
Outra modalidade é direcionada para purificar compostos representados por gêneros Ia-c, Subgêneros II-V e/ou gêneros VI e VII. O grau de pureza pode ser expresso como uma percentagem conforme descrito acima. Em 5 modalidades preferidas, compostos purificados representados por gêneros Ia-c, Subgêneros II-V e/ou gêneros VI e VII possuem uma pureza de aproximadamente 96% ou superior, mais preferivelmente aproximadamente 98% ou superior, em peso com base no peso total da composição que compreende o 10 composto purificado. Por exemplo, uma modalidade propicia Composto purificado 3 (Tabela 1).

Compostos de gêneros Ia-c, Subgêneros II-V e/ou gêneros VI e VII podem ser sintetizados ao utilizar diversas reações. Exemplos de síntese incluem o que se 15 segue, designados Esquemas Sintéticos 1, 2, e 3.

Esquema Sintético 1

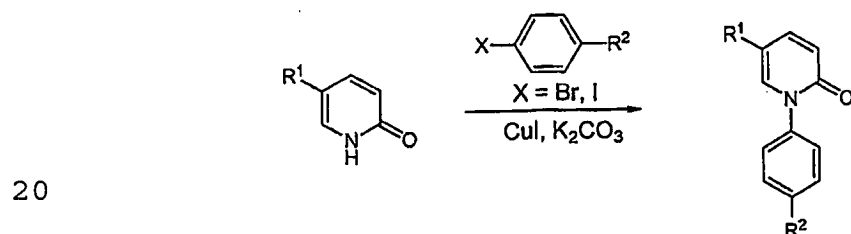


25 $X_1=X_2=X_3=X_4=$ H, alquila, alquenila, nitroalquila, tioalquila, fenila, fenila substituída, CH_2PHe , halogênio, hidróxi, alcóxi, haloalquila
 $R_1=R_2=R_3=R_4=$ H, alquila, alquenila, nitroalquila, tioalquila, fenila, fenila substituída, CH_2PHe , halogênio, hidróxi, alcóxi, haloalquila



II

15 Esquema sintético 2

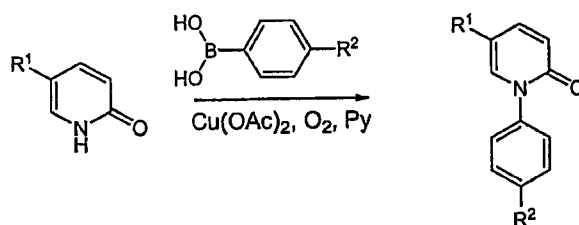


Reação de Ullmann: Chem.Pharm.Bull 45(4) 719-721. N-aril-piridina-2 alvos foram obtidos através de arilação de 2-hidroxipiridinas. A reação de Ullmann é útil na
25 preparação de compostos descritos, exceto os análogos de 5-bromo e composto 33 que são permitidos, por exemplo, pelo esquema sintético 3.

A mistura de 2-hidroxipiridina (1 mmol), aril iodeto
30 e brometo (2 mmol), CuI (0,1-0,5 mmol) e carbonato de

potássio anidroso (1 mmol) em DMF (3 ml) foi agitada durante a noite a 130°C sob atmosfera de argônio. A mistura de reação profundamente colorida foi adicionada em etil acetato e 10% de hidróxido de amônio. A camada orgânica foi lavada com salmoura e seca sobre sulfato de magnésio. A cromatografia de coluna fornece compostos alvo como sólidos cor-de-areia em produção de 25-60%.

Esquema sintético 3



15 N-aryl-2-piridonas alvo podem ser obtidos através de arilação de 2-hidroxipiridinas com ácidos alquilborônicos (TetrahedronLett. 42 (2001) 3415-3418). A rota de ácido alquilborônico é útil na preparação de compostos descritos. Uma mistura de 2-hidroxipiridina (5 mmol), ácido

20 arilborônico (10 mmol), acetato de cobre (II) (0,5-1 mmol), piridina (10 mmol) e peneiras moleculares 4A (0,5-1 g) em diclorometano (25 ml) foi agitada por 24-48 horas em temperatura ambiente aberta ao ar. A mistura de reação foi lavada com bicarbonato de sódio saturado com EDTA fase

25 orgânica foi seca sobre sulfato de sódio. N-aryl-2-piridonas alvo foram isoladas por cromatografia e coluna como sólidos brancos em produção de 85-100%.

Como derivados de pirfenidona, os compostos de gêneros Ia-c, Subgêneros II-V e/ou gêneros VI e VII podem

30 também ser sintetizados por quaisquer reações convencionais

conhecidas da técnica com base nos esquemas sintéticos conhecidos para pirfenidona, tal como descrito nas Patentes U.S. Nos. 3.839.346; 3.974.281; 4.042.699 e 4.052.509, todos aqui expressamente incorporadas mediante referência
5 em suas totalidades.

Materiais de partida descritos aqui estão comercialmente disponíveis, são conhecidos, ou podem ser preparados por métodos conhecidos na técnica. Além disso, materiais de partida não descritos aqui estão disponíveis
10 comercialmente, são conhecidos, ou podem ser preparados por métodos conhecidos na técnica.

Materiais de partida podem possuir os substituintes apropriados para essencialmente fornecer produtos desejados com os substituintes correspondentes. De forma alternativa,
15 substituintes podem ser adicionados em qualquer ponto de síntese para essencialmente fornecer produtos desejados com os substituintes correspondentes.

Os Esquemas sintéticos 1-3 mostram métodos que podem ser utilizados para preparar compostos de gêneros Ia-c,
20 Subgêneros II-V e/ou gêneros VI e VII. Aquele versado na técnica observará que um número de esquemas de reação sintética diferentes pode ser utilizado para sintetizar os compostos de gêneros Ia-c, Subgênero II-V e/ou gêneros VI e VII. Além disso, aquele versado na técnica entenderá que um
25 número de solventes diferentes, agentes de acoplamento, e condições de reação pode ser utilizado nas reações de síntese para produzir resultados comparáveis.

Aquele versado na técnica observará variações na seqüência e, além disso, reconhecerá variações nas
30 condições de reação apropriadas a partir de reações

análogas mostradas ou de outra forma conhecidas que podem ser apropriadamente utilizadas nos processos acima para fazer os compostos de gêneros Ia-c, Subgêneros II-V e/ou gêneros VI e VII.

5 Nos processos descritos aqui para a preparação dos compostos de compostos de gêneros Ia-c, Subgêneros II-V e/ou gêneros VI e VII, a utilização de grupos protetores é normalmente bem reconhecida por aquele versado na técnica de química orgânica, e conseqüentemente a utilização de
10 grupos de proteção apropriados pode em alguns casos ser implicada pelos processos dos esquemas aqui, embora tais grupos possam não estar expressamente ilustrados. Introdução e remoção de tais grupos de proteção adequados são bem conhecidas na técnica de química orgânica; vide,
15 por exemplo, T.W. Greene, "Protective Groups in Organic Synthesis" (Grupos Protetores em Síntese Orgânica), Wiley (nova Iorque), 1999. Os produtos das reações descritos aqui podem ser isolados por meios convencionais tais como extração, destilação, cromatografia, e similares.

20 Os sais, por exemplo, sais farmacologicamente aceitáveis, dos compostos de gêneros Ia-c, Subgêneros II-V e/ou gêneros VI e VII podem ser preparados ao reagir a base ou ácido apropriado com equivalente estequiométrico dos compostos. De forma similar, derivados farmacologicamente
25 aceitáveis (por exemplo, ésteres), metabolitos, hidratos, solventes e pró-fármacos dos compostos de gêneros Ia-c, Subgêneros II-V e/ou gêneros VI e VII podem ser preparados por métodos normalmente conhecidos daqueles versados na técnica. Sendo assim, outra modalidade propicia compostos
30 que são pró-fármacos de um composto ativo. Em geral, um

pró-fármaco é um composto que é metabolizado *in vivo* (por exemplo, através de uma transformação metabólica tal como deaminação, dealquilação, de-esterificação, e similares) para propiciar um composto ativo. Um "pró-fármaco farmaceuticamente aceitável" significa um composto que é, dentro do âmbito de julgamento médico de som, adequado para utilização farmacêutica em um paciente sem toxicidade, irritação, resposta alérgica indevidos, e similares, e eficaz para a utilização pretendida, que inclui um éster farmaceuticamente aceitável bem como uma forma zwitteriônica, onde possível, dos compostos das modalidades. Exemplos de tipos de pró-fármacos farmaceuticamente aceitáveis são descritos em T. Higuchi e V. Stella, Pró-fármacos como Novos Sistemas de Administração, Vol, 14 da Série de Simpósio A.C.S., e em Edward B. Roche, ed., Portadoras Bio-reversíveis em Projeto de Drogas Associação Farmacêutica Americana e Editora Pergamon, 1987, ambos os quais são aqui expressamente incorporados mediante referência em suas totalidades.

Os compostos e composições descritos aqui podem também incluir metabolitos. Como utilizado aqui, o termo "metabolitos" significa um produto de metabolismo de um composto das modalidades ou um sal, análogo ou derivado dos mesmos, farmaceuticamente aceitável, que exibe uma atividade similar *in vitro* ou *in vivo* a um composto das modalidades. Os compostos e composições descritos aqui podem também incluir hidratos e solvatos. Como utilizado aqui, o termo "solvato" refere-se a um complexo formado por um soluto (aqui, um composto de gêneros Ia-c, Subgêneros II-V e/ou gêneros VI e VII) e um solvente. Tais solventes

para o propósito das modalidades de preferência não deveriam interferir com a atividade biológica do soluto. Os solventes podem ser, a título de exemplo, água, etanol, ou ácido acético. Em vista do que se segue, a referência aqui a um composto ou gênero de composto específico será entendida para incluir as diversas formas descritas acima, que incluem saias farmacêuticamente aceitáveis, ésteres, pró-fármacos, metabolitos e solvatos dos mesmos a não ser que estabelecido de outra forma.

10 **Métodos para inibir cinase de p38**

Em uma modalidade, são propiciados métodos para modular um sistema SAPK, *in vitro* ou *in vivo*. Os métodos incluem contatar uma concentração de modulação de SAPK de um composto com pelo menos uma MAPK de p38 (por exemplo, ao contatar o composto com uma célula ou tecido que contenha pelo menos uma MAPK de p38), em que o composto possua uma potência relativamente baixa para inibição de pelo menos uma MAPK de p38, que corresponde a uma concentração inibitória relativamente elevada para inibição de pelo menos uma MAPK de p38 pelo composto.

"Contatar a célula" refere-se a uma condição na qual um composto ou outra composição de matéria está em contato direto com uma célula ou tecido, ou está próximo o suficiente para induzir um efeito biológico desejado em uma célula ou tecido. Por exemplo, contatar uma célula ou tecido que contém MAPK de p38 com um composto pode ser induzido de qualquer forma que permita uma interação entre MAPK de p38 e o composto, quer resulta no efeito biológico desejado em uma célula. Contatar uma célula ou tecido pode ser conseguido, por exemplo, através de intermistura ou

administração de um composto (tal como um composto de gêneros Ia-c, Subgêneros II-V e/ou gêneros VI e VII e/ou um sal, éster, pró-fármaco e/ou intermediário dos mesmos, e/ou uma composição farmacêutica que compreende um ou mais dos anteriores).

De forma alternativa, contatar uma célula ou tecido pode ser conseguido ao induzir um composto de uma forma tal que o composto será marcado, direta ou indiretamente, para uma célula ou tecido que contém MAPK de p38. Contatar uma célula ou tecido pode ser conseguido sob condições tais que um composto se une a pelo menos uma MAPK de p38. Tais condições podem incluir proximidade do composto e tecido ou célula contendo p38, pH, temperatura, ou qualquer condição que afete a união de um composto para MAPK de p38.

Em certas modalidades, a célula é contatada com o composto *in vitro*; em outras modalidades, a células é contatada com o composto *in vivo*.

Quando a célula é contatada *in vivo*, a concentração eficaz (EC) de um composto é uma concentração que resulta em uma redução de um ponto final especificado por uma percentagem de alvo (por exemplo, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%) relativa à redução observável máxima do ponto final especificado por aquele composto. Tal ponto final pode ser uma resposta psicológica, por exemplo, redução em sangue ou outra concentração de fluido corporal de TNF α . Por exemplo, EC₅₀, EC₄₀, EC₃₀, EC₂₀ e EC₁₀ são determinados como concentrações que resultam em reduções na concentração de soro de TNF α em 50%, 40%, 30%, 20% e 10%, respectivamente, relativos à redução observável máxima sobre uma curva de resposta de dose.

Quando a célula é contatada *in vitro*, exceto em um ensaio a base de célula, a concentração eficaz (EC) é uma concentração que resulta em uma redução na atividade do alvo especificado por uma percentagem determinada (por exemplo, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%). Por exemplo, EC₅₀, EC₄₀, EC₃₀, EC₂₀ e EC₁₀ são determinados como concentrações que resultam em reduções na atividade ao alvo especificado em 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, respectivamente, sobre uma curva de resposta de dose. Quando a inibição completa de um alvo especificado não é obtida, a concentração eficaz (EC) de um composto é uma concentração que resulta em uma redução de uma atividade de alvo por uma percentagem determinada (por exemplo, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%) relativa à redução máxima da atividade de alvo por aquele composto.

Quando a célula é contatada *in vitro*, em um ensaio a base de célula, a concentração eficaz (EC) de um composto é uma concentração que resulta em uma redução na atividade de um ponto final especificado por uma percentagem alvo (por exemplo, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%) relativa à redução observável máxima do ponto final especificado por aquele composto. Tal ponto final pode ser uma resposta celular, por exemplo, redução na secreção de TNF α como determinado pela concentração de TNF α no meio celular. Por exemplo, EC₅₀, EC₄₀, EC₃₀, EC₂₀ e EC₁₀ são determinados como concentrações que resultam em reduções na concentração de TNF α em 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, respectivamente, relativo à redução observável máxima sobre uma curva de resposta de dose.

A EC₅₀ do composto de modulação de sistema SAPK está de preferência na faixa entre aproximadamente 1 μ M e 1000

μM , mais preferivelmente entre aproximadamente 50 μM e aproximadamente 650 μM para inibição de pelo menos uma MAPK de p38. Sendo assim, por exemplo, a modulação do sistema SAPK pode envolver contatar um composto (por exemplo, um
5 composto de Gêneros Ia-c, Subgêneros II-V e/ou Gêneros VI e VII) com pelo menos uma MAPK de p38 em uma concentração que seja inferior a uma EC_{40} , de preferência inferior do que EC_{30} , mais preferivelmente inferior a EC_{20} , ainda mais preferivelmente inferior a EC_{10} para inibição de pelo menos
10 uma MAPK de p38 pelo composto conforme determinado sobre uma curva de resposta de dose *in vivo*.

Em certas modalidades, o composto é propiciado na forma de uma composição farmacêutica, junto de uma portadora farmacêuticamente aceitável.

15 **Rastreando uma biblioteca de compostos para inibidores de p38 de potência baixa**

Em outro aspecto, um método é propiciado para identificar um composto farmacêuticamente ativo, por exemplo, para determinar se um composto é potencialmente
20 útil como um agente terapêutico, por exemplo, para a prevenção ou tratamento de uma condição inflamatória (tal como condição associada a p38- ou citocina). O método inclui ensaiar diversos compostos para inibição de pelo menos um MAPK de p38 e selecionar um composto que exiba uma
25 potência relativamente baixa para inibir MAPK de p38. De preferência, um EC_{50} de tal composto inibidor de p38 de potência baixa está na faixa entre aproximadamente 1 μM e aproximadamente 1000 μM , de preferência aproximadamente 50 μM e aproximadamente 650 μM para inibição de pelo menos um
30 MAPK de p38. A pluralidade de compostos a serem ensaiados é

de preferência selecionada a partir de uma biblioteca de compostos potenciais. O ensaio da pluralidade de compostos a partir da biblioteca pode ser conduzido de diversas formas. Por exemplo, em algumas modalidades, os métodos
5 compreendem ainda contatar pelo menos um MAPK de p38 com a pluralidade de compostos, e determinar se os compostos inibem a atividade de citocinas. Um MAPK de p38 é de preferência selecionado a dentre um grupo que consiste em p38 α , p38 β , p38 γ , e p38 δ . Em modalidades preferidas, a
10 etapa de contato toma lugar *in vitro*; em certas modalidades preferidas, a etapa de contato compreende contatar uma célula que compreende MAPK p38 com o composto.

Em ainda outra modalidade, métodos são propiciados para inibir a atividade de MAPK de p38 em uma célula, *in vitro* ou *in vivo*. Em geral, tais métodos incluem contatar
15 uma célula que contém pelo menos um MAPK de p38 com uma quantidade eficaz de inibição de p38 de um composto (por exemplo, um composto de Gêneros Ia-c, Subgêneros II-V e/ou Gêneros VI e VII), sob condições tais que a atividade de
20 p38 na célula seja inibida. Exemplos de tais métodos são propiciados na seção de EXEMPLOS abaixo. O composto de preferência exibe um EC₅₀ na faixa entre aproximadamente 1 μ M e aproximadamente 1000 μ M, de preferência aproximadamente 50 μ M e aproximadamente 650 μ M para
25 inibição de pelo menos um MAPK de p38. O contato de pelo menos um MAPK de p38 com o composto é de preferência conduzido em uma concentração de modulação de sistema SAPK que seja inferior a EC₃₀, de preferência inferior a EC₂₀, mais preferivelmente inferior a EC₁₀ para inibição de pelo
30 menos um MAPK de p38 pelo composto.

Métodos *in vivo* incluem, por exemplo, introduzir em um grupo de animais oralmente ou por injeção de um composto de interesse (por exemplo, um composto de Gêneros Ia-c, subgêneros II-V e/ou Gêneros VI e VII) em diversas concentrações. Seguindo a introdução do composto, é administrado lipopolissacarídeo de forma intravenosa. Níveis de THFa de soro são medidos e comparados àqueles de animais de controle. Os compostos preferidos inibem a liberação de THFa, reduzindo desse modo os níveis de THFa nas amostras de sangue de animais testados. O composto de preferência exibe uma EC_{50} na faixa entre aproximadamente 1 μM e aproximadamente 1000 μM , de preferência aproximadamente 50 μM e aproximadamente 650 μM na faixa de liberação de THFa.

O método para identificar um composto farmacologicamente ativo pode ainda incluir determinar uma toxicidade em mamíferos do composto selecionado. Tais métodos são normalmente conhecidos daqueles versados na técnica. O método para identificar um composto farmacologicamente ativo pode também incluir administrar o composto selecionado a um objeto de teste, tanto em conjunto com a determinação de toxicidade em mamíferos quanto por outras razões. Em uma modalidade, os objeto de teste possui ou está em risco de possuir uma condição inflamatória. De preferência o objeto de teste é um mamífero, e pode ser um humano.

Métodos de tratamento e/ou prevenção

Outra modalidade propicia métodos para tratar e impedir estados de doenças, por exemplo, condição(ões) inflamatória(s) e/ou condição(ões) fibrótica(s). Os métodos

incluem identificar um objeto em risco de ou que possua pelo menos uma condição selecionada a partir de uma condição inflamatória e uma condição fibrótica e administrar um composto ao objeto em uma quantidade eficaz para tratar ou impedir a condição inflamatória e/ou condição fibrótica. Em modalidades preferidas, o composto exibe uma EC_{50} na faixa entre aproximadamente 1 μM e aproximadamente 1000 μM , de preferência aproximadamente 50 μM e aproximadamente 650 μM para inibição de pelo menos um MAPK de p38. Em modalidades preferidas, a quantidade efetiva produz sangue ou soro ou outra concentração de fluido corporal que é inferior a uma EC_{30} , ou de preferência, uma EC_{20} ou, mais preferivelmente, uma EC_{10} para inibição de MAPK de p38 pelo composto. Em modalidades preferidas, o composto exibe uma EC_{50} na faixa entre aproximadamente 1 μM e aproximadamente 1000 μM , de preferência aproximadamente 50 μM e aproximadamente 650 μM para inibição da secreção de THF α . Em outras modalidades preferidas, a quantidade eficaz produz sangue ou soro ou outra concentração de fluido corporal que é inferior a uma EC_{30} , ou de preferência, uma EC_{20} ou, mais preferivelmente, uma EC_{15} ou, mais preferivelmente, uma EC_{10} para inibição de liberação de THF α estimulada por LPS em um fluido corporal pelo composto. A quantidade eficaz é de preferência aproximadamente 70% ou inferior, mais preferivelmente inferior a aproximadamente 50%, de uma quantidade que provoca um efeito indesejável no objeto, tal como, sonolência, náusea, sintoma de frio, incômodo gastrointestinal, e erupção fotossensível, porém sem se limitar aos mesmos. O composto utilizado para o tratamento

ou prevenção é de preferência um composto de Gêneros Ia-c, Subgêneros II-V e/ou Gêneros VI e VII.

Métodos para identificar um objeto em risco de ou que possua uma condição inflamatória são bem conhecidos daqueles versados na técnica. Exemplos de condições inflamatórias que podem ser tratadas ou impedidas pelos métodos descritos aqui incluem condições associadas a p38, por exemplo, condições associadas com atividade de citocina alterada, condições associadas com a modulação de um sistema SAPK, doenças auto-imunes, e doenças associadas a inflamação aguda e crônica. A citocina (ou citocinas) é (são) de preferência selecionada a partir de um grupo que consiste em IL-1 β , IL-6, IL-8, e THF α . Em uma modalidade, o composto utilizado para trata ou impedir a condição inflamatória é composto que inibe uma cinase na trajetória de sinalização de SAPK. Exemplos de compostos preferidos incluem um composto de Gêneros Ia-c, Subgêneros II-V e/ou Gêneros VI e VII>

O termo "condição associada a p38" significa uma doença ou outras condições deletérias nas quais a trajetória de sinalização de cinase de MAP de p38 é implicada, quer direta ou indiretamente. Exemplos de condições associadas a p38 incluem condições provocadas por desregulamento ou super-expressão de IL-1 β , THF α , IL-6 ou IL-8 que resultante de níveis suspendidos, prolongados, aumentados ou elevados de atividade de p38. Tais condições incluem, sem limitação, doenças inflamatórias, doenças auto-imunes, doenças fibróticas, desordens destrutivas dos ossos, doenças proliferativas, doenças infecciosas, doenças neuro-degenerativas, alergias, isquemia de re-perfusão em

derrame, ataques cardíacos, desordens angiogênicas, hipóxia dos órgãos, hiperplasia vascular, hipertrofia cardíaca, agregação de plaquetas induzida por trombina, e condições associadas com a prostaglandina ou trajetórias de
 5 ciclooxigenase, por exemplo, condições que envolvem síntese de endoperoxídeo de prostaglandina. Uma condição associada a p38 pode incluir qualquer condição associada a ou mediada por uma isoforma de p38.

Uma "condição fibrótica", "condição
 10 fibroproliferativa", "doença fibrótica", "doença fibroproliferativa", "desordem fibrótica", e "desordem fibroproliferativa" são utilizadas de forma permutável para referir-se a uma condição, doença ou desordem que é
 15 caracterizada por proliferação desregulada ou atividade de fibroblastos e/ou acumulação patológica ou excessiva de tecido de colágeno. Normalmente, qualquer doença, desordem ou condição é passível de ser amenizada para tratamento através de administração de um composto que possui
 20 atividade anti-fibrótica. Desordens fibróticas incluem fibrose pulmonar idiopática (IPF) e fibrose pulmonar proveniente de uma etiologia conhecida, fibrose de fígado, e fibrose renal. Outras condições fibróticas
 25 exemplificativas incluem fibrose músculo-esquelética, fibrose cardíaca, aderências pós-cirúrgicas, esclerodermia, glaucoma, e lesões da pele tais como quelóides.

O termo "sistema de SAPK de modulação" significa aumentar ou diminuir a atividade da atividade de sistema de
 proteína cinase ativada por estresse, por exemplo, ao
 30 inibir a atividade de p38, quer *in vitro* ou *in vivo*. Em certas modalidades, o sistema de SAPK é modulado quando a

atividade de p38 em uma célula é inibida em aproximadamente 50%, de preferência em aproximadamente 40%, mais preferivelmente em aproximadamente 30%, ainda mais preferivelmente em aproximadamente 20%, ou ainda mais preferivelmente em aproximadamente 10% comparada à
5 atividade de p38 de uma célula de controle não tratada.

Uma condição associada à atividade de citocina alterada, como utilizado aqui, refere-se a uma condição na qual a atividade de citocina é alterada comparada a um
10 estado não adoecido. Isto inclui condições provocadas por superprodução ou desregulação de IL-1 β , THF α , IL-6 e IL-8, porém sem se limitar as mesmas, que resulta em níveis suspendidos, prolongados, aumentados ou elevados de atividade de p38. Tais condições incluem, sem limitação,
15 doenças inflamatórias, doenças auto-imunes, doenças fibróticas, doenças destrutivas dos ossos, doenças proliferativas, doenças infecciosas, doenças neuro-degenerativas, alergias, re-perfusão/isquemia em derrame, ataques cardíacos, desordens angiogênicas, hipóxia dos
20 órgãos, hiperplasia vascular, hipertrofia cardíaca, agregação de plaquetas induzida por trombina, e condições associadas com a prostaglandina ou trajetórias de ciclooxigenase, por exemplo, condições que envolvem síntese de endoperóxido de prostaglandina. Uma condição associada a
25 citocina pode incluir qualquer condição associada a ou mediada por IL-1 (especificamente IL-1 β), THF α , IL-6 e IL-8, ou qualquer outra citocina que possa ser regulada por p38. Em modalidades preferidas, a condição associada a citocina é uma condição associada a THF α .

30 Os métodos descritos aqui podem também ser utilizados

para tratar doenças auto-imunes e doenças associadas a inflamação aguda e crônica. Estas doenças incluem: doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD); síndrome oblitéra bronquiolítica; fibrose alograft crônica; fibrose pulmonar
5 inflamatória (IPF); artrite reumatóide; osteoartrite; gota, outras condições de artrite; sépsi; choque séptico; choque endotóxico; sépsi gram-negativa; síndrome do choque tóxico; síndrome da dor miofacial (MPS); Shigelosi; asma; síndrome de doença respiratória adulta; doença intestinal
10 inflamatória; doença de Crohn; psoríase; eczema; colite ulcerativa; nefrite glomerular; esclerodermia; tireoiditismo crônico; doença de Grave; doença de Ormond; gastrite auto-imune; misatemia grave; anemia hemolítica auto-imune; neutropenia auto-imune; trombocitopenia;
15 fibrose pancreática; hepatite ativa crônica que inclui fibrose hepática; doença renal aguda e crônica; fibrose renal, síndrome intestinal irritável; pirese; restenose; malária cerebral; derrame e dano isquêmico; trauma neural; mal de Alzheimer; doença de Huntington; mal de Parkinson;
20 dor aguda e crônica; alergias, incluindo rinite alérgica e conjuntivite alérgica; hipertrofia cardíaca; falência do coração crônica; síndrome coronária aguda; caquexia; malária; lepra; leishmaniose, doença de Lyme; síndrome de Reiter; sinusite aguda; degeneração muscular, bursite;
25 tendinite; tenosinusite; síndrome de disco vertebral com hérnia, rompido, ou com prolapso; osteopetrose; trombose; silicose; sarcosi pulmonar; doenças de reabsorção de osso; tais como osteoporose ou desordens ósseas relacionadas a mieloma múltiplo; câncer, incluindo carcinoma de seios
30 metástico, carcinoma colo-retal, melanoma maligno, câncer

gástrico, e câncer pulmonar de células não pequenas, porém sem se limitar aos mesmos; reação de hospedeiro versus enxerto; e doenças auto-imunes, tais como Esclerose Múltipla, lupus e fibromialgia; AIDS e outras doenças virais tais como Herpes Zoster, Herpes Simples I ou II, vírus de gripe, Síndrome Respiratória Aguda Severa (SARS) e citomegalovírus; e diabetes mellitus; porém sem se limitar aos mesmos. Além disso, os métodos das modalidades podem ser utilizados para tratar desordens proliferativas (incluindo ambas as hiperplasias benigna e maligna), incluindo leucemia mielóide aguda, leucemia mielóide crônica, sarcoma de Kaposi, melanoma metastático, mieloma múltiplo, câncer de seios, incluindo carcinoma metastático de seios; carcinoma colo-retal; melanoma maligno; câncer gástrico; câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC); metástase óssea, e similares; desordens da dor incluindo dor neuromuscular, dor-de-cabeça, dor de câncer, dor dental, e dor de artrite; desordens angiogênicas incluindo angiogênese de tumor sólido, neovascularização ocular, e hemangioma infantil; condições associadas a trajetórias de sinalização de ciclooxygenase e lipoxigenase, incluindo condições associadas a síntase-2 de endoperóxido de prostaglandina (incluindo edema, febre, analgesia, e dor), hipóxia de órgãos; agregação de plaquetas induzida por trombina. Além disso, os métodos descritos aqui podem ser úteis para o tratamento de doenças protozoárias em animais, incluindo mamíferos.

Um objeto pode incluir uma ou mais células ou tecidos, ou organismos. Um objeto preferido é um mamífero. Um mamífero pode incluir qualquer mamífero. Como um exemplo

não limitante, mamíferos preferidos incluem gado, porcos, ovelhas, bodes, cavalos camelos, búfalos, gatos, cães, ratos, camundongos, e humanos. Um mamífero objeto altamente preferido é um humano. O(s) composto(s) pode(m) ser
5 administrado(s) ao objeto através de qualquer rota de administração de droga conhecida na técnica. Rotas de administração exemplificativas específicas incluem oral, ocular, retal, bucal, tópica, nasal, oftálmica, subcutânea, intramuscular, intravenosa (bolo e infusão), intracerebral,
10 transdérmica e pulmonar.

Os termos "quantidade terapeuticamente eficaz" e "quantidade profilaticamente eficaz", como utilizados aqui, referem-se a uma quantidade de um composto suficiente para trata, amenizar, ou impedir a doença ou condição
15 identificada, ou para exibir um efeito terapêutico, profilático, ou inibidor detectável. O efeito pode ser detectado por, por exemplo, os ensaios descritos nos exemplos que se seguem. A quantidade eficaz precisa para um objeto dependerá do peso, tamanho, e saúde do corpo do
20 objeto; a natureza e extensão de da condição; e a terapêutica ou combinação de terapêuticas selecionada para administração. Quantidades terapêutica e profilaticamente eficazes para uma determinada situação podem ser determinadas através de experimentação de rotina que está
25 dentro da habilidade e julgamento do médico. De preferência, a quantidade eficaz do composto das modalidades produz sangue ou soro ou outra concentração de fluido corporal que é inferior a EC_{30} , EC_{20} ou EC_{10} para inibição de cinase de MAP de p38.

30 Para qualquer composto, a quantidade terapêutica e

profilaticamente eficaz pode ser inicialmente estimada tanto em ensaios de cultura de célula, por exemplo, de células neoplásticas, ou em modelos animais, normalmente ratos, camundongos, coelhos, cachorros, ou porcos. O modelo animal pode ser também utilizado para determinar a faixa e rota de concentração adequada para administração. Tal informação pode em seguida ser utilizada para determinar doses e rotas úteis para administração em humanos.

Eficácia e toxicidade terapêuticas/profiláticas podem ser determinadas por procedimentos farmacêuticos padrão em culturas de células ou animais experimentais, por exemplo, ED_{50} (a dose terapeuticamente eficaz em 50% da população) e LD_{50} (a dose letal para 50% da população). A razão de dose entre efeitos terapêuticos e tóxicos é o índice terapêutico, e pode ser expresso como a razão, ED_{50}/LD_{50} . Composições farmacêuticas que exibem índices terapêuticos grandes são preferidas. Contudo, as composições farmacêuticas que exibem índices terapêuticos estreitos também estão dentro do âmbito das modalidades. Os dados obtidos a partir dos ensaios de cultura de célula e estudos animais podem ser usados na formulação de uma faixa de dosagem para uso humano. A dosagem contida em tais composições está de preferência dentro da faixa de concentrações de circulação que incluem uma ED_{50} com pouca ou nenhuma toxicidade. A dosagem pode variar dentro desta faixa dependendo da forma de dosagem empregada, sensibilidade do paciente, e a rota de administração.

Mais especificamente, as concentrações de plasma máximas (C_{max}) podem variar entre aproximadamente 65 μM e aproximadamente 115 μM , ou aproximadamente 75 μM e

aproximadamente 105 µM, ou aproximadamente 85 µM e
aproximadamente 95 µM, ou aproximadamente 85 µM e
aproximadamente 90 µM dependendo da rota de administração.
Guidance como para dosagens e métodos específicos de
5 administração é propiciada na literatura e está normalmente
disponível pra praticantes da técnica. Em geral a dose
estará na faixa entre aproximadamente 100 mg/dia e
aproximadamente 10 g/dia, ou aproximadamente 200 mg/dia e
aproximadamente 5 g/dia, ou aproximadamente 400 mg/dia e
10 aproximadamente 3 g/dia, ou aproximadamente 500 mg/dia e
aproximadamente 2 g/dia, em doses únicas, divididas, ou
contínuas para um paciente pesando entre aproximadamente 40
e 100 kg (cuja dose pode ser ajustada para pacientes acima
e abaixo desta faixa de peso, especificamente crianças
15 abaixo de 40 kg). Normalmente a dose ficará na faixa entre
aproximadamente 25 mg/kg e aproximadamente 300 mg/kg de
peso corporal por dia.

A dose exata será determinada pelo profissional, a
luz de fatores relacionados ao objeto que exige tratamento.
20 Dosagem e administração são ajustadas para propiciar níveis
suficientes do(s) agente(s) ou para manter o efeito
desejado. Fatores que podem ser levados em consideração
incluem a severidade do estado da doença, saúde geral do
objeto, idade, peso, e gênero do objeto, dieta, tempo e
25 frequência de administração, combinação(ões) de drogas,
sensibilidades de reação, e tolerância/resposta à terapia.
Composições farmacêuticas de longa atuação podem ser
administradas duas vezes ao dia, uma vez ao dia, uma vez a
cada dois dias, três vezes por semana, duas vezes por
30 semana, a cada 3 ou 4 dias, ou toda semana dependendo de

taxa de meia-vida e clareza da formulação específica. Por exemplo, em uma modalidade, uma composição farmacêutica contém uma quantidade de um composto como descrito aqui que é selecionado para administração a um paciente em uma
5 programação selecionada dentre: duas vezes ao dia, uma vez ao dia, uma vez a cada dois dias, três vezes por semana, duas vezes por semana, e uma vez por semana.

Verificar-se-á que o tratamento conforme descrito aqui inclui impedir uma doença, amenizar sintomas,
10 desacelerar a progressão da doença, reverter dano, ou curar uma doença.

Em um aspecto, tratar uma condição inflamatória resulta em um aumento no tempo de sobrevivência médio de uma população de objetos tratados em comparação a uma
15 população de objetos não tratados. De preferência, o tempo de sobrevivência médio é aumentado mais do que aproximadamente 30 dias; mais preferivelmente mais do que aproximadamente 60 dias; mais preferivelmente, em mais de aproximadamente 90 dias; e ainda mais preferivelmente em
20 mais do que aproximadamente 120 dias. Um aumento em tempo de sobrevivência de uma população pode ser medido por qualquer meio reproduzível. Em um aspecto preferido, um aumento em tempo de sobrevivência médio de uma população pode ser medido, por exemplo, ao calcular para uma
25 população o comprimento médio de sobrevivência que segue o início de tratamento com o composto ativo. Em um outro aspecto preferido, um aumento em tempo de sobrevivência médio de uma população pode também ser medido, por exemplo, ao calcular para uma população o comprimento médio de
30 sobrevivência que segue a finalização de uma primeira

rodada de tratamento com um composto ativo.

Em outro aspecto, tratar uma condição inflamatória resulta em uma diminuição na taxa de mortalidade de uma população de objetos tratados em comparação a uma população não tratada. Em um aspecto adicional, tratar uma condição inflamatória resulta em uma diminuição na taxa de mortalidade de uma população de objetos tratados em comparação a uma população que recebe monoterapia com uma droga que não é um composto das modalidades, ou um sal, 10 metabolito, análogo ou derivado dose mesmos farmacologicamente aceitável. De preferência, a taxa de mortalidade é diminuída em mais de 2%, mais preferivelmente, em mais de aproximadamente 5%; mais preferivelmente, em mais do que aproximadamente 10%; e o 15 mais preferível, em mais do que 25%. Em um aspecto preferido, uma diminuição na taxa de mortalidade de uma população de objetos tratados pode ser medida por qualquer meio reproduzível. Em outro aspecto preferido, uma diminuição na taxa de mortalidade de uma população pode ser 20 medida, por exemplo, ao calcular para uma população o número médio de mortes relacionadas à doença por tempo unitário que segue o início de tratamento com um composto ativo. Em outro aspecto preferido, uma diminuição na taxa de mortalidade de uma população pode também ser medida, por 25 exemplo, ao calcular para uma população o número médio de mortes relacionadas a doença por tempo unitário que segue a finalização de uma primeira rodada de tratamento com um composto ativo.

Em outro aspecto, tratar uma condição inflamatória 30 resulta em uma diminuição em taxa de crescimento de um

tumor. De preferência, após tratamento, a taxa de crescimento de tumor é reduzida em pelo menos aproximadamente 5% relativos a número anterior ao tratamento; mais preferivelmente, a taxa de crescimento de tumor é reduzida em pelo menos 10%; mais preferivelmente, a taxa de crescimento de tumor é reduzida em pelo menos 20%; mais preferivelmente, a taxa de crescimento de tumor é reduzida em pelo menos 30%; mais preferivelmente, a taxa de crescimento de tumor é reduzida em pelo menos 40%; mais preferivelmente, a taxa de crescimento de tumor é reduzida em pelo menos 50%; mais preferivelmente, a taxa de crescimento de tumor é reduzida em pelo menos 60%; o mais preferível, a taxa de crescimento de tumor é reduzida em pelo menos 75%. A taxa de crescimento de tumor pode ser medida por qualquer meio reproduzível de medição. Em um aspecto preferido, a taxa de crescimento de tumor é medida de acordo com uma mudança em diâmetro de tumor por tempo unitário.

Em outro aspecto, tratar uma condição inflamatória resulta em uma redução na taxa de proliferação celular. De preferência, após tratamento, a taxa de proliferação celular é reduzida em pelo menos aproximadamente 5%; mais preferivelmente, em pelo menos 10%; mais preferivelmente, em pelo menos 20%; mais preferivelmente, em pelo menos 30%; mais preferivelmente, em pelo menos 40%; mais preferivelmente, em pelo menos 50%; ainda mais preferivelmente, em pelo menos 60%; o mais preferível, em pelo menos 75%. A taxa de proliferação celular pode ser medida por qualquer meio reproduzível de medição. Em um aspecto preferido, a taxa de proliferação celular é medida,

por exemplo, ao medir o número de células de divisão em uma amostra de tecido por tempo unitário.

Em outro aspecto, tratar uma condição inflamatória resulta em uma redução na proporção de células de proliferação. De preferência, após tratamento, a proporção de células de proliferação é reduzida em pelo menos aproximadamente 5%; mais preferivelmente, em pelo menos 10%; mais preferivelmente, em pelo menos 20%; mais preferivelmente, em pelo menos 30%; mais preferivelmente, em pelo menos 40%; mais preferivelmente, em pelo menos 50%; ainda mais preferivelmente, em pelo menos 60%; o mais preferível, em pelo menos 75%. A proporção de células de proliferação pode ser medida por qualquer meio reproduzível de medição. Em um aspecto preferido, a proporção de células de proliferação é medida, por exemplo, ao quantificar o número de células de divisão relativas ao número de células de não divisão em uma amostra de tecido. Em outro aspecto preferido, a proporção de células de proliferação é equivalente ao índice mitótico.

Em outro aspecto, tratar uma condição inflamatória resulta em uma diminuição em tamanho de uma área ou zona de proliferação celular. De preferência, após tratamento, o tamanho de uma área ou zona de proliferação celular é reduzido em pelo menos aproximadamente 5% relativos a seu tamanho antes de tratamento; mais preferivelmente, em pelo menos 10%; mais preferivelmente, em pelo menos 20%; mais preferivelmente, em pelo menos 30%; mais preferivelmente, em pelo menos 40%; mais preferivelmente, em pelo menos 50%; ainda mais preferivelmente, em pelo menos 60%; o mais preferível, em pelo menos 75%. O tamanho de uma área ou

zona de proliferação celular pode ser medido por qualquer meio reproduzível de medição. Em um aspecto preferido, o tamanho de uma área ou zona de proliferação celular pode ser medido como um diâmetro ou largura de uma área ou zona de proliferação celular.

Os métodos aqui podem incluir identificar um objeto precisando de tratamento. Em uma modalidade preferida, os métodos incluem identificar um mamífero que precise de tratamento. Em uma modalidade altamente preferida, os métodos incluem identificar um humano que precise de tratamento. Identificar um objeto que precise de tratamento pode ser conseguido através de qualquer meio que indique um objeto que possa beneficiar-se do tratamento. Por exemplo, identificar um objeto que precise de tratamento pode ocorrer através de diagnóstico clínico, teste laboratorial, ou qualquer outro meio conhecido daquele versado na técnica, incluindo qualquer combinação de meios para identificação.

Conforme descrito em outro lugar aqui, os compostos descritos aqui podem ser formulados em composições farmacêuticas, se desejado, e podem ser administrados por qualquer rota que permite tratamento da doença ou condição. Uma rota preferida de administração é a administração oral. A administração pode assumir a forma de administração de dose única, ou o composto das modalidades pode ser administrado durante um período de tempo, tanto em doses divididas quanto em método de formulação e administração de liberação contínua (por exemplo, uma bomba). Contudo, os compostos das modalidades são administrados ao objeto, as quantidades de composto administradas e a rota de

administração escolhidas deveriam ser selecionadas para permitir tratamento eficaz da condição de doença.

Os métodos das modalidades incluem também a utilização de um composto ou compostos conforme descrito aqui junto de um ou mais agentes terapêuticos adicionais para o tratamento de condições de doença. Sendo assim, por exemplo, a combinação de ingredientes ativos pode ser: (1) co-formulada e administrada simultaneamente em uma formulação combinada; (2) administrada por alteração ou em paralelo como formulações separadas; ou (3) através de qualquer outro regime de terapia de combinação conhecido na técnica. Quando administrados em terapia de alternância, os métodos descritos aqui podem compreender administrar os ingredientes ativos seqüencialmente, por exemplo, em solução separada, emulsão, suspensão, tabletes, pílulas ou cápsulas, ou através de injeções diferentes em seringas separadas. Em geral, durante terapia de alternância, uma dosagem eficaz de cada ingrediente ativo é administrada seqüencialmente, isto é, em série, quer em terapia simultânea, dosagens eficazes de dois ou mais ingredientes ativos são administradas juntas. Diversas seqüências de terapia de combinação intermitente podem também ser utilizadas.

Testes diagnósticos são contemplados como parte dos métodos descritos aqui. Por exemplo, uma amostra de biópsia de tecido pode ser extraída de um objeto que sofre de uma condição inflamatória, por exemplo, uma condição associada por p38 ou associada por citocina. A amostra de biópsia pode ser testada para determinar o nível de atividade de p38 (ou níveis de citocina) presente na amostra; a amostra

pode em seguida ser contatada com um composto selecionado das modalidades, e a atividade de p38 (ou níveis de citoquina) medidos para determinar se o composto possui um efeito desejado (por exemplo, inibição de atividade de p38 ou citoquina com uma EC_{50} na faixa entre aproximadamente 100 μM e aproximadamente 1000 μM , de preferência aproximadamente 50 μM e aproximadamente 650 μM). Tal teste pode ser utilizado para determinar se o tratamento que tal composto é similar para ser eficaz naquele objeto. De forma alternativa, a amostra pode ser contatada com um composto classificado (por exemplo, um composto fluorescentemente classificado, ou um composto radiotivamente classificado) e a amostra em seguida examinada e o sinal fluorescente ou radioativo detectado para determinar a distribuição de p38 na amostra de tecido. Amostras de biópsia repetidas extraídas durante um curso de tratamento podem também ser utilizadas para estudar a eficácia do tratamento. Outros testes de diagnóstico que utilizam os compostos descritos aqui tornar-se-ão evidentes para aquele versado na técnica à luz dos ensinamentos desta especificação.

Sendo assim, por exemplo, uma modalidade propicia métodos para determinar a presença, localização, ou quantidade, ou qualquer combinação das mesmas de proteína de p38 em uma célula ou amostra de tecido. Os métodos incluem: a) contatar a célula ou amostra de tecido com um composto das modalidades sob condições tais que o composto possa unir-se a pelo menos um MAPK de p38; e b) determinar a presença, localização, ou quantidade, ou qualquer combinação das mesmas do composto na célula ou amostra de tecido, determinando desse modo a presença, localização, ou

quantidade, ou qualquer combinação das mesmas de pelo menos um MAPK de p38 na célula ou amostra de tecido. Determinar a presença, localização, ou quantidade, ou qualquer combinação das mesmas do composto na célula ou amostra de tecido pode ser conduzido por qualquer meio que revele a presença, localização, ou quantidade, ou qualquer combinação das mesmas do composto na célula ou tecido. Por exemplo, conforme descrito anteriormente, métodos de classificação radioativa ou fluorescente pode ser utilizado. Métodos adicionais do composto tornar-se-ão evidentes para um praticante versado.

Outra modalidade propicia métodos para determinar: (1) se um composto será um agente terapêutico útil para tratamento de objeto que sofre de uma condição inflamatória, ou (2) a severidade da doença ou (3) o curso da doença durante o tratamento com o agente modificador de doença. Os métodos incluem: a) obter uma amostra de célula ou tecido proveniente do objeto antes, durante e após finalização do tratamento com um composto como descrito aqui ou em outro agente modificador de doença; b) contatar a amostra com o composto; e c) determinar a quantidade do composto que une o une à amostra, em que a união para MAPK de p38 pelo composto é relacionada à quantidade de MAPK de p38 na amostra.

Exemplos específicos de doenças contempladas para serem tratadas pelos compostos e métodos descritos aqui

COPD

A doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD) é caracterizada por um processo inflamatório crônico no pulmão que inclui (1) número aumentado de células

inflamatórias (neutrófilas, macrófagos e célula T SD8⁺) nas passagens de ar e parênquima, (2) expressão de citocina e quemoquina inflamatórias aumentadas, e (3) número aumentado de proteases (elastases, catepsinas, e metaproteínases
5 matriz, MMPs). Acredita-se que a produção e ação de muitos mediadores potenciais de inflamação por via aérea sejam dependentes da cascata de cinase de MAPK induzido por estresse ou de p38. Diversos relatos sustentam a associação de ativação de cinase de p38 com a pletora de eventos
10 pulmonares: Expressão de molécula-1 de adesão intercelular induzida por TNF α - e LPS- em células endoteliais microvasculares pulmonares, ativação MMP-9, estimulação induzida por hipóxia de células arteriais pulmonares, expressão de IL-8 induzida por hiperosmolaridade em células epiteliais
15 bronqueais, e tráfego e sobrevivência de eosinofila aumentada.

Trifilieff e outros (2005 *Brit J Pharmacol* 144: 1002-10) relataram que CGH2466, um antagonista receptor de adenosina combinado, MAPK de p38 e inibidor do tipo 4 de
20 fosfodisterase mostraram potentes atividades antiinflamatórias *in vitro* e *in vivo* em doenças tais como asma e COPD. Underwood e outros (200 *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279:L895-L902) demonstraram que o inibidor de MAPK de p38 potente e seletivo, SB239063, a produção de
25 citocina pró-inflamatória reduzida, que inclui IL-1 β , TNF- α , IL-6, e IL-8, que foram ligados a fibrose de via aérea por causa de sua capacidade em regular a proliferação de fibroblastos e a produção de matriz; que conduz a tráfego e ativação de neutrofilia diminuída no pulmão. Anteriormente,
30 o mesmo composto foi visto como capaz de alterar respostas

associadas a fibrose crônica induzida por bleomicina. Esta atividade inibitória foi seletiva para as isoformas α e β do p38. Os compostos e métodos descritos aqui são úteis no tratamento de COPD.

5 **Fibrose pulmonar**

Fibrose pulmonar também chamada de fibrose pulmonar idiopáticas (IPF), fibrose pulmonar difusa intersticial, fibrose pulmonar inflamatória, ou alveolito de fibrose, é uma desordem de pulmão e um grupo heterogêneo de condições

10 caracterizadas por formação anormal de tecido fibroso entre alvéolos provocada pela alveolito que compreende uma infiltração celular inflamatória no septo alveolar com fibrose resultante. Os efeitos de IPF são crônicos, progressivos, e freqüentemente fatais. A ativação de MAPK

15 de p38 tem sido demonstrada no pulmão de pacientes com fibrose pulmonar. Diversas investigações acerca de fibrose pulmonar indicaram que a expressão sustentada e aumentada de algumas citocinas no pulmão é relevante para o recrutamento de células inflamatórias e acumulação de

20 componentes de matriz extracelulares seguidos por remodelação da arquitetura do pulmão. Especificamente, citocinas pró-inflamatórias tais como TNF- α e interleucina IL-1 β foram demonstradas para desempenhar papéis principais na formação de pneumonita e fibrose pulmonar. Além disso,

25 citocinas pró-fibróticas tais como TGF- β e CTGF também desempenham papéis críticos na patogênese de fibrose pulmonar. Matsuoka e outros (2002 *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283:L103-L112) demonstraram que um inibidor de p38, Fr-167653, ameniza fibrose pulmonar induzida por

30 beomycin murine. Além disso, pirfenidona (5-metil-1-fenil-

2-(1H)-piridona), um composto com antiinflamatório combinado, efeitos anti-oxidante e anti-fibrótico foram considerados eficazes em modelos experimentais de fibrose pulmonar bem como em estudos clínicos (Raghu e outros 1999 *Am J Respi Crit Care Méd* 159:1061-1069; Nagai e outros 2002 *Intern Méd* 41:1118-1123; Gahl e outros 2002 *Mol Genet Metab* 76:234-242; Azuma e outros 2002 *Am J Respir Crit Care Méd* 165:A729). Os compostos e métodos descritos aqui são úteis no tratamento de fibrose pulmonar, tal como IPF.

10 **Obliterans bronquiolite e síndrome de oblitéra bronquiolítica**

Oblitéra bronquiolítica, e sua síndrome de oblitéra bronquiolítica de condição clínica correlata, são caracterizados por obstrução da via aérea pulmonar através de obliteração de passagens de ar pulmonares pequenas. Em oblitéra bronquiolítica, a exameção patológica caracteristicamente encontra lesões que obstruem ou obliteram passagens de ar pequenas no pulmão. Estas lesões são tecido ficromixóide granular e tecido de escara submucosal. As lesões progridem de inflamação prolongada, anormal, ou aberrante de epitelial e estruturas localizadas no epitelial das passagens de ra pequenas, mediadas por citocinas pró-inflamatórias tais como TNF- α e resultam em fibroproliferação excessiva. A obliteração de passagens de ar pequenas pulmonares progressivamente conduz a obstrução de fluxo e ar, caracterizada por declínio progressivo em volume expiratório forçado em um segundo (FEV₁), e é freqüentemente acompanhada por infecções recorrentes do trato respiratório inferior e colonização de tecido pulmonar por microorganismos patogênicos.

A síndrome oblitéra bronquiolítica afeta 50-60% de pacientes que sobrevivem cinco anos após a cirurgia de transplante de pulmão, e cinco anos de sobrevivência após surgimento de síndrome oblitéra bronquiolítica é de apenas 30-40%. Pacientes de transplantes de pulmão que experimentam síndrome oblitéra bronquiolítica freqüentemente respondem de maneira fraca a imunossupressão aumentada. Em pacientes com fibrose idiopática, a sobrevivência após síndrome oblitéra bronquiolítica é menor do que em pacientes com enfisema. Os compostos e métodos descritos aqui são úteis no tratamento de síndrome oblitéra bronquiolítica.

Fibrose de Allograft crônica

A falha e allograft é uma preocupação profunda em manutenção de transplante. Uma das principais causas de falha de allograft é a disfunção de allograft crônica. Marcas de disfunção de allograft crônica são a inflamação crônica e a fibrose crônica, ambas das quais são associadas com a produção de citocinas inflamatórias e fatores de crescimento. A mediação de citocina inflamatória e fatores de crescimento, especificamente que resultam na interrupção de produção de colágeno e TGF, é útil no tratamento de fibrose de allograft crônica. O termo "fibrose de allograft crônica" como utilizado aqui se destina a abranger ambas a inflamação crônica e a fibrose crônica associadas a fibrose de allograft crônica. Os compostos e métodos descritos aqui são úteis no tratamento de fibrose de allograft crônica.

Fibrose renal

Irrespective da natureza da descarga inicial, a fibrose renal é considerada como sendo a trajetória final

comum pela qual a doença de rins progride para a falência renal de estágio final. Stambe e outros (2004 *J Am Soc Nephrol* 15:370-379) testou um inibidor da forma ativa (fosforilada) de p38, NPC 31169, desenvolvida por Scios Inc. (São Francisco, CA) em um modelo de rato de fibrose renal, e relatou uma redução significativa na fibrose renal atingida por volume intersticial, deposição de colágeno IV, e níveis de mRNA de crescimento de tecido conectivo. Os compostos e métodos descritos aqui são úteis no tratamento de fibrose renal.

Leiomioma

Leiomiomas ou fibróides uterinas são o tumor pélvico mais comum em mulheres com nenhuma terapia de drogas eficaz em longo prazo conhecida. Leiomiomas são caracterizadas por proliferação de células e fibrose de tecido aumentadas. Pirfenidona foi testada em proliferação de células e expressão de colágeno em células musculares suaves miometriais ou de leiomioma, e verificou-se serem um inibidor eficaz de proliferação de célula miometrial e de leiomioma (Lee e outros 1998 *J Clin Endocrinol Metab* 83:219-223). Os compostos e métodos descritos aqui são úteis no tratamento de leiomiomas.

Fibrose endomiocardial

A fibrose endomiocardial (EMF) é uma desordem caracterizada pelo desenvolvimento de cardiomiopatia restritiva. EMF é por vezes considerado parte de um espectro de um processo de doença único que inclui endocarditias de Löffler (fibrose endomiocardial eosinofílica não tropical ou endocarditias parietal fibroblástica com eosinofilia). Em EMF, o processo

subjacente produz fibrose patchy da superfície endocardial do coração, conduzindo a concordância reduzida e, essencialmente, fisiologia restritiva à medida que a superfície endomiocardial torna-se genericamente envolvida.

5 A fibrose endocardial principalmente envolve s tratos de influxo dos ventrículos direito e esquerdo e podem afetar as válvulas atrioventriculares, conduzindo a regurgitação tricúspide e mitral. A ativação de MAPK foi mostrada para contribuir com a remodelação estrutural atrial
10 arritmogênica em EMF. Os compostos e métodos descritos aqui são úteis no tratamento e/ou prevenção de fibrose endomiocardial.

Outras doenças inflamatórias

Muitas doenças auto-imunes e doenças associadas a
15 inflamação crônica, bem como repostas agudas, foram ligadas à ativação de cinase de MAP de p38 e superexpressão e desregulação de citocinas inflamatórias. Estas doenças incluem: artrite reumatóide; espondilite reumatóide; osteoartrite; gota; outras condições de artrite; sépsi;
20 choque séptico; choque endotóxico; sépsi de gram negativo; síndrome de choque tóxico; asma; síndrome de doença respiratória adulta; doença pulmonar obstrutiva crônica; inflamação pulmonar crônica; doença intestinal inflamatória; doença de Crohn; psoríase; eczema; colite
25 ulcerativa; fibrose pancreática; fibrose hepática; doença renal aguda e crônica; síndrome intestinal irritável; pirese; restenose; malária cerebral; derrame e dano isquêmico; trauma neural; mal de Alzheimer; doença de Huntington; mal de Parkinson; dor aguda e crônica; rinite
30 alérgica; conjuntivite alérgica; falência do coração

crônica; síndrome coronária aguda; caquexia; malária; lepra; leishmaniose, doença de Lyme; síndrome de Reiter; sinusite aguda; degeneração muscular, bursite; tendinite; tenosinusite; síndrome de disco vertebral com hérnia, rompido, ou com prolapso; osteopetrose; trombose; câncer; restenose; silicose; sarcosi pulmonar; doenças de reabsorção de osso; tais como osteoporose; reação de hospedeiro versus enxerto; e doenças auto-imunes, tais como Esclerose Múltipla, lupus e fibromialgia; AIDS e outras doenças virais tais como Herpes Zoster, Herpes Simples I ou II, vírus de gripe, Síndrome Respiratória Aguda Severa (SARS) e citomegalovírus; e diabetes mellitus.

Muitos estudos mostraram que reduzir a atividade de cinase de MAP de p38, seus ativadores a montante ou seus efeitos a jusante, tanto através de meio genético quanto químico, blunts a resposta inflamatória e impede ou minimiza dano de tecido (vide, por exemplo, Inglês, e outros 2002 *Trends Pharmacol Sci* 23:40-45; e Dong e outros 2002 *Annu Ver Immunol* 20:55-72). Sendo assim, inibidores de atividade de p38, que também inibe produção de citocina em excesso ou não regulada e pode inibir mais do que uma citocina pró-inflamatória, podem ser úteis como agentes antiinflamatórios e terapêuticos. Além disso, um grande número de doenças associadas com respostas inflamatórias associadas a cinase de MAP de p38 indica que existe uma necessidade por métodos eficazes para tratar estas condições.

Doença cardiovascular. A inflamação e ativação/infiltração de leucócitos desempenham um papel principal na iniciação e progressão de doenças

cardiovasculares que incluem aterosclerose e falência do coração. A inibição de trajetória de proteína cinase ativada por mitogênio de p38 aguda (MAPK) atenua dano de tecido e acumulação de leucócito em isquemia
5 miocardial/dano de re-perfusão. Os compostos e métodos descritos aqui são úteis para tratar doença cardiovascular.

Esclerose múltipla. A inflamação no sistema nervoso central ocorre em doenças tais como esclerose múltipla e conduz a disfunção e destruição de axon. Ambas as
10 observações *in vitro* e *in vivo* mostraram um papel importante para óxido nítrico (NO) em axonopatia inflamatória mediana. A cinase de MAP de p38 é ativada por exposição de NO e inibição de sinalização de p38 foi mostrada para conduzir a efeitos de sobrevivência neurais e
15 axonais. OCM e IGF-1 reduziram a ativação de p38 em neurônios corticais expostos a NO e aperfeiçoaram a sobrevivência de axo em cultura expostas a NO, um processo dependente de proteína cinase ativada por mitogênio/sinalização de cinase relacionada a sinal extracelular. Os
20 compostos e métodos descritos aqui são úteis para tratar esclerose múltipla.

Não função de graft primária. Inflamação não específica é associada a não função de graft primária (PNF). O dano de islet inflamatório é mediado pelo menos
25 parcialmente por citocinas pró-inflamatórias, tais como interleucina-1 β (IL-1 β) e fator- α de necrose de tumor (TNF- α) produzidos por macrófagos de islet residente. A trajetória de p38 é conhecida por ser envolvida em produção de citocina nas células da linhagem de monócito-macrófago.
30 A inibição da trajetória de p38 por um inibidor químico,

SB203580, suprime a produção de IL-1 β e TNF- α em islets humanos expostos a lipopolissacarídeos (LPS) e/ou citocquinas inflamatórias. Embora IL-1 β seja predominantemente produzido por macrófagos residentes, verificou-se que células ductais e células endoteliais vasculares de islet são outra fonte celular de IL-1 β em islets humanos isolados. SB203580 também inibe a expressão de sintase de óxido nítrico induzível (iNOS) e ciclooxigenase-2 (COX-2) nos islets tratados. Além disso, islet humanos tratados com SB203580 por 1 hora antes do transplante mostraram função de graft significativamente aperfeiçoada. Os compostos e métodos descritos aqui são úteis em propiciar sobrevivência de graft em transplante de islet clínico.

Dano renal agudo. Cisplatina é um importante agente quimioterápico, porém pode provocar dano renal agudo. Parte de seu dano renal agudo é mediado através de fator- α de necrose de tumor (TNF- α). Cisplatina ativa MAPK de p38 e induz apoptose em células cancerígenas. A ativação de MAPK de p38 conduz a produção aumentada de TNF- α em dano isquêmico e em macrófagos. *In vitro*, a cisplatina provocou uma ativação dependente de droga de MAPK de p38 em células tubulares próximas. A inibição de ativação de MAPK de p38 conduziu a inibição de produção de TNF- α . *In vivo*, camundongos tratados com uma dose única de cisplatina desenvolveram disfunção renal severa, que foi acompanhada por um aumento na atividade de MAPK de p38 no rim e um aumento em leucócitos de infiltração. Contudo, animais tratados com um inibidor de MAPK de p38 SKF86002 junto de cisplatina mostraram menos disfunção renal, menos dano

histológico severo e poucos leucócitos comparado com animais tratados com cisplatina+veículo. Os compostos e métodos descritos aqui são úteis para impedir dano renal agudo.

5 Periodontia. O mediador pró-inflamatório bradykinin (BK) estimula a produção de interleucina-8 (IL-8) em fibroblastos gengivais humanos *in vitro* e desempenha um papel importante na patogênese de diversas doenças inflamatórias incluindo a periodontia. O inibidor de
10 proteína cinase ativada por mitogênio de p38 (MAPK)SB203580 reduziu a produção de IL-8 estimulada pela combinação de BK e IL-1 β bem como a produção de IL-8 estimulada por IL-1 β . O composto e métodos descritos aqui são úteis para tratar ou impedir a periodontia.

15 **Composições farmacêuticas**

Embora seja possível para os compostos descritos aqui serem administrados sozinhos, pode ser preferível formular os compostos como composições farmacêuticas. Como tal, em
20 ainda outro aspecto, as composições farmacêuticas úteis nos métodos da invenção são propiciadas. Mais especificamente, as composições farmacêuticas descritas aqui podem ser úteis, entre outras coisas, para tratar ou impedir condições inflamatórias, por exemplo, condições associadas a atividade de p38 ou atividade de citocina ou qualquer
25 combinação das mesmas. Uma composição farmacêutica é qualquer composição que possa ser administrada *in vitro* ou *in vivo* ou ambos a um objeto a fim de tratar ou amenizar uma condição. Em uma modalidade preferida, uma composição farmacêutica pode ser administrada *in vivo*. Um objeto pode
30 incluir uma ou mais células ou tecidos, ou organismos. Um

objeto preferido é um mamífero. Um mamífero inclui qualquer mamífero, tal como a título de exemplo não limitante, gado, porcos, ovelhas, bodes, cavalos, camelos, búfalos, gatos, cães, ratos, camundongos, e humanos. Um mamífero objeto
5 altamente preferido é um humano.

Em uma modalidade, as composições farmacêuticas podem ser formuladas com excipientes farmacêuticamente aceitáveis tais como portadoras, solventes, estabilizadores, adjuvantes, diluentes etc., dependendo do modo específico
10 de administração e forma de dosagem. As composições farmacêuticas normalmente deveriam ser formuladas para alcançar um pH fisiologicamente compatível, e poder variar entre um pH de aproximadamente 3 e um pH de aproximadamente 11, de preferência aproximadamente pH3 e aproximadamente pH
15 7, dependendo da formulação e rota de administração. Em modalidades alternativas, pode ser preferido que o pH seja ajustado para uma faixa entre aproximadamente pH 5,0 e aproximadamente pH 8. Mais especificamente, as composições farmacêuticas podem compreender uma quantidade terapêutica
20 e profilaticamente eficazes de pelo menos um composto como descrito aqui, junto de um ou mais excipientes farmacêuticamente aceitáveis. Opcionalmente, as composições farmacêuticas podem compreender uma combinação dos compostos descritos aqui, ou pode incluir um segundo
25 ingrediente ativo útil no tratamento ou prevenção de infecção bacteriana (por exemplo, agentes antibacterianos ou antimicrobianos).

Formulações, por exemplo, para aminoácidos parenteral ou oral, são mis normalmente sólidas, soluções líquidas ou
30 suspensões, embora formulações inaláveis para administração

pulmonar sejam normalmente líquidos ou pós, com as formulações de pós sendo normalmente preferidas. Uma combinação farmacêutica pode também ser formulada como um sólido liofilizado que é reconstituído com um solvente fisiologicamente compatível antes da administração. Composições farmacêuticas alternativas podem ser formuladas como xaropes, cremes, loções, tabletes, e similares.

O termo "excipiente farmacêuticamente aceitável" refere-se a um excipiente para administração e um agente farmacêutico, tal como os compostos descritos aqui. O termo refere-se a um excipiente farmacêutico que possa ser administrado sem toxicidade indevida.

Excipientes farmacêuticamente aceitáveis são determinados em parte pela composição específica sendo administrada, bem como pelo método específico utilizado para administrar a composição. Conseqüentemente, existe uma ampla variedade de formulações adequadas de composições farmacêuticas (vide, por exemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences (Ciências Farmacêuticas de Remington)).

Excipientes adequados podem ser moléculas portadoras que incluem macromoléculas grandes, metabolizadas lentamente tais como proteína, polissacarídeos, ácidos poliácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, co-polímeros de aminoácido, e partículas de vírus inativas. Outros excipientes exemplificativos incluem antioxidantes tais como ácido ascórbico; agentes de quelação tais como EDTA; carboidratos tais como dextrina, hidroxialquilcelulose; hidroxialquilnetilcelulose; ácido esteárico; líquidos tais como óleos, água, salina, glicerol

e etanol; agentes umedecedores ou emulsificantes; substâncias de tamponamento de pH; e similares. Lipossomas são também incluídos dentro da definição de excipientes farmaceuticamente aceitáveis.

5 As composições farmacêuticas descritas aqui podem ser formuladas em qualquer forma adequada para o método de administração pretendido. Quando destinado para uso oral, por exemplo, podem ser preparados tabletes, troches, lozenges, suspensões aquosas ou oleosas, soluções não
10 aquosas, pós ou grânulos dispersáveis (incluindo partículas micronizadas ou nanopartículas), emulsões, cápsulas duras ou macias, xaropes ou elixires. Composições destinadas para uso oral podem ser preparadas de acordo com qualquer método conhecido da técnica para a fabricação de composições
15 farmacêuticas, e tais composições podem conter um ou mais agentes que incluem agentes adoçantes, agentes de paladar, agentes corantes e agentes preservativos, com a finalidade de propiciar uma preparação palatável.

 Excipientes farmaceuticamente aceitáveis adequados
20 especialmente para uso em conjunto com comprimidos incluem, por exemplo, diluentes inertes, tais como celulosas, carbonato de cálcio ou sódio, lactose, fosfato de cálcio ou sódio; agentes de desintegração, tais como povidona encadeada, amido de milho, ou ácido algínico; agentes de
25 aglutinação, tais como povidona, amido, gelatina ou acácia; e agentes de lubrificação, tais como estearato de magnésio, ácido esteárico ou talco.

 Os comprimidos podem ser não-revestidos ou revestidos por técnicas conhecidas que incluem micro-encapsulamento
30 para retardar desintegração ou adsorção no trato

gastrintestinal e deste modo propiciar uma ação sustentada durante um maior período. Por exemplo, pode ser utilizado um material de retardo de tempo tal como monoestearato de glicerila ou distearato de glicerila isolado ou com uma
5 cera.

Formulações para uso oral podem ser também apresentadas como cápsulas duras de gelatina onde o ingrediente ativo é misturado com um diluente sólido inerte, por exemplo, celulosas, lactose, fosfato de cálcio
10 ou caulim, ou como cápsulas macias de gelatina onde o ingrediente ativo é misturado com meio não-aquoso ou oleoso, tal como glicerina, propileno glicol, polietileno glicol, óleo de amendoim, parafina líquida ou óleo de oliva.

15 Em outra modalidade, composições farmacêuticas podem ser formuladas como suspensões que compreendem um composto das modalidades em mistura com pelo menos um excipiente farmacêuticamente aceitável adequado para a fabricação de uma suspensão.

20 Em ainda outra modalidade, composições farmacêuticas podem ser formuladas como pós dispersáveis e grânulos adequados para a preparação de uma suspensão pela adição de excipientes adequados.

Excipientes adequados para uso em conexão com
25 suspensões incluem agentes de suspensão, tais como carboximetilcelulose de sódio, metilcelulose, hidroxipropil metilcelulose, alginato de sódio, polivinilpirrolidona, goma alcantira, goma acácia, agentes de dispersão ou umedecimento tais como fosfatídeos que ocorrem naturalmente
30 (por exemplo, lecitina), um produto de condensação de um

óxido alcalino com um ácido graxo (por exemplo, estearato de polioxietileno), um produto de condensação de óxido de etileno com um álcool alifático de cadeia longa (por exemplo, heptadecaetilenooxicetanol), um produto de
5 condensação de óxido de etileno com um éster parcial derivado de um ácido graxo e de um anidrido de hexitol (por exemplo, monooleato de polioxietileno sorbitana); polissacarídeos e compostos tipo polissacarídeos (por exemplo, sulfato de dextrano); glicoaminoglicanos e
10 compostos tipo glicoaminoglicanos (por exemplo, ácido hialurônico); e agentes de espessamento, tais como carbomer, cera de abelha, parafina dura ou álcool cetílico. As suspensões podem também conter um ou mais preservativos tais como ácido acético, metil e/ou n-propil p-hidroxibenzoato; um ou mais agentes colorantes; um ou mais agentes
15 de paladar e um ou mais agentes adoçantes tais como sacarose ou sacarina.

As composições farmacêuticas podem também apresentar-se na forma de emulsões de óleo em água. A fase oleosa pode
20 ser um óleo vegetal, tal como óleo de oliva ou óleo de aráquis, um óleo mineral, tal como parafina líquida, ou uma mistura destes. Agentes de emulsificação adequados incluem gomas que ocorrem naturalmente, tais como goma acácia e goma alcantira; fosfatídeos que ocorrem naturalmente, tais
25 como lecitina de soja, ésteres ou ésteres parciais derivados de ácidos graxos; anidridos de hexitol, tal como monooleato de sorbitana; e produtos de condensação destes ésteres parciais com óxido de etileno, tal como monooleato de polioxietileno sorbitana. A emulsão pode também conter
30 agentes adoçantes e de paladar. Xaropes e elixires podem

ser formulados com agentes adoçantes, tais como glicerol, sorbitol ou sacarose. Tais formulações podem também conter um agente calmante, preservativo, de paladar ou corante.

Adicionalmente, as composições farmacêuticas podem
5 apresentar-se na forma de uma preparação injetável estéril, tal como uma emulsão aquosa injetável estéril ou suspensão oleaginosa. Esta emulsão ou suspensão pode ser formulada de acordo com a técnica conhecida que utiliza aqueles agentes de dispersão ou de umedecimento e agentes de suspensão que
10 foram mencionados acima. A preparação injetável estéril pode também ser uma solução ou suspensão injetável estéril em um diluente ou solvente não-tóxico parenteralmente aceitável, tal como uma solução em 1,2-propano-diol.

A preparação injetável estéril pode também ser
15 preparada como um pó liofilizado. Entre os veículos e solventes aceitáveis que podem ser utilizados está água, solução Ringer e solução isotônica de cloreto de sódio. Além disso, podem ser utilizados óleos fixos estéreis como solvente ou meio de suspensão. Para este fim pode ser
20 utilizado qualquer tipo de óleo fixo incluindo mono- ou diglicerídeos sintéticos. Além disso, podem também ser usados na preparação de injetáveis ácidos graxos tais como ácido oléico.

Para obter uma forma de dose estável solúvel em água
25 de uma composição farmacêutica, um sal farmacêuticamente aceitável de um composto descrito aqui pode ser dissolvido em uma solução aquosa de ácido orgânico ou inorgânico, tal como solução 0,3 M de ácido succínico, ou mais preferivelmente, ácido cítrico. Se a forma de sal solúvel
30 não estiver disponível, o composto pode ser dissolvido em

um co-solvente adequado ou combinação de co-solventes. Exemplos de co-solventes adequados incluem álcool, propileno glicol, polietileno glicol 300, polissorbato 80, glicerina e similares em uma concentração que varia entre
5 aproximadamente 0 e aproximadamente 60% do volume total. Em uma modalidade, o composto ativo é dissolvido em DMSO e diluído com água.

A composição farmacêutica pode também apresentar-se na forma de uma solução de uma forma de sal do ingrediente
10 ativo em um veículo aquoso apropriado, tal como água ou solução isotônica salina ou de dextrose. São também contemplados compostos que foram modificados por substituições ou adições de parcelas químicas ou bioquímicas que os tornam mais adequados para administração
15 (por exemplo, aumentam a solubilidade, bioatividade, palatabilidade, diminuem as reações adversas, etc.), por exemplo, por esterificação, glicosilação, PEGilação, etc.

Em uma modalidade preferida, os compostos descritos aqui podem ser formulados para administração oral em uma
20 formulação à base de lipídeos adequada para compostos de baixa solubilidade. As formulações à base de lipídeos podem geralmente intensificar a bio-disponibilidade oral de tais compostos.

Sendo assim, uma composição farmacêuticamente
25 preferida compreende uma quantidade terapêutica ou profilaticamente eficaz de um composto descrito aqui, junto com pelo menos um excipiente farmacêuticamente aceitável selecionado a partir do grupo que consiste em ácidos graxos de cadeia média ou seus ésteres de propileno glicol (por
30 exemplo, ésteres de propileno glicol de ácidos graxos

comestíveis tais como ácidos graxos caprílicos ou cápricos) e agentes tensoativos farmacêuticamente aceitáveis tal como óleo de mamona hidrogenado de polioxil 40.

Em uma modalidade preferida alternativa, 5 ciclodextrinas podem ser adicionadas como intensificadores de solubilidade aquosa. Ciclodextrinas preferidas incluem derivados de hidroxipropila, hidroxietila, glucosila, maltosila e maltotriosila de α -, β - e γ -ciclodextrina. Um intensificador de solubilidade de ciclodextrina 10 especialmente preferido é hidroxipropil-o-ciclodextrina (BPBC), o qual pode ser adicionado a qualquer das composições acima mencionadas para melhorar ainda mais as características de solubilidade aquosa dos compostos das modalidades. Em uma modalidade, as composições compreendem 15 entre aproximadamente 0,1% e aproximadamente 20% de hidroxipropil-o-ciclodextrina, mais preferivelmente entre aproximadamente 1% e aproximadamente 15% de hidroxipropil-o-ciclodextrina e ainda mais preferivelmente entre aproximadamente 2,5% e aproximadamente 10% de 20 hidroxipropil-o-ciclodextrina. A quantidade de intensificador de solubilidade utilizada dependerá da quantidade do composto das modalidades na composição.

Uma composição farmacêutica contém uma quantidade total do(s) ingrediente(s) ativo(s) para obter um efeito 25 terapêutico desejado. Mais especificamente, em algumas modalidades, a composição farmacêutica contém uma quantidade terapeuticamente eficaz (por exemplo, uma quantidade de um composto de modulação SAPK que é eficaz na prevenção ou tratamento dos sintomas de uma doença ou 30 condição inflamatória, onde o composto apresenta um EC_{50} na

faixa entre aproximadamente 1 μ M e aproximadamente 1.000 μ M, de preferência entre aproximadamente 50 μ M e aproximadamente 650 μ M, para inibição de pelo menos um p38 MAPK). As quantidades totais do composto que podem ser combinadas com os materiais carreadores para produzir uma forma de dosagem unitária variarão dependendo do hospedeiro tratado e do modo específico de administração. De preferência, as composições são formuladas de modo que uma dose entre 0,01 e 100 mg/kg de peso corporal/dia de um composto de modulação SAPK seja administrado a um paciente que recebe as composições.

EXEMPLO 1

Compostos são peneirados para a capacidade de inibir fosforilação de ATF2 por cinase de MAP de p38 *in vitro*. A capacidade de compostos inibirem fosforilação de ATF2 neste ensaio *in vitro* está relacionada com a inibição de cinase de MAP de p38 e expressão de TNF α *in vivo* e é, portanto, um indicador da potencial atividade terapêutica *in vivo* (Raingeaud, J. e outros 1995 *J. Biol. Chem.* 270:7420-7426; Brinkman, M.N. e outros 1999 *J. Biol. Chem.* 274:30882-30886 e Fuchs, S.Y. e outros *J. Biol. Chem.* 275:12560-12564, 2000).

Todas as cinases e o substrato ATF2 são adquiridos de Upstate (Charlottesville, VA). As cinases de MAP de p38 são proteínas de extensão total humanas de recombinação com uma fusão GST de amino-terminal, expressa em e purificada a partir de *E. coli*. ATF2 é uma proteína de fusão GST que contém aminoácidos 19-96 de ATF2 humano expresso em *E. coli*. Todas as proteínas são subdivididas e armazenadas a -80°C.

Os ensaios de cinase de MAP de p38 são realizados usando uma solução tampão de teste que contém 25 mM de HEPES, pH 7,5, 10 mM de $MgCl_2$, 2 mM de DTT, 20 mM de β -glicerofosfato, 0,1 mM de Na_3VO_4 , 40 μM de ATP e 1,25 μM de ATF2, junto com 6 ng de proteína p38 α , 12 ng de proteína p38 β , 1,5 ng de p38 γ , ou 0,4 ng de JNK2 α 2. Os compostos são diluídos em série em DMSO e é usado 2 μL de composto de teste a concentrações diversas. O controle de veículo recebe apenas DMSO.

Os compostos de teste são pré-incubados com 20 μl de enzima em solução tampão de cinase (25 mM de HEPES, pH 7,5, 10 mM de $MgCl_2$, 2 mM de DTT, 20 mM de β -glicerofosfato e 0,1 mM de Na_3VO_4) a temperatura ambiente durante 15 minutos. As reações são iniciadas por adição de 30 μl de solução de substrato para produzir uma concentração final de 40 μM de ATP e 1,25 μM de ATF2 em solução tampão de cinase. As reações são incubadas durante 30 minutos a 37°C e concluídas pela adição de 18 μl de 200 mM de EDTA. Um método ELISA é usado para medir a fosforilação de ATF2 em Thr 69. Placas de 96 furos de alta aglutinação são revestidas com 50 μl de reação de cinase durante 1 hora a 37°C. As placas revestidas são lavadas com 200 μl de solução tampão de lavagem (25 mM de Tris HCl, pH 8,3, 192 mM de glicina, 0,1% de SDS e 0,05% de Tween-20) três vezes. As placas são em seguida lavadas três vezes com SuperBlock em TBS (Pierce, 37535). Após bloqueio, as placas são incubadas com 50 μl de anticorpos anti-fosfo-ATF2 de coelho (Cell Signaling, 9221L, 1:500) durante 30 minutos a 37°C.

As placas são lavadas três vezes com solução tampão de lavagem antes da incubação com 50 μl de anticorpos anti-

coelho de cabra conjugado HRP (Cell Signaling, 7074, 1:500) durante 30 minutos a 37°C. As placas são em seguida lavadas três vezes com solução tampão de lavagem antes da incubação com 50 µl de TMB-ELISA Ultra (Pierce, 34028) durante 8 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, 50 µl de ácido fosfórico (1 M) são adicionados para parar as reações e a absorbância da placa é lida a 450 nm em uma leitora de placa SpectraMax 250.

Os compostos inibem a fosforilação de ATF2 neste ensaio *in vitro*. Compostos preferidos apresentam valores de EC₅₀ entre aproximadamente 1 µM e aproximadamente 1.000 µM, de preferência entre aproximadamente 50 µM e aproximadamente 650 µM.

EXEMPLO 2

Compostos são peneirados para a capacidade de inibir liberação de TNFα a partir de células de THP-1 estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS) *in vitro*. A capacidade de compostos para inibir liberação de TNFα neste ensaio *in vitro* está relacionada com a inibição de atividade de p38 e TNFα e é, portanto, um indicador da potencial atividade terapêutica *in vivo* (Lee J.C. e outros 1993 *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 696:149-170 e 1994 *Nature* 372:739-746).

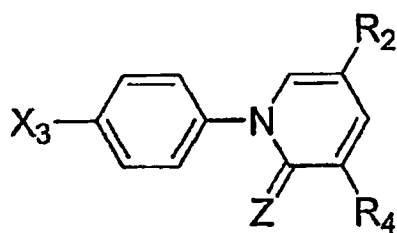
Células THP-I de ATCC (TIB202) são mantidas a 37°C, 5% de CO₂ em meio RPMI 1640 (MediaTech, Herndon, VA) contendo 4,5 g/L de glicose, suplementado com 10% de soro bovino fetal, 1% de penicilina/estreptomicina e 50 µM β-mercaptoetanol.

Os compostos de teste são inicialmente dissolvidos em meio RPMI com 1% DMSO (v/v). Os compostos são em seguida diluídos em série em meio RPMI para todas as diluições

subseqüentes. O ensaio é realizado sob condições estéreis. As células THP-1 a uma densidade de cultura de $6-8 \times 10^5$ células/ml são coletadas e re-suspensas no meio RPMI a 10^6 células/ml. 100 μ l de células re-suspensas são adicionados a cada furo, o qual contém 100 μ l de um composto de teste. Os compostos de teste são preparados ao dobro da concentração final. A concentração final DMSO é inferior a 0,5% (v/v). As células são pré-incubadas com composto durante 60 minutos a 37°C, 5% de CO₂ antes de estimulação com lipopolissacarídeo (LPS) (Sigma L-2880, estoque de 4 mg/ml em PBS). A concentração final de LPS em cada furo é 10 ou 30 μ g/ml para liberação de TNF α e IL-1 β , respectivamente. As suspensões de células de controle não-estimuladas recebem apenas veículo PBS. As misturas de células são incubadas durante 18 ou 48 horas para liberação de TNF α e IL-1 β , respectivamente. 150 μ l de sobrenadantes são retirados e transferidos para uma placa nova e armazenados a -20°C até análise posterior. Os níveis de TNF α e IL-1 β são medidos usando estojos ELISA. Uma Luminescência é usada como a leitora de placa. A análise é realizada por regressão não-linear para gerar uma curva de resposta de dosagem. O valor EC₅₀ calculado é a concentração do composto de teste que provoca uma diminuição de 50% nos níveis de TNF α e IL-1 β .

Os compostos inibem a liberação de TNF α , IL-1 β ou ambos TNF α e IL-1 β neste ensaio *in vitro*. Compostos preferidos apresentam valores de EC₅₀ para TNF α e/ou IL-1 β entre aproximadamente 1 μ M e aproximadamente 1.000 μ M, de preferência entre aproximadamente 50 μ M e aproximadamente 650 μ M. Os dados são fornecidos na Tabela 2 abaixo.

Tabela 2



5

No. ¹	X ₃	R ₂	R ₄	Z	EC ₅₀ TNF (μM) ²	Toxicidade ³
13	-H	-CH ₃	-H	O	A	≥1 mM
7	-H	-H	-H	O	B	D
9	-OH	-H	-H	O	C	D
11	-F	-H	-H	O	B	D
8	-H	-CF ₃	-H	O	B	D
12	-F	-CF ₃	-H	O	C	D
5	-OH	-CH ₃	-H	O	A	≥1 mM
1	-H	-CH ₂ OH	-H	O	B	D
2	-H	-COOH	-H	O	C	D
3	-H	-glucuronida	-H	O	C	D
6	-H	-CH ₂ OCH ₃	-H	O	A	≥1 mM
4	-H	-CH ₃	-OH	O	A	≥1 mM
14	-F	-CH ₃	-H	O	B	D
15	-OCH ₃	-CF ₃	-H	O	C	D
16	-COCH ₃	-H	-H	O	C	D
10	-OH	-CF ₃	-H	O	A	D
17	-H	-fenil	-H	O	C	D
18	-H	-CH ₃	-H	S	C	D
25	Vide observação 4	-CH ₃	-H	O	B	B

26	-H	-Br	-H	O	A	B
27	-OCH ₃	-Br	-H	O	A	A
28	-OH	-CH ₂ F	-H	O	C	D
29	-OH	-CHF ₂	-H	O	C	D
30	-OH	-Br	-H	O	A	A
31	-OCH ₃	-CH ₂ F	-H	O	A	A
32	-OCH ₃	-CHF ₂	-H	O	A	A
33	-H	Vide observação 5	-H	O	C	D
24	-H	CO ₂ CH ₃	-H	O	C	D

¹ Número do composto como mostrado na Tabela 1

² A: ≤2.000; B: >2.000; C: Inconclusivo (por exemplo, sem dados ou sem atividade observada)

³ D: Inconclusivo (por exemplo, sem dados ou sem toxicidade observada)

5 ⁴ Composto 25 é como representado na Tabela 1, isto é, o grupo de arila fixado a um nitrogênio de 2-piridona é uma parcela de N-metilpiridíneo

⁵ Composto 33 é como representado na Tabela 1, isto é, o grupo de bromoarila fundido às posições 5 e 6 de um anel de piridona

EXEMPLO 3

10 Compostos são peneirados para a capacidade de inibir liberação de TNFα a partir de células mononucleares de sangue periférico humano primário (PBMC) estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS) *in vitro*. A capacidade de compostos para inibir liberação de TNFα neste ensaio *in*

15 *vitro* está relacionada com a inibição de atividade de p38 e TNFα e é, portanto, um indicador da potencial atividade terapêutica *in vivo* (2002 *Osteoarthritis & Cartilage* 10:961-967 e Laufer, S.A. e Wagner, G.K. 2002 *J. Med. Chem.* 45:2733-2740).

20 As células mononucleares de sangue periférico humano

(PBMC) são isoladas por centrifugação diferencial através de um gradiente de densidade Ficoll-HyPaque através de soro agrupado de 3-8 doadores individuais de sangue. PBMC isolado contém aproximadamente 10% de monócitos positivos CD-14, 90% de linfócitos e <1% de granulócitos e plaquetas. PBMC (10^6 /ml) são cultivados em placas de poliestireno e estimulados com lipopolissacarídeo (LPS; 50 ng/ml; Sigma, St. Louis, MO) na presença e ausência do composto de teste em diluições em série, em duplicado, durante 24 horas a 37°C em meio GIBCO™ RPM1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) sem soro. O nível de TNF α em sobrenadantes de células é determinado por ELISA usando um estojo disponível comercialmente (MDS Panlabs #309700).

Os compostos preferidos inibem a liberação de TNF α neste ensaio com um valor de EC₅₀ entre aproximadamente 1 μ M e aproximadamente 1.000 μ M, de preferência entre aproximadamente 50 μ M e aproximadamente 650 μ M.

EXEMPLO 4

Compostos são peneirados para a capacidade de inibir a liberação de TNF α em um modelo animal *in vivo* (Vide, por exemplo, Griswold, D.E. e outros 1993 *Drugs Exp. Clin. Res.* 19:243-248; Badger, A.M. e outros 1996 *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 279:1453-1461; Dong, C. e outros 2002 *Annu. Rev. Immunol.* 20:55-72 (e referências citadas nesta); Ono, K. e Han, J. 2000 *Cellular Signalling* 12:1-13 (e referências citadas nesta) e Griffiths, J.B. e outros 1999 *Curr. Rheumatol. Rep.* 1:139-148).

Sem ficar limitado por qualquer teoria específica, acredita-se que a inibição de TNF α neste modelo se deve à inibição da cinase de MAP de p38 pelo composto.

Ratos machos Sprague-Dawley (0,2 - 0,35 kg) são divididos aleatoriamente em grupos de seis ou mais e são dosados intravenosamente por infusão ou injeção de bolo, ou são dosados oralmente com compostos de teste em uma
5 formulação adequada em cada caso. Trinta minutos a seguir ao término da infusão ou injeção de bolo, e 1-2 horas a seguir à administração oral, é administrado lipopolissacarídeo *E. coli*/0127:B8 (0,8 mg/kg). Amostras de sangue são coletadas 1,5 horas pós-tratamento com LPS. Os
10 níveis de soro de TNF α são determinados usando o estojo ELISA de Biosource (KRC3011C) e comparados àqueles do controle tratado com veículo.

Os compostos preferidos inibem a liberação de TNF α neste ensaio *in vivo*. Compostos preferidos apresentam um
15 valor de ED₅₀ menor que aproximadamente 500 mg/kg, de preferência menor que aproximadamente 400 mg/kg, de preferência menor que aproximadamente 200 mg/kg, de preferência menor que aproximadamente 100 mg/kg, mais preferivelmente menor que aproximadamente 50 mg/kg, mais
20 preferivelmente menor que aproximadamente 40 mg/kg, mais preferivelmente menor que aproximadamente 30 mg/kg, mais preferivelmente menor que aproximadamente 20 mg/kg, mais preferivelmente menor que aproximadamente 10 mg/kg.

Os métodos de determinação de EC₅₀ da inibição de p38
25 por um composto incluem quaisquer métodos conhecidos na técnica que permitem a detecção quantitativa de qualquer dos substratos a jusante de MAPK de p38 como descrito acima. Portanto, estes métodos adicionalmente incluem mas são limitados à detecção de expressão de genes conhecidos
30 como sendo regulados por p38 tanto individualmente como por

grupos de genes.

EXEMPLO 5

Os métodos a seguir podem ser usados para (1) um ensaio de cinase para determinação de EC_{50} , (2) um ensaio de cinase não-radiométrica para determinação de EC_{50} , (3) modulação de indução de expressão de $TNF\alpha$, (4) um teste para toxicidade de célula e (5) um ensaio para testar o efeito de compostos sobre a produção de colágeno.

Ensaio de Cinase

10 A atividade das isoformas P38 γ e P38 α da cinase de P38 é determinada por fosforilação de ATF-2 de ^{32}P - γ -ATP. É determinada a incorporação de ^{32}P em ATF-2 na presença ou ausência de inibidores. Pirfenidona e seus diferentes derivados são testados para atividade de cinase de P38 γ e P38 α neste ensaio bioquímico. Os compostos são solubilizados em água ou DMSO e testados a diferentes concentrações de 0 a 10 mM usando o solvente apropriado para diluições e como controle de veículo. As enzimas P38 γ e P38 α são obtidas como proteínas recombinantes ativadas e purificadas (Upstate, Charlottesville, VA). A enzima 20 ativada é usada a 24,8 nM na reação final. As enzimas são diluídas antes da reação na solução tampão seguinte (1 M de HEPES, pH 7,4, 500 mM de DTT, 1% de Triton X-100 e 10 mg/ml de BSA). A reação é realizada na solução a seguir que é preparada como uma solução de estoque de dupla diluição (1 25 M de HEPES, pH 7,4, 500 mM de DTT e 1% de Triton X-100) e ATP não-reativo está presente na reação a 6,25 μ M de ATP (Cell Signaling, Beverly, MA). Para determinar a fosforilação de ATF-2, é adicionado γ - $[^{32}P]$ -ATP 30 3000Ci/mmol a cada reação a uma concentração de 7,5 μ M.

ATF-2 (Cell Signaling, Beverly, MA) como um substrato de cinase é usado a 3 μ M. Como uma primeira etapa na montagem da reação de enzima, cinase ativada e inibidor ou o controle de veículo adequado são adicionados à solução
5 tampão de reação e incubados durante 30 minutos a temperatura ambiente. A reação de cinase é iniciada pela adição da mistura de ATF-2 e ATP. O volume final para cada reação é 20 μ l e realizado a temperatura ambiente durante 30 minutos. Após os 30 minutos de incubação são adicionados
10 80 μ l de solução tampão Laemmli. Subseqüentemente 20% da reação são separados por SDS-Page (BioRad, Hercules, CA) sob condições de redução. Após eletroforese, o gel é exposto a uma placa fosforimager e analisada usando um fosforimager (Storm System, Amersham Biosciences,
15 Piscataway, NJ). O sinal obtido é quantificado após correção de ruído e calculado como percentagem de inibição usando a atividade não-inibida de cinase com o controle de veículo como 0% de inibição. A atividade de cinase, na presença de diferentes concentrações de inibidores, é
20 registrada usando Kaleidagraph (Synergy Software, Reading, PA) para determinar o EC₅₀ para cada composto e cinase de P38 testada.

Ensaio de Cinase Não-radiométrica

Um ensaio de cinase não-radiométrica alternativo foi
25 também utilizado para definir o EC₅₀ para inibição de P38. Neste ensaio, a cinase de p38 transfere um fosfato de ATP para um substrato de peptídeo EGF-R, resultando na formação de peptídeo EGF-R fosforilado com a conversão concomitante de ATP em ADP. Em uma reação desacoplada, p38 também
30 hidrolisa ATP a uma taxa mais lenta na ausência de

substrato de peptídeo (Fox e outros, FEBS Lett 1999), o que contribui ligeiramente para consumo de ATP. Portanto, a quantidade de ATP consumido é diretamente proporcional à atividade de p38. No final de uma reação de cinase, a
5 quantidade de ATP remanescente é determinada usando Ensaio de Cinase de Luminescência Kinase-Glo Plus (Promega, Inc., Madison, WI). Estes reagentes usam ATP residual para suportar a conversão enzimática dependente de ATP de luciferina de besouro em oxiluciferina com a produção
10 concomitante de luz, a qual é detectada por um luminômetro.

As reações de cinase são realizadas pela combinação de composto (diluído em DMSO e solução tampão de ensaio) tanto com p38 α ou p38 γ , e substrato de peptídeo EGF-R (AnaSpec, Inc., San Jose, CA) em solução tampão de ensaio.
15 As reações são então iniciadas pela adição de ATP e deixadas em andamento durante 45 minutos a temperatura ambiente. As condições finais da solução tampão são: 20 mM de HEPES (pH 7,4), 2 mM de DTT, 0,1% de Triton-X-100, 10 mM de MgCl₂, 10% de glicerol, 12,5 mM de p38 α ou p38 γ
20 (Upstate, Charlottesville, VA), 50 μ M de substrato de peptídeo EGF-R e 10 μ M de ATP. O volume do ensaio final é 10 μ L. A reação de controle é realizada na ausência de composto. Reações de controle adicionais que omitem p38 são realizadas a cada concentração de composto. Todas as
25 reações são realizadas em triplicado.

Quarenta e cinco minutos após início da reação de cinase, a reação é rapidamente esfriada pela adição de 10 μ L de reagente de ensaio Kinase-Glo Plus. Deixa-se a reação de luciferase equilibrar durante 15 minutos antes de ser
30 lida em uma Leitora de Placa Envision Multilabel (Perkin

Elmer Life and Analytical Sciences, Boston, MA). Os dados são traçados como sinal de luminescência em função do logaritmo da concentração de composto em KaleidaGraph (Synergy Software, Reading, PA). Os valores de EC_{50} são
5 determinados pelo ajuste dos dados a equação de aglutinação de 4 parâmetros usando um limite superior fixo que é determinado a partir das reações de controle na ausência de p38 (uma vez que a luminescência está inversamente relacionada com atividade de cinase).

10 Inibição de Indução de TNF α

THP-1 (ATCC, Rockville, MD) é desenvolvido sob condições regulares de cultura de tecido como recomendado por ATCC. 18 horas antes do experimento, células foram colocadas em um formato de 96 furos em meio de cultura
15 regular contendo 1% de soro e 0,25 ml de volume de cultura a uma densidade de 500.000 células por furo. O composto é adicionado a cada furo em triplicados e o controle de solvente adequado é incluído em cada ensaio. O inibidor de p38 SB203850 a 1 μ M/ml (Upstate, Waltham, MA) é incluído
20 como um controle positivo em cada ensaio. Para a indução de expressão de TNF α , 1 μ g/ml de LPS é adicionado a cada furo 30 minutos após a adição do composto. A seguir a 4 horas de incubação sob condições de cultura de tecido as células são sedimentadas por centrifugação (10 minutos, 1.000 rpm,
25 centrífuga de mesa superior Beckman) e uma fração do sobrenadante livre de células é coletado e usado em uma solução diluída dez vezes para a quantificação no ELISA específico de TNF α (R&D Systems, Minneapolis, MN). O ELISA de TNF α é realizado de acordo com as orientações fornecidas
30 pelo fabricante. O TNF α é detectado em pg/ml e traçado como

atividade funcional normalizada para a expressão de TNF α no controle de solvente.

Teste de toxicidade de composto em um ensaio à base de células

5 A liberação de LDH como resultado de uma membrana rompida de célula é aplicada como uma medida da toxicidade da célula. LDH é detectado pela atividade enzimática usando um estojo de diagnóstico disponível comercialmente (Roche Diagnostics, Cat# 1 644 793). As células THP-1 são usadas
10 para determinação da toxicidade das células para consistência com a expressão de TNF α induzido no experimento anterior. Como previamente descrito para teste de inibição de indução de TNF α , as células são cultivadas em um formato de 96 furos sob 1% de soro e condições de
15 cultura de tecido regular. Os compostos são adicionados a diferentes concentrações em triplicado. O controle de solvente adequado é usado em cada ensaio. Após adição do composto as células são cultivadas 18 horas sob condições regulares de cultura de tecido. Após este período de
20 incubação, o controle positivo é iniciado pela adição de Triton-X-100 (2% v/v) a células não-tratadas e incubadas por 10 minutos adicionais para lise completo das células. Subseqüentemente as células são sedimentadas por centrifugação e uma fração do sobrenadante removido e
25 analisado para atividade de enzima de LDH de acordo com as instruções do fabricante. Os dados são tipicamente registrados como % de toxicidade de célula normalizada para as células lisadas de Triton-X-100 como 100% de toxicidade de célula.

30 Os dados de toxicidade são também obtidos usando um

ensaio de ATP comercialmente disponível (Estojo de Determinação de ATP Molecular Probes A22066, disponível de Invitrogen) e/ou usando um ensaio MTT. Ambos os ensaios ATP e MTT medem a competência metabólica da célula. O ensaio MTT mede a capacidade da célula reduzir um substrato marcador, o qual está relacionado à competência (isto é, viabilidade). O ensaio ATP mede a concentração celular ATP na presença e ausência de composto. Os compostos tóxicos levam a atividade metabólica reduzida que leva a uma redução na concentração de ATP.

Ensaio para Efeito de Compostos sobre a Produção de Colágeno

Células HFL-1 (ATCC, Rockville, MD) são desenvolvidas sob condições regulares de cultura de tecido em meio completo que contém 10% de soro bovino fetal (FBS; Mediatech, Inc., Herndon, VA). As células em passagem matutina foram colocadas em placas de 6 furos. Quando as células alcançaram confluência, o meio foi removido, as células lavadas com PBS e as células foram mantidas de um dia para o outro em meio completo que continha 0,1% de FBS. O meio foi em seguida substituído por meio fresco mais 0,1% de FCS, 10 μ M de L-Prolina (EMD Chemicals, Gibbstown, NJ), 20 μ g/mL de ácido ascórbico (EMD Chemicals, Gibbstown, NJ). Os compostos foram adicionados a furos triplicados até uma concentração final de 1 mM a partir de soluções de estoque 100X em DMSO. Uma hora após a adição de composto, as células foram tratadas com TGF- β 1 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) até uma concentração final de 10 ng/mL (25 ng total). Três dias após adição de TGF- β , o meio foi removido, as células foram removidas com PBS e em seguida

lisadas. O teor total de colágeno das células lisadas foi determinado com um ensaio de colágeno à base de corante (Sircol Collagen Assay, Newtownabbey, Northern Ireland) e um espectrofotômetro à base de placa μ Quant (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT) com curvas padrão adequadas. A faixa dinâmica do ensaio é definida por células que foram tratadas por simulação (1% de DMSO sem composto) na presença e ausência de TGF- β . Os dados estão registrados na Tabela 3 como a percentagem de inibição de colágeno induzido por TGF- β como determinado na equação a seguir:

$$\% \text{ de inibição} = 100 * [(\text{colágeno, mock/+TGF-}\beta) - (\text{colágeno, tratado/+TGF-}\beta)] / [(\text{colágeno, mock/+TGF-}\beta) - (\text{colágeno, mock/-TGF-}\beta)]$$

Tabela 3

Composto No.	% de Inibição de Síntese de Colágeno Estimulado por TGF- β
8	48
14	23
15	49
26	58
30	69

EXEMPLO 6

Preparação de 1-(4-hidroxifenil)-5-(triflorometil)-2-piridona (Composto 10): Uma mistura de 5-(triflorometil)-2(1H)-piridona (815,5 mg, 5 mmol), 4-iodoanisol (2,34 g, 10 mmol), CuI (952 mg, 5 mmol), K₂CO₃ (691 mg, 5 mmol) e DMF (5 ml) foi aquecida a 135°C de um dia para o outro. A mistura de reação foi diluída com 10% de amônia (15 ml) e

extraída com etil acetato. O extrato orgânico foi lavado com cloreto de sódio saturado, seco sobre sulfato de magnésio e evaporado. Purificação por cromatografia de coluna (30% de etil acetato-hexano) produziu 526 mg (39,2%)
5 de 1-(4-metoxifenil)-5(triflorometil)-2-piridona. Este composto (268,2 mg, 1 mmol) foi tratado com solução de BBr₃ 1M em diclorometano (DCM, 2 ml) em DCM (5 ml) durante 2 horas a 0°C. A mistura de reação foi diluída com DCM e lavada 3 vezes com água. A fase orgânica foi seca sobre
10 sulfato de sódio e evaporada. O resíduo foi separado por cromatografia de coluna (20% de etil acetato - DCM) para produzir o composto título como um sólido não-branco, 226 mg (89%). O espectro ¹H NMR foi consistente com a estrutura do composto 10.

15 EXEMPLO 7

Preparação de 1-fenil-5-acetil-2-piridona (Composto 16): 2-metoxi-5-acetil piridina (1,51 g, 10 mmol) foi tratado com HCl 6N a 100°C durante 5 horas. A mistura de reação foi neutralizada com hidróxido de sódio para pH 7 e
20 em seguida extraída diversas vezes com DCM. A camada orgânica foi seca sobre sulfato de sódio, evaporada e o resíduo foi cristalizado a partir de etil acetato para dar 5-acetil-2(1H)-piridona como um sólido branco, 1,06 g (78%). Este composto (685,7 mg, 5 mmol) foi reagido com
25 iodobenzeno (0,84 ml, 7,5 mmol) na presença de CuI (95 mg, 0,5 mmol) e K₂CO₃ (691 mg, 5 mmol) em DMF (5 ml) a 135°C de um dia para o outro. A mistura de reação foi diluída com amônia a 10% (15 ml) e extraída com etil acetato. O extrato orgânico foi lavado com cloreto de sódio saturado, seco
30 sobre sulfato de magnésio e evaporado. Cromatografia de

coluna (10% de etil acetato - DCM) produziu 407 mg (38%) do composto alvo como um sólido branco. O espectro ^1H NMR foi consistente com a estrutura do composto 16.

EXEMPLO 8

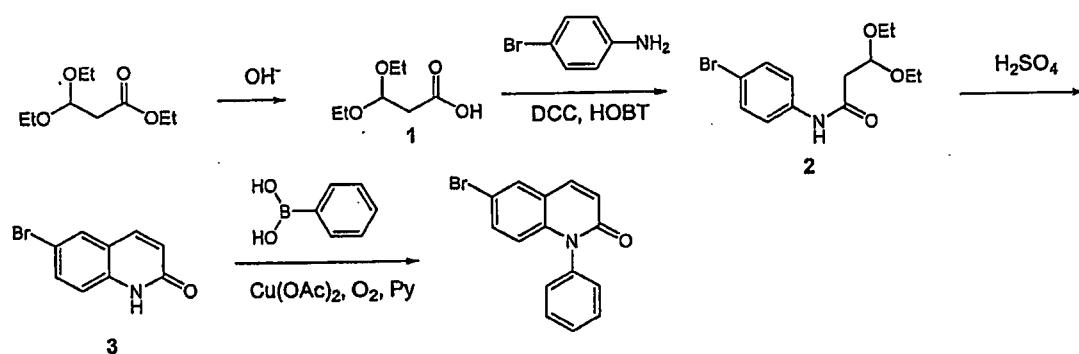
5 Preparação de 1-(4-piridinil)-5-metil-2-piridona
(Composto 22): O composto foi sintetizado por condensação
de 5-metil-2(1H)-piridona (327,4 mg, 3 mmol) com
hidroclorato de 4-bromopiridina (778 mg, 4 mmol) na
presença de CuI (60 mg, 0,3 mmol) e K_2CO_3 (1,36 g, 10 mmol)
10 em DMF (3 ml) a 135°C de um dia para o outro. A mistura de
reação foi diluída com amônia a 10% (15 ml) e extraída com
etil acetato. O extrato orgânico foi lavado com cloreto de
sódio saturado, seco sobre sulfato de magnésio e evaporado.
Cromatografia de coluna (5% de MeOH-DCM) produziu 197 mg
15 (35%) do composto alvo como um sólido amarelado. O espectro
 ^1H NMR foi consistente com a estrutura do composto 22.

EXEMPLO 9

Preparação de 1-fenil-5-metil-2-piridinetiona
(Composto 18): 1-fenil-5-metil-2-piridinona (555,7 mg, 3
20 mmol) foi reagido com reagente de Lawesson (606,7 mg, 1,5
mmol) em tolueno (5 ml) a 90°C . A mistura de reação foi
evaporada e o composto alvo foi isolado por cromatografia
de coluna (20-30% de etil acetato-hexano) seguido por
cristalização a partir de metil-terc-butil éter. O produto
25 foi 403 mg (67%), sólido amarelo. O espectro ^1H NMR foi
consistente com a estrutura do composto 18.

EXEMPLO 10

O composto 33 foi preparado de acordo com o seguinte
esquema sintético:



Composto 33

Uma mistura de etil 3,3-dietoxipropionato (9,7 ml, 50 mmol) e hidróxido de sódio (10M, 6 ml, 60 mmol) comercialmente disponíveis e água (15 ml) foi refluído até homogeneidade (aproximadamente 30 minutos). Após esfriamento até 0°C foi adicionado ácido hidrocloreico 6N para levar o pH da solução até 2-3 (~10 ml). A mistura foi extraída com diclorometano, a fase orgânica foi lavada com água, seca sobre sulfato de sódio e o solvente foi removido sob vácuo para dar o ácido 1 que foi usado sem qualquer purificação adicional.

A uma solução de ácido cru 1 (aproximadamente 50 mmol) em DCM (100 ml) a 0°C foi sequencialmente adicionado 4-bromoanilina (10,3 g, 60 mmol), HOBT (675 mg, 5 mmol) e finalmente DCC (12,4 g, 60 mmol). A mistura de reação foi agitada a 0°C durante 1 hora e em seguida refluída durante outras 4 horas. O sólido foi filtrado, o filtrado foi lavado com bicarbonato de sódio saturado, seco sobre sulfato de sódio e o solvente foi removido sob vácuo para dar amida 2 como sólido ligeiramente amarelo. Este sólido foi dissolvido em ácido sulfúrico (96%, 50 ml) a 0°C . A solução foi mantida à mesma temperatura durante outras 3 horas e em seguida vazada para dentro de gelo líquido (500

ml). O sólido foi filtrado, lavado com água e agitado com acetonitrila quente (100 ml). Quinolinona 3 foi filtrada e seca sob vácuo. O produto foi 10 g (91%).

A mistura do composto 3 (309 mg, 1,38 mmol), ácido
5 fenilborônico (336 mg, 2,76 mmol), $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ (36 mg, 0,2 mmol), peneiras moleculares 4a 0,3 g, piridina (0,24 ml) e DCM (10 ml) foi agitada a temperatura ambiente durante 2 dias. A mistura de reação foi filtrada através de Celite, lavada com bicarbonato de sódio saturado com EDTA e a fase
10 orgânica foi seca sobre sulfato de sódio. O composto 33 foi isolado por cromatografia (50% de etilacetato-hexano-etilacetato). O produto foi 352 mg (85%).

EXEMPLO 11

As propriedades farmacocinéticas (PK) de pirfenidona,
15 análogos e derivados de pirfenidona foram obtidas em ratos Sprague Dawley de cânula dupla (jugular direita/carótida esquerda) (Charles River Laboratories, Inc., Wilmington, MA). A ratos machos pesando aproximadamente 275-300 g foi administrada uma dose intravenosa (5 mg/kg) ou oral (50
20 mg/kg via gavage de composto em uma formulação adequada. Amostras de plasma foram coletadas via cânula intra-arterial em instantes desejados nas 24 horas após dosagem usando EDTA como um anti-coagulante. Três animais foram usados para cada composto. Todos os experimentos foram
25 realizados por pessoal treinado de acordo com orientações dos Institutional Animal Care and Use Committees (IACUC) (Comitês Institucionais de Cuidado e Uso Animal).

As concentrações do composto foram calculadas por LC-MS usando um espectrômetro de massa MDS SCIEX API 3000
30 (Applied Biosystems, Foster City, CA) acoplado a um

Shimadzu VP HPLC (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) equipado com um cartucho de guarda Duragel G C₁₈ (Peeke Scientific, Redwood City, CA). As amostras de calibração foram preparadas pela mistura de quantidades conhecidas de pirfenidona, ou um análogo ou derivado de pirfenidona, com plasma de rato. Uma curva padrão foi criada por diluição em série da amostra de calibração na mesma matriz. As amostras tanto padrão como analíticas foram preparadas para injeção ao HPLC pela mistura de uma alíquota de amostra de plasma com 3 volumes de acetonitrila gelada contendo padrão interno. As amostras foram em seguida centrifugadas. Uma alíquota do sobrenadante resultante foi em seguida misturada com cinco volumes de ácido fórmico a 0,2% em água, injetada no HPLC e resolvida em um gradiente de metanol (contendo 0,18-0,2% de ácido fórmico). O sinal analítico integrado foi corrigido para aquele do padrão interno e comparado com a curva padrão adequado com a finalidade de definir a concentração do analisado.

Os parâmetros farmacocinéticos mostrados na Tabela 4 foram obtidos usando o pacote WinNonlin Software (Pharsight Corp, Mountain View, CA).

Tabela 4

Via de	Dose	Composto	T _{1/2} h	MRTinf	Clobs	AUClast	E
Admin.	mg/kg			H	mL/h/kg	Ng-h/ml	%
IV	5	8	13,9	20,3	0,117	30,2	
		19	2,96	6,26	0,142	35	
		26	1,62	2,4	0,691	10,3	
Oral	50	8				122,4	40,5
		19				191,7	54,8
		26				65,8	63,9

Embora a presente invenção tenha sido descrita em algum detalhe para fins de clareza e compreensão, aquele versado na técnica entenderá que diversas alterações em forma e detalhe podem ser realizadas sem divergir do verdadeiro âmbito da invenção. Todas as figuras, tabelas, apêndices, pedidos de patente e publicações, mencionados acima, são aqui incorporados como referência nas suas totalidades.

REIVINDICAÇÕES

1. Método de modulação de um sistema de proteína cinase ativado por estresse (SAPK), caracterizado por compreender o contato um composto com uma proteína cinase
5 ativada por mitogênio p38 (MAPK),

em que o composto exibe um EC_{50} na faixa entre aproximadamente $1\mu M$ e aproximadamente $1.000\mu M$ para inibição de pelo menos uma MAPK p38 e

em que o contato é conduzido em uma concentração de
10 modulação SAPK que é menor do que um EC_{30} para inibição de pelo menos uma MAPK p38 pelo composto.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato da MAPK p38 ser selecionada a partir do grupo que consiste em p38 α , p38 β , p38 γ e p38 δ .

15 3. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato do contato ser conduzido a uma concentração de modulação de SAPK que é menor que um EC_{20} para inibição de MARK p38 pelo composto.

20 4. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato do contato ser conduzido a uma concentração de modulação de SAPK que é menor que um EC_{10} para inibição de MARK p38 pelo composto.

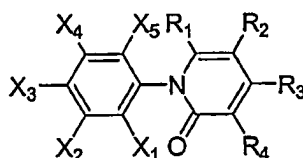
5. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato dos valores de EC_{50} e os valores de
25 EC_{30} serem obtidos a partir de uma curva de resposta de dose.

6. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato da concentração de modulação de SAPK ser eficaz para alterar a liberação de TNF α no sangue
30 todo por pelo menos 15%.

7. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de EC₅₀ estar na faixa entre aproximadamente 50 µM e aproximadamente 650µM.

8. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato do composto compreender um anel de piridona.

9. Método, de acordo com a Reivindicação 1, caracterizado pelo fato do composto ser do Gênero Ia:



Gênero Ia;

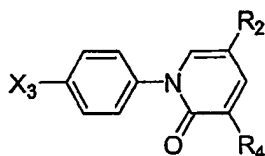
15 onde

R₁, R₂, R₃ e R₄ são independentemente selecionados dentre o grupo que consiste de H, C₁-C₁₀ alquila, C₁-C₁₀ alquila substituída, C₁-C₁₀ alquenila, C₁-C₁₀ haloalquila, C₁-C₁₀ nitroalquila, C₁-C₁₀ tioalquila, C₁-C₁₀ hidroxialquila, C₁-C₁₀ alcóxi, fenil, fenil substituído, halogênio, C₁-C₁₀ alcoxialquila, C₁-C₁₀ carbóxi, alcoxycarbonila, CO-uronida, CO-monossacarídeo, CO-oligossacarídeo, e CO-polissacarídeo; e

25 X₁, X₂, X₃, X₄, e X₅ são independentemente selecionados a partir do grupo que consiste em H, halogênio, C₁-C₁₀ alcóxi e hidróxi.

10. Método, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato do composto ser um metabólito, hidrato, solvente, ou pró-fármaco de um composto do Gênero Ia.

11. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato do composto ser do Gênero Ib:



5

Gênero Ib

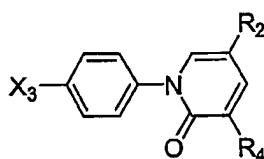
onde

X_3 é selecionado a partir do grupo que consiste em H, halogênio, C_1-C_{10} alcóxi, e OH;

R_2 é selecionado do grupo que consiste em H, halogênio, C_1-C_{10} alquila, C_1-C_{10} alquila substituída, C_1-C_{10} hidroxialquila, C_1-C_{10} alcoxialquila, C_1-C_{10} carbóxi, C_1-C_{10} alcoxycarbonila, CO-uronida, CO-monossacarídeo, CO-oligossacarídeo, e CO-polissacarídeo; e

R_4 é selecionado do grupo que consiste em H, halogênio, e OH.

12. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato do composto ser do Gênero Ic:



20

Gênero Ic,

25 onde

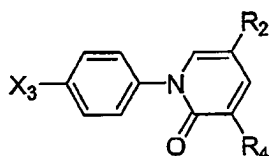
X_3 é selecionado do grupo que consiste em H, F, OH, e OCH_3 ;

R_2 é selecionado do grupo que consiste em H, CF_3 , CHF_2 , CH_2F , CH_2OH , $COOH$, CO-Glucoronida, Br, CH_3 , e CH_2OCH_3 ;

30 e

R_4 é selecionado do grupo que consiste em H e OH;
sob a condição de que quando R_4 e X_3 são H, R_2 não é CH_3 .

13. Método, de acordo com a reivindicação 1,
5 caracterizado pelo fato do composto ser do Subgênero II:



10 Subgênero II;

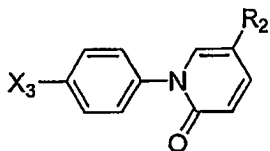
onde

X_3 é selecionado a partir do grupo que consiste em H, OH, e OCH_3 ;

R_2 é selecionado do grupo que consiste em H, CF_3 ,
15 CHF_2 , CH_2F , CH_2OH , $COOH$, CO-Glucoronida, Br, CH_3 , e CH_2OCH_3 ;
e

R_4 é selecionado do grupo que consiste em H e OH, sob a condição de que quando R_4 e X_3 são H, R_2 não é CH_3 .

14. Método, de acordo com a reivindicação 1,
20 caracterizado pelo fato do composto ser do Subgênero III:



25 Subgênero III;

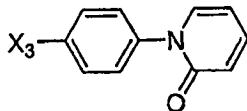
em que

X_3 é selecionado do grupo que consiste em H, F, e OH;

e

R_2 é selecionado do grupo que consiste em H, Br,
30 CH_2F , CHF_2 , e CF_3 .

15. Método, de acordo com a reivindicação 1,
caracterizado pelo fato do composto ser do Subgênero IV:

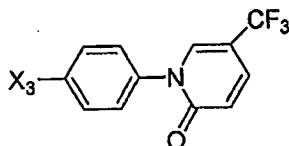


5

Subgênero IV;

onde X_3 é selecionado do grupo que consiste em H, halogênio, C_1-C_{10} alcóxi, C_1-C_{10} alquila, C_1-C_{10} alquila
 10 substituída, C_1-C_{10} alquenila, C_1-C_{10} haloalquila, C_1-C_{10} nitroalquila, C_1-C_{10} tioalquila, C_1-C_{10} hidroxialquila, fenil, fenil substituído, C_1-C_{10} alcoxialquila, C_1-C_{10} carbóxi, C_1-C_{10} alcoxycarbonila, CO-uronida, CO-monossacarídeo, CO-oligossacarídeo, e CO-polissacarídeo.

15 16. Método, de acordo com a reivindicação 1,
caracterizado pelo fato do composto ser do Subgênero V:

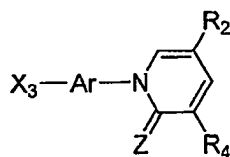


20

Subgênero V;

em que X_3 é selecionado do grupo que consiste em H, halogênio, C_1-C_{10} alcóxi, C_1-C_{10} alquila, C_1-C_{10} alquila
 25 substituída, C_1-C_{10} alquenila, C_1-C_{10} haloalquila, C_1-C_{10} nitroalquila, C_1-C_{10} tioalquila, C_1-C_{10} hidroxialquila, fenil, fenil substituído, C_1-C_{10} alcoxialquila, C_1-C_{10} carbóxi, C_1-C_{10} alcoxycarbonila, CO-uronida, CO-monossacarídeo, CO-oligossacarídeo, e CO-polissacarídeo.

17. Método, de acordo com a reivindicação 1,
 30 caracterizado pelo fato do composto ser do Gênero VI:



5

Gênero VI;

onde

Ar é piridinila ou fenil;

Z é O ou S;

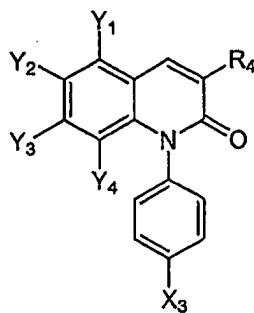
10 X_3 é H, F, Cl, OH, CH_3 , ou OCH_3 ;

R₂ é metila, C(=O)H, C(=O)CH₃, C(=O)OCH₃, C(=O)O-glucosil, fluorometil, difluorometil, trifluorometil, bromo, metilmetoxil, metilhidroxil, ou fenil; e

R₄ é H ou um hidroxil;

15 sob a condição de que quando R₂ é trifluorometil, Z é
O, R₄ é H e Ar é fenil, o fenil não é apenas substituído na
posição 4' por h, F, ou OH.

18. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato do composto ser do Gênero VII:



25

Gênero VII

em que

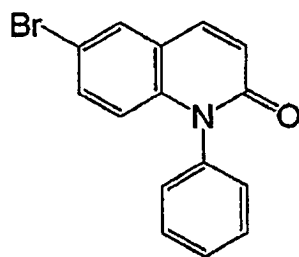
X₃ é selecionado do grupo que consiste em H, halogênio, C₁-C₁₀ alcóxi, e OH;

30 Y_1, Y_2, Y_3 e Y_4 são independentemente selecionados

dentre o grupo que consiste de H, C₁-C₁₀ alquila, C₁-C₁₀ alquila substituída, C₁-C₁₀ alquenila, C₁-C₁₀ haloalquila, C₁-C₁₀ nitroalquila, C₁-C₁₀ tioalquila, C₁-C₁₀ hidroxialquila, C₁-C₁₀ alcóxi, fenil, fenil substituído, halogênio, hidroxil, C₁-C₁₀ alcoxialquila, C₁-C₁₀ carbóxi, C₁-C₁₀ alcoxicarbonila; e

R₄ é selecionado do grupo que consiste em H, halogênio, e OH.

19. Método, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato do composto ser:



20. Método de tratamento ou prevenção de um estado doentio em um indivíduo, caracterizado por compreender:

identificar um indivíduo em risco para ou que possua uma condição selecionada a partir de uma condição inflamatória e uma condição fibrótica;

administrar um composto ao indivíduo em uma quantidade eficaz para tratar ou impedir a condição;

em que o composto exibe um EC₅₀ na faixa entre aproximadamente 1 μM e aproximadamente 1.000 μM para inibição de pelo menos uma MAPK p38 e

em que a quantidade eficaz produz uma concentração de sangue ou soro ou de outro fluido corporal que seja inferior a EC₃₀ para a inibição de pelo menos uma MAPK p38.

21. Método, de acordo com a reivindicação 20,

caracterizado pelo fato da condição ser selecionada a partir do grupo que consiste em fibrose, doença pulmonar obstrutiva crônica, fibrose pulmonar idiopática, síndrome obliterosa bronquiolites; fibrose alograft crônica; artrite reumatóide; espondilite reumatóide; osteoartrite; gota; sépsi; choque séptico; choque endotóxico; sépsi gram-negativa; síndrome do choque tóxico; síndrome da dor miofacial (MPS); Shigelosi; asma; síndrome de doença respiratória adulta; doença intestinal inflamatória; doença de Crohn; psoríase; eczema; colite ulcerativa; nefrite glomerular; esclerodermia; tireoidite crônica; doença de Grave; doença de Ormond; gastrite auto-imune; misatemia grave; anemia hemolítica auto-imune; neutropenia auto-imune; trombocitopenia; fibrose pancreática; hepatite ativa crônica; fibrose hepática; doença renal; fibrose renal, síndrome intestinal irritável; pirese; restenose; malária cerebral; derrame e dano isquêmico; trauma neural; mal de Alzheimer; doença de Huntington; mal de Parkinson; dor aguda e crônica; alergias; hipertrofia cardíaca; falência do coração crônica; síndrome coronária aguda; caquexia; malária; lepra; leishmaniose, doença de Lyme; síndrome de Reiter; sinusite aguda; degeneração muscular, bursite; tendinite; tenosinusite; síndrome de disco vertebral com hérnia, rompido, ou com prolapso; osteopetrose; trombose; silicose; sarcosi pulmonar; doenças de reabsorção de osso; câncer; Esclerose Múltipla, lupus; fibromialgia; AIDS; Herpes Zoster, Herpes Simples, vírus de gripe, Síndrome Respiratória Aguda Severa (SARS); citomegalovírus; e diabetes mellitus.

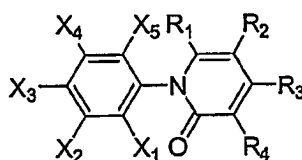
22. Método, de acordo com a reivindicação 20,

caracterizado pelo fato da quantidade efetiva ser menor que 50% de uma quantidade que provoca um efeito colateral indesejável no indivíduo.

23. Método, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato do composto inibir uma cinase no percurso de sinalização de SAPK.

24. Método, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato do composto ser um análogo de pirfenidoina.

25. Método, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato do composto ser do Gênero Ia:



Gênero Ia;

onde

R_1 , R_2 , R_3 e R_4 são independentemente selecionados dentre o grupo que consiste de H, C_1 - C_{10} alquila, C_1 - C_{10} alquila substituída, C_1 - C_{10} alquenila, C_1 - C_{10} haloalquila, C_1 - C_{10} nitroalquila, C_1 - C_{10} tioalquila, C_1 - C_{10} hidroxialquila, C_1 - C_{10} alcóxi, fenil, fenil substituído, halogênio, C_1 - C_{10} alcoxialquila, C_1 - C_{10} carbóxi, alcoxycarbonila, CO-uronida, CO-monossacarídeo, CO-oligossacarídeo, e CO-polissacarídeo;

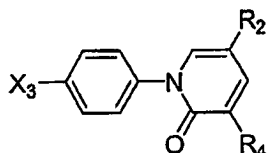
X_1 , X_2 , X_3 , X_4 , e X_5 são independentemente selecionados a partir do grupo que consiste em H, halogênio, C_1 - C_{10} alcóxi e hidróxi.

26. Método, de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato do composto ser um metabólito,

hidrato, solvente, ou pró-fármaco de um composto do Gênero Ia.

27. Método, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato do composto ser do Gênero Ib:

5



Gênero Ib

10 onde

X₃ é selecionado a partir do grupo que consiste em H, halogênio, C₁-C₁₀ alcóxi, e OH;

R₂ é selecionado do grupo que consiste em H, halogênio, C₁-C₁₀ alquila, C₁-C₁₀ alquila substituída, C₁-C₁₀ hidroxialquila, C₁-C₁₀ alcoxialquila, C₁-C₁₀ carbóxi, C₁-C₁₀ alcoxycarbonila, CO-uronida, CO-monossacarídeo, CO-oligossacarídeo, e CO-polissacarídeo; e

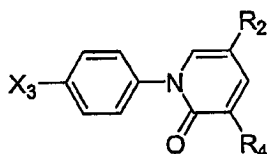
R₄ é selecionado do grupo que consiste em H, halogênio, e OH.

20

28. Método, de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato do composto ser um metabólito, hidrato, solvente, ou pró-fármaco de um composto do Gênero Ib.

29. Método, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato do composto ser do Gênero Ic:

25



Gênero Ic,

30

onde

X_3 é selecionado do grupo que consiste em H, F, OH, e OCH_3 ;

R_2 é selecionado do grupo que consiste em H, CF_3 , CHF_2 , CH_2F , CH_2OH , $COOH$, CO-Glucoronida, Br, CH_3 , e CH_2OCH_3 ;

e

R_4 é selecionado do grupo que consiste em H e OH;

sob a condição de que quando R_4 e X_3 são H, R_2 não é CH_3 .

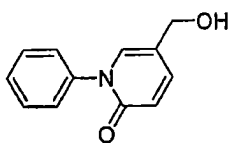
30. Método, de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato do composto ser um metabólito, hidrato, solvente, ou pró-fármaco de um composto do Gênero Ic.

31. Método, de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato do composto ser selecionado a partir dos Compostos 1 a 12 e 14 como segue:

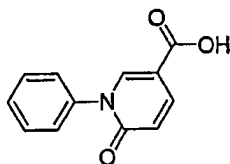
Número do composto	Composto
-----------------------	----------

20

1

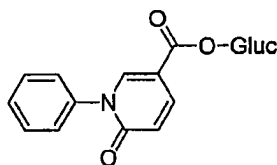


2

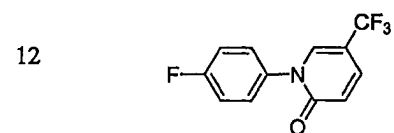
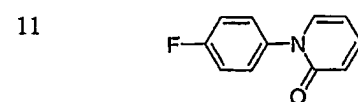
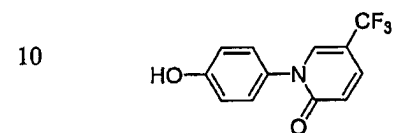
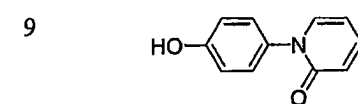
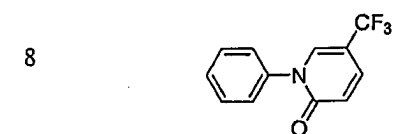
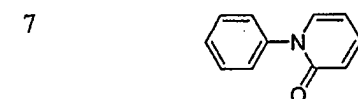
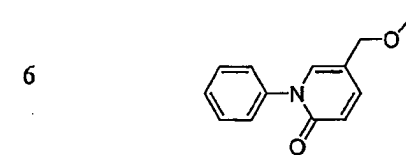
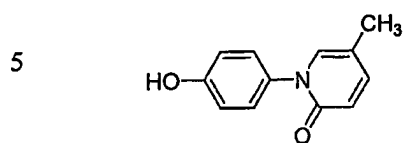
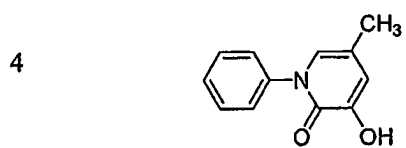


25

3



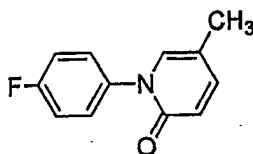
30

Número do Composto

Número do Composto
composto

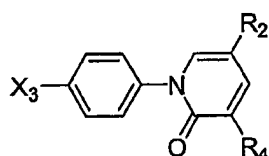
5

14



32. Método, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato do composto ser do Subgênero II:

10



Subgênero II;

15

onde

X_3 é selecionado a partir do grupo que consiste em H, OH, e OCH_3 ;

R_2 é selecionado do grupo que consiste em H, CF_3 , CHF_2 , CH_2F , CH_2OH , $COOH$, CO-Glucoronida, Br, CH_3 , e CH_2OCH_3 ;

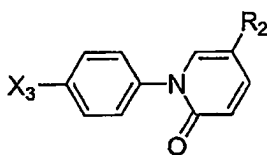
20 e

R_4 é selecionado do grupo que consiste em H e OH, sob a condição de que quando R_4 e X_3 são H, R_2 não é CH_3 .

33. Método, de acordo com a reivindicação 32, caracterizado pelo fato do composto ser um metabólito, hidrato, solvente, ou pró-fármaco de um composto do Subgênero II.

25

34. Método, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato do composto ser do Subgênero III:



5 Subgênero III;

em que

X_3 é selecionado do grupo que consiste em H, F, e OH;

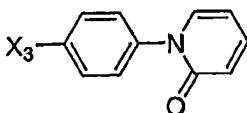
e

R_2 é selecionado do grupo que consiste em H, Br,

10 CH_2F , CHF_2 , e CF_3 .

35. Método, de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo fato do composto ser um metabólito, hidrato, solvente, ou pró-fármaco de um composto do Subgênero III.

15 36. Método, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato do composto ser do Subgênero IV:



20

Subgênero IV;

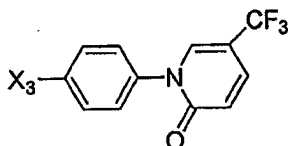
onde X_3 é selecionado do grupo que consiste em H, halogênio, C_1-C_{10} alcóxi, C_1-C_{10} alquila, C_1-C_{10} alquila substituída, C_1-C_{10} alquenila, C_1-C_{10} haloalquila, C_1-C_{10} nitroalquila, C_1-C_{10} tioalquila, C_1-C_{10} hidroxialquila, 25 fenil, fenil substituído, C_1-C_{10} alcoxialquila, C_1-C_{10} carbóxi, C_1-C_{10} alcoxycarbonila, CO-uronida, CO-monossacarídeo, CO-oligossacarídeo, e CO-polissacarídeo.

30 37. Método, de acordo com a reivindicação 36, caracterizado pelo fato do composto ser um metabólito,

hidrato, solvente, ou pró-fármaco de um composto do Subgênero IV.

38. Método, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato do composto ser do Subgênero V:

5



10

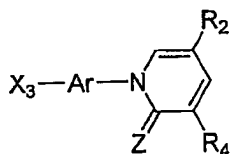
Subgênero V;

em que X₃ é selecionado do grupo que consiste em H, halogênio, C₁-C₁₀ alcóxi, C₁-C₁₀ alquila, C₁-C₁₀ alquila substituída, C₁-C₁₀ alquenila, C₁-C₁₀ haloalquila, C₁-C₁₀ nitroalquila, C₁-C₁₀ tioalquila, C₁-C₁₀ hidroxialquila, 15 fenil, fenil substituído, C₁-C₁₀ alcoxialquila, C₁-C₁₀ carbóxi, C₁-C₁₀ alcoxycarbonila, CO-uronida, CO-monossacarídeo, CO-oligossacarídeo, e CO-polissacarídeo.

39. Método, de acordo com a reivindicação 38, caracterizado pelo fato do composto ser um metabólito, 20 hidrato, solvente, ou pró-fármaco de um composto do Subgênero V.

40. Método, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato do composto ser do Subgênero VI:

25



Gênero VI;

30

onde

Ar é piridinila ou fenil;

Z é O ou S;

X₃ é H, F, Cl, OH, CH₃, ou OCH₃;

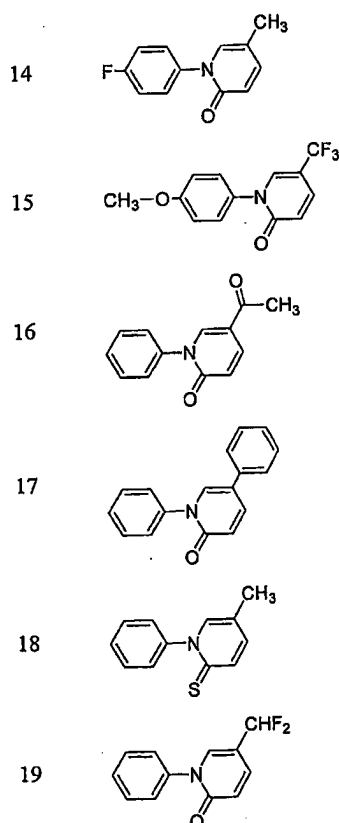
R₂ é metila, C(=O)H, C(=O)CH₃, C(=O)OCH₃, C(=O)O-
5 glucosil, fluorometil, difluorometil, trifluorometil,
bromo, metilmetoxil, metilhidroxil, ou fenil; e

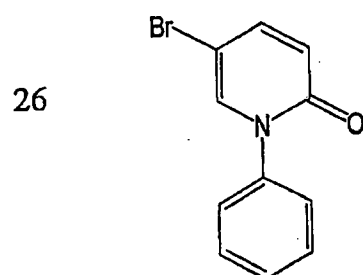
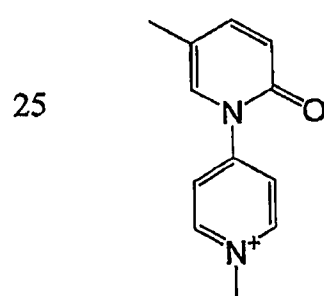
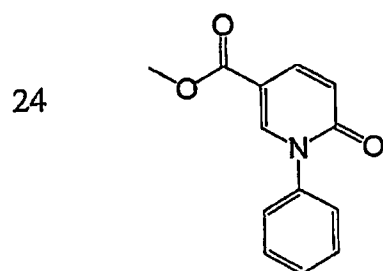
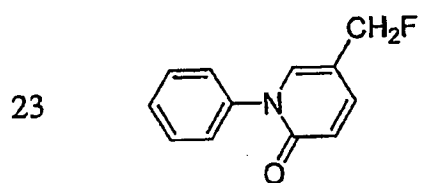
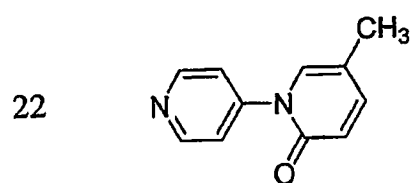
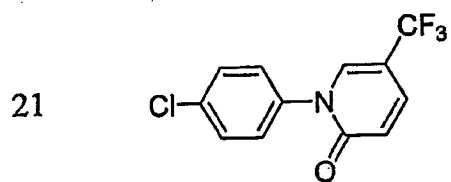
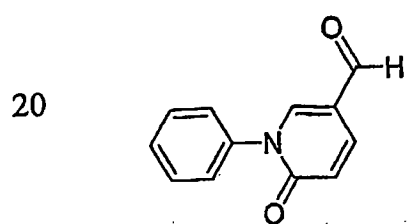
R₄ é H ou um hidroxil;

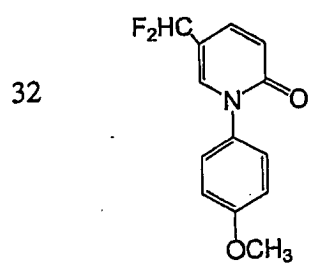
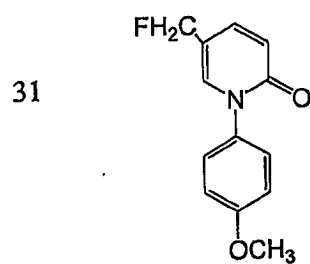
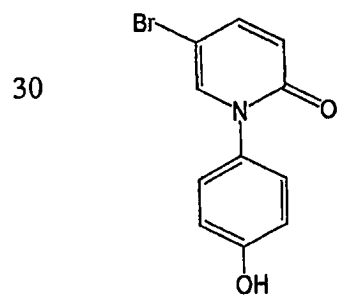
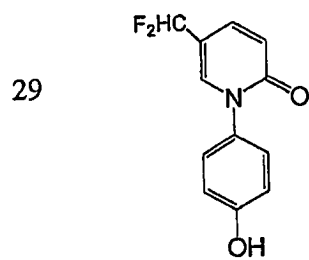
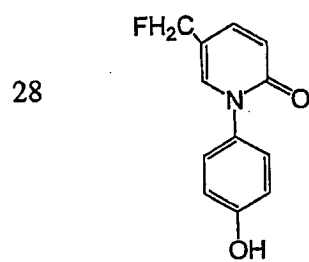
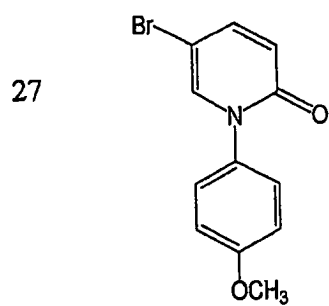
sob a condição de que quando R₂ é trifluorometil, Z é
O, R₄ é H e Ar é fenil, o fenil não é apenas substituído na
10 posição 4' por h, F, ou OH.

41. Método, de acordo com a reivindicação 40,
caracterizado pelo fato do composto ser um metabólito,
hidrato, solvente, ou pró-fármaco de um composto do
Subgênero VI.

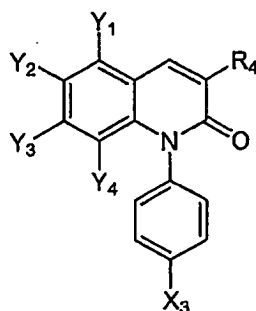
15 42. Método, de acordo com a reivindicação 40,
caracterizado pelo fato do composto ser selecionado a
partir dos Compostos 14 a 32 como segue:







43. Método, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato do composto ser do Gênero VII:



Gênero VII

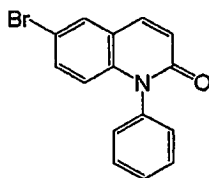
em que
 X_3 é selecionado do grupo que consiste em H, halogênio, C_1 - C_{10} alcóxi, e OH;

Y_1 , Y_2 , Y_3 e Y_4 são independentemente selecionados dentre o grupo que consiste de H, C_1 - C_{10} alquila, C_1 - C_{10} alquila substituída, C_1 - C_{10} alquenila, C_1 - C_{10} haloalquila, C_1 - C_{10} nitroalquila, C_1 - C_{10} tioalquila, C_1 - C_{10} hidroxialquila, C_1 - C_{10} alcóxi, fenil, fenil substituído, halogênio, hidroxil, C_1 - C_{10} alcoxialquila, C_1 - C_{10} carbóxi, C_1 - C_{10} alcoxycarbonila; e

R_4 é selecionado do grupo que consiste em H, halogênio, e OH.

44. Método, de acordo com a reivindicação 43, caracterizado pelo fato do composto ser um metabólito, hidrato, solvente, ou pró-fármaco de um composto do Gênero VII.

45. Método, de acordo com a reivindicação 44, caracterizado pelo fato do composto ser:



46. Método para identificar um composto farmacologicamente ativo, caracterizado por compreender:

propiciar uma biblioteca de compostos;

ensaiar diversos compostos a partir da biblioteca

5 para inibição de pelo menos uma MAPK p38 e

selecionar pelo menos um composto a partir dos diversos compostos, em que o composto selecionado exiba um EC_{50} na faixa entre aproximadamente 1 μM e aproximadamente 1000 μM para a inibição de pelo menos uma MAPK p38.

10 47. Método para identificar um composto farmacologicamente ativo, caracterizado por compreender:

propiciar uma biblioteca de compostos;

ensaiar diversos compostos a partir da biblioteca para inibição de secreção em um fluido corporal *in vivo* e

15 selecionar pelo menos um composto dentre diversos compostos, em que o composto selecionado exibe um EC_{50} na faixa entre aproximadamente 1 μM e aproximadamente 1000 μM para inibição de secreção TNF α em um fluido corporal *in vivo*.

20 48. Método para identificar um composto farmacologicamente ativo, caracterizado por compreender:

propiciar uma biblioteca de compostos;

ensaiar diversos compostos a partir da biblioteca para inibição de secreção por células em cultura *in vitro* e

25 selecionar pelo menos um composto dentre diversos compostos, em que o composto selecionado exibe um EC_{50} na faixa entre aproximadamente 1 μM e aproximadamente 1000 μM para inibição de secreção TNF α em um fluido corporal *in vitro*.

30 49. Método para identificar um composto

farmaceuticamente ativo, caracterizado por compreender:

propiciar uma biblioteca de compostos;

ensaiar diversos compostos a partir da biblioteca para inibição de secreção em um fluido corporal *in vivo*; e

5 selecionar pelo menos um composto dentre diversos compostos, em que o composto selecionado exibe um EC_{50} na faixa entre aproximadamente 1 μM e aproximadamente 1000 μM para inibição de secreção TNF α por células em cultura *in vitro*.

10 50. Método para identificar um composto farmaceuticamente ativo, caracterizado por compreender:

propiciar uma biblioteca de compostos;

ensaiar diversos compostos a partir da biblioteca para inibição de secreção por células em cultura *in vitro* e

15 selecionar pelo menos um composto dentre diversos compostos, em que o composto selecionado exibe um EC_{50} na faixa entre aproximadamente 1 μM e aproximadamente 1000 μM para inibição de secreção TNF α em um fluido corporal *in vivo*.

20 51. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 47, 48, 49 ou 50, caracterizado por compreender ainda a determinação de uma toxicidade mamífera do composto selecionado.

25 52. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 47, 48, 49 ou 50, caracterizado por compreender ainda a administração do composto selecionado a um indivíduo de teste.

30 53. Método, de acordo com a reivindicação 52, caracterizado pelo fato do indivíduo de teste ter ou estar em risco de ter uma condição inflamatória.

54. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 47, 48, 49 ou 50, caracterizado pelo fato do composto ser selecionado a partir do grupo que consiste em p38 α , p38 β , p38 γ e p38 δ .

5 55. Método, de acordo com a reivindicação 46, caracterizado pelo fato de EC₅₀ ser obtido a partir de uma curva de resposta de dose.

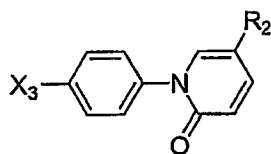
56. Método, de acordo com a reivindicação 46, caracterizado pelo fato de EC₅₀ estar na faixa entre
10 aproximadamente 50 μ M e aproximadamente 650 μ M.

57. Método, de acordo com a reivindicação 47, caracterizado pelo fato de EC₅₀ ser obtido a partir de uma curva de resposta de dose.

58. Método, de acordo com a reivindicação 47, caracterizado pelo fato de EC₅₀ estar na faixa entre
15 aproximadamente 50 μ M e aproximadamente 650 μ M.

59. Composto caracterizado por ter a fórmula do Subgênero III:

20



Subgênero III;

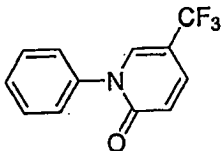
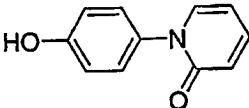
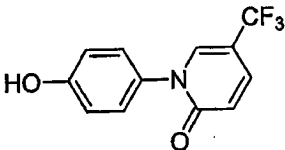
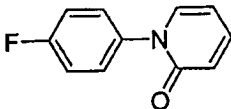
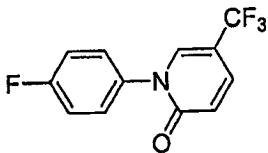
em que

25 X₃ é selecionado do grupo que consiste em H, F, e OH;
R₂ é selecionado do grupo que consiste em H, Br, CH₂F, CHF₂, e CF₃ e

em que o composto exibe um EC₅₀ na faixa entre aproximadamente 1 μ M e aproximadamente 1.000 μ M para
30 inibição de MAPK p38; ou um sal, éster, solvente ou pró-

fármaco farmaceuticamente aceitável do composto.

60. Composto, de acordo com a reivindicação 59, caracterizado pelo fato do composto ser selecionado a partir dos Compostos 8 a 12 como segue:

5	Número	Composto
	do composto	
	8	
10	9	
15	10	
20	11	
25	12	

61. Composto, de acordo com a reivindicação 59, caracterizado pelo fato de ter um EC₅₀ na faixa entre aproximadamente 1 µM e aproximadamente 1.000 µM para inibição de MAPK p38.

62. Composto, de acordo com a reivindicação 61,

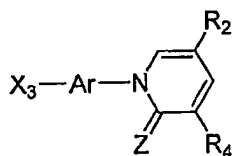
caracterizado pelo fato de ter um EC_{50} na faixa entre aproximadamente 50 μM e aproximadamente 650 μM .

63. Composto, de acordo com a reivindicação 61, caracterizado pelo fato de ter um EC_{50} na faixa entre aproximadamente 1 μM e aproximadamente 1.000 μM para inibição de secreção de TNF α em um fluido corporal *in vivo*.

64. Composto, de acordo com a reivindicação 61, caracterizado pelo fato de ter um EC_{50} na faixa entre aproximadamente 1 μM e aproximadamente 1.000 μM para inibição de secreção de TNF α por células cultivada *in vitro*.

65. Composto caracterizado por ter a fórmula do Gênero VI:

15



Gênero VI;

20

onde

Ar é piridinila ou fenil;

Z é O ou S;

X_3 é H, F, Cl, OH, CH_3 , ou OCH_3 ;

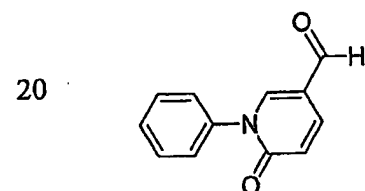
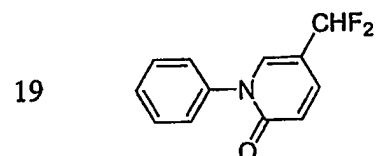
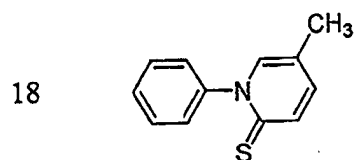
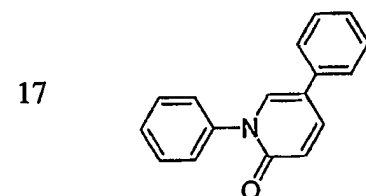
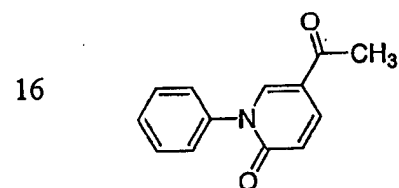
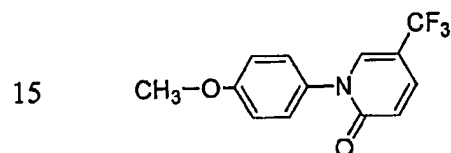
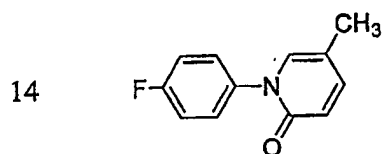
25 R_2 é metila, $C(=O)H$, $C(=O)CH_3$, $C(=O)OCH_3$, $C(=O)O$ -glucosil, fluorometil, difluorometil, trifluorometil, bromo, metilmetoxil, metilhidroxil, ou fenil; e

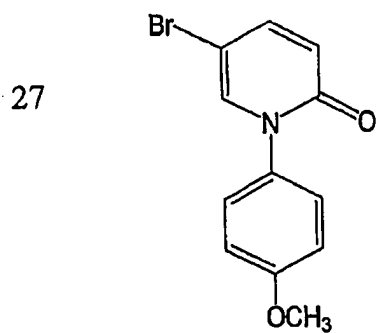
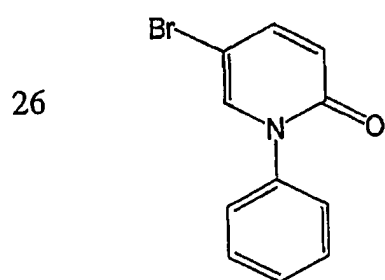
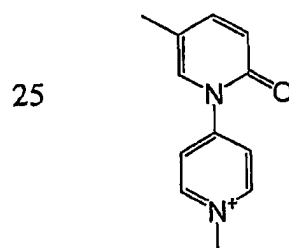
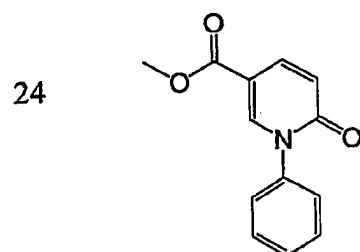
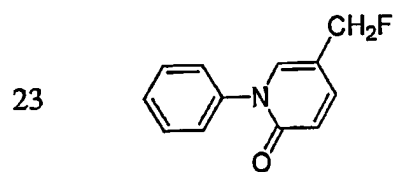
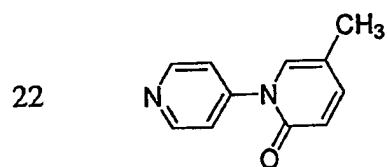
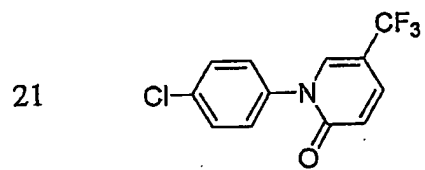
R_4 é H ou um hidroxil;

sob a condição de que quando R_2 é trifluorometil, Z é O, R_4 é H e Ar é fenil, o fenil não é apenas substituído na
30 posição 4' por h, F, ou OH;

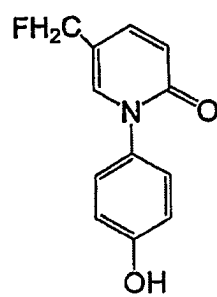
em que o composto exibe um EC₅₀ na faixa entre aproximadamente 1 µM e aproximadamente 1.000 µM para inibição de MAPK p38; ou um sal, éster, solvente ou pró-fármaco farmacologicamente aceitável do composto.

5 66. Composto, de acordo com a reivindicação 65,
 caracterizado pelo fato do composto ser selecionado a
 partir dos Compostos 14 a 32 como segue:

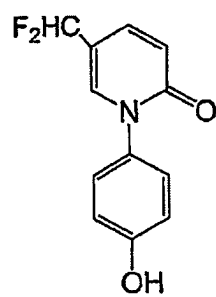




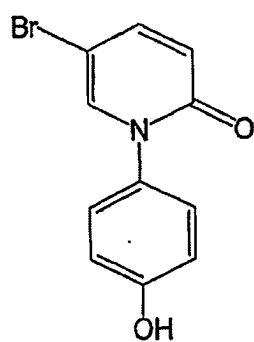
28



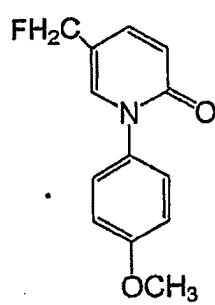
29



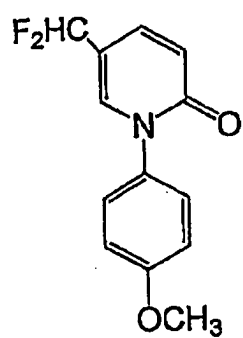
30



31



32



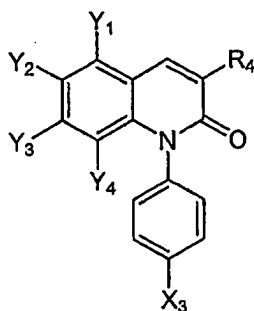
67. Composto, de acordo com a reivindicação 65, caracterizado pelo fato de ter um EC_{50} na faixa entre aproximadamente 1 μM e aproximadamente 1.000 μM para inibição de MAPK p38.

5 68. Composto, de acordo com a reivindicação 67, caracterizado pelo fato de ter um EC_{50} na faixa entre aproximadamente 50 μM e aproximadamente 650 μM .

69. Composto, de acordo com a reivindicação 67, caracterizado pelo fato de ter um EC_{50} na faixa entre
10 aproximadamente 1 μM e aproximadamente 1.000 μM para inibição de secreção de TNF α em um fluido corporal *in vivo*.

70. Composto, de acordo com a reivindicação 67, caracterizado pelo fato de ter um EC_{50} na faixa entre
15 aproximadamente 1 μM e aproximadamente 1.000 μM para inibição de secreção de TNF α por células cultivada *in vitro*.

71. Composto caracterizado por ter a fórmula do Gênero VII:



Gênero VII

em que

X_3 é selecionado do grupo que consiste em H, halogênio, C_1 - C_{10} alcóxi, e OH;

Y_1 , Y_2 , Y_3 e Y_4 são independentemente selecionados
30 dentre o grupo que consiste de H, C_1 - C_{10} alquila, C_1 - C_{10}

alquila substituída, C₁-C₁₀ alquênica, C₁-C₁₀ haloalquila, C₁-C₁₀ nitroalquila, C₁-C₁₀ tioalquila, C₁-C₁₀ hidroxialquila, C₁-C₁₀ alcóxi, fenil, fenil substituído, halogênio, hidroxil, C₁-C₁₀ alcoxialquila, C₁-C₁₀ carbóxi, C₁-C₁₀
 5 alcoxycarbonila;

R₄ é selecionado do grupo que consiste em H, halogênio, e OH e

em que o composto exibe um EC₅₀ na faixa entre aproximadamente 1 µM e aproximadamente 1.000 µM para
 10 inibição de MAPK p38; ou um sal, éster, solvente ou pró-fármaco farmacologicamente aceitável do composto.

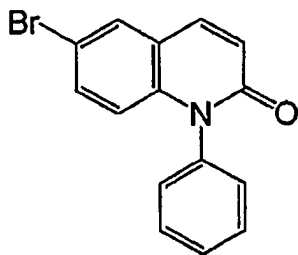
72. Composto, de acordo com a reivindicação 71, caracterizado pelo fato de ter um EC₅₀ na faixa entre aproximadamente 1 µM e aproximadamente 1.000 µM para
 15 inibição de MAPK p38.

73. Composto, de acordo com a reivindicação 71, caracterizado pelo fato de ter um EC₅₀ na faixa entre aproximadamente 50 µM e aproximadamente 650 µM.

74. Composto, de acordo com a reivindicação 71, caracterizado pelo fato de ter um EC₅₀ na faixa entre
 20 aproximadamente 1 µM e aproximadamente 1.000 µM para inibição de secreção de TNFα em um fluido corporal *in vivo*.

75. Composto, de acordo com a reivindicação 71, caracterizado pelo fato de ter um EC₅₀ na faixa entre
 25 aproximadamente 1 µM e aproximadamente 1.000 µM para inibição de secreção de TNFα por células cultivada *in vitro*.

76. Composto, de acordo com a reivindicação 71, caracterizado por ter a fórmula:



5

77. Composto, de acordo com a reivindicação 71, caracterizado pelo fato de ter um EC_{50} na faixa entre aproximadamente 1 μM e aproximadamente 1.000 μM para inibição de MAPK p38.

78. Composto, de acordo com a reivindicação 71, caracterizado pelo fato de ter um EC_{50} na faixa entre aproximadamente 50 μM e aproximadamente 650 μM .

79. Composto, de acordo com a reivindicação 71, caracterizado pelo fato de ter um EC_{50} na faixa entre aproximadamente 1 μM e aproximadamente 1.000 μM para inibição de secreção de TNF α em um fluido corporal *in vivo*.

80. Composto, de acordo com a reivindicação 71, caracterizado pelo fato de ter um EC_{50} na faixa entre aproximadamente 1 μM e aproximadamente 1.000 μM para inibição de secreção de TNF α por células cultivada *in vitro*.

81. Composição farmacêutica caracterizada por compreender o composto da reivindicação 59 e um excipiente farmacêuticamente aceitável.

82. Composição farmacêutica caracterizada por compreender o composto da reivindicação 65 e um excipiente farmacêuticamente aceitável.

83. Composição farmacêutica caracterizada por compreender o composto da reivindicação 71 e um excipiente

farmaceuticamente aceitável.

84. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 81, caracterizada pelo fato da composição conter uma quantidade do referido composto que é
5 selecionada para administração a um paciente em uma programação selecionada a partir de: duas vezes ao dia, uma vez ao dia, uma vez a cada dois dias, três vezes por semana, duas vezes por semana e uma vez por semana.

85. Composição farmacêutica, de acordo com a
10 reivindicação 82, caracterizada pelo fato da composição conter uma quantidade do referido composto que é selecionada para administração a um paciente em uma programação selecionada a partir de: duas vezes ao dia, uma vez ao dia, uma vez a cada dois dias, três vezes por
15 semana, duas vezes por semana e uma vez por semana.

86. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 83, caracterizada pelo fato da composição conter uma quantidade do referido composto que é selecionada para administração a um paciente em uma
20 programação selecionada a partir de: duas vezes ao dia, uma vez ao dia, uma vez a cada dois dias, três vezes por semana, duas vezes por semana e uma vez por semana.

87. Método, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato do referido composto ser
25 administrado ao referido paciente em uma programação selecionada a partir de: duas vezes ao dia, uma vez ao dia, uma vez a cada dois dias, três vezes por semana, duas vezes por semana e uma vez por semana.

88. Método, de acordo com a reivindicação 21,
30 caracterizado pelo fato do referido composto ser

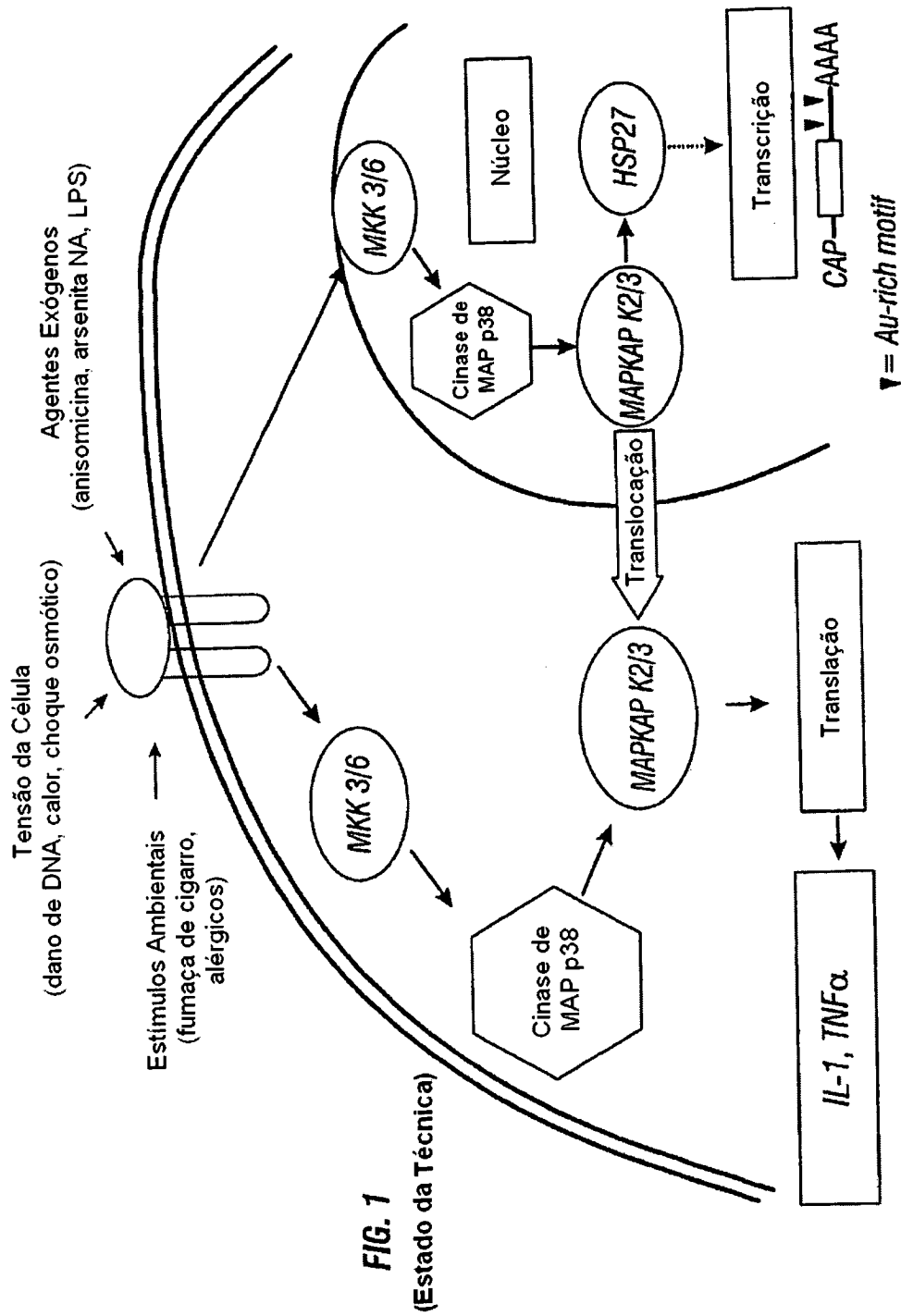
administrado ao referido paciente em uma programação selecionada a partir de: duas vezes ao dia, uma vez ao dia, uma vez a cada dois dias, três vezes por semana, duas vezes por semana e uma vez por semana.

5 89. Método, de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato da condição ser síndrome obliterosa bronquiolites.

10 90. Método, de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato da condição ser fibrose allograft crônica.

 91. Método, de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato da condição ser fibrose pulmonar idiopática.

15 92. Método, de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato da condição ser doença pulmonar obstrutiva crônica.



Pir $EC_{50} = 503 \mu M$
 5 OH $EC_{50} = 684 \mu M$
 COOH $EC_{50} = 1053 \mu M$
 5 metil éter $EC_{50} = 1107 \mu M$
 3 OH $EC_{50} = 1454 \mu M$
 4 OH $EC_{50} = 174 \mu M$

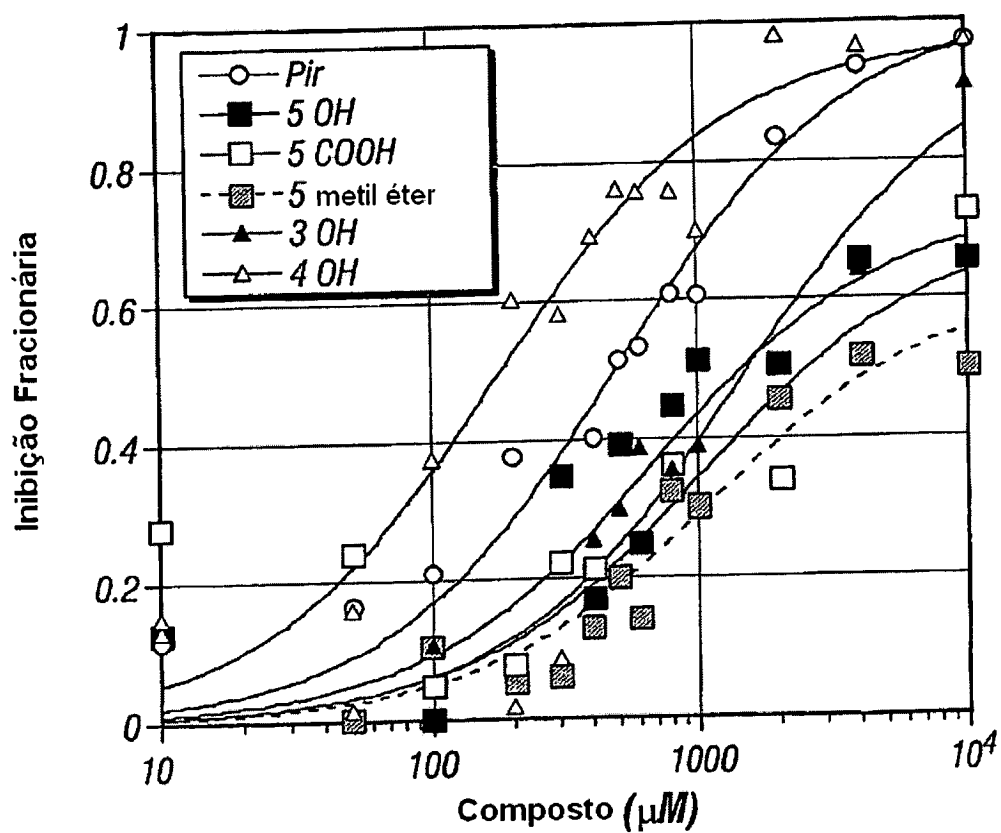


FIG. 2

$Pir EC_{50} = 462 \mu M$
 $5 OH EC_{50} = 1059 \mu M$
 $COOH EC_{50} = 986 \mu M$
 $5 \text{ metil éter } EC_{50} = 1743 \mu M$
 $3 OH EC_{50} = 1496 \mu M$
 $4 OH EC_{50} = 288 \mu M$

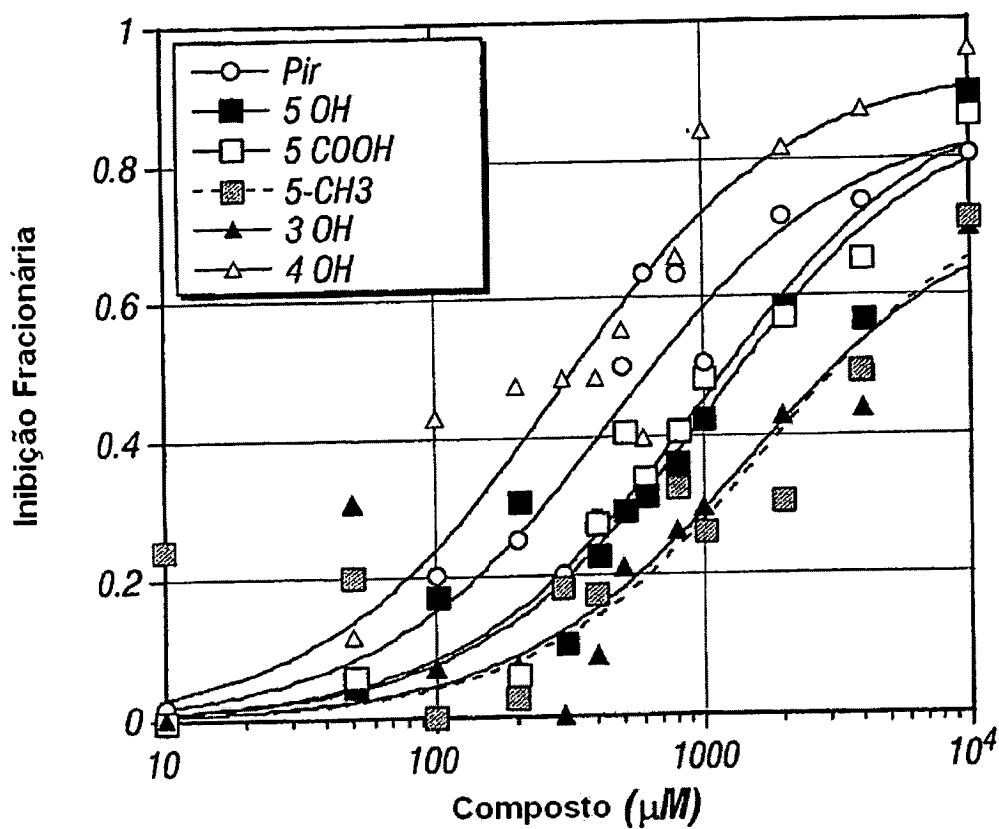


FIG. 3

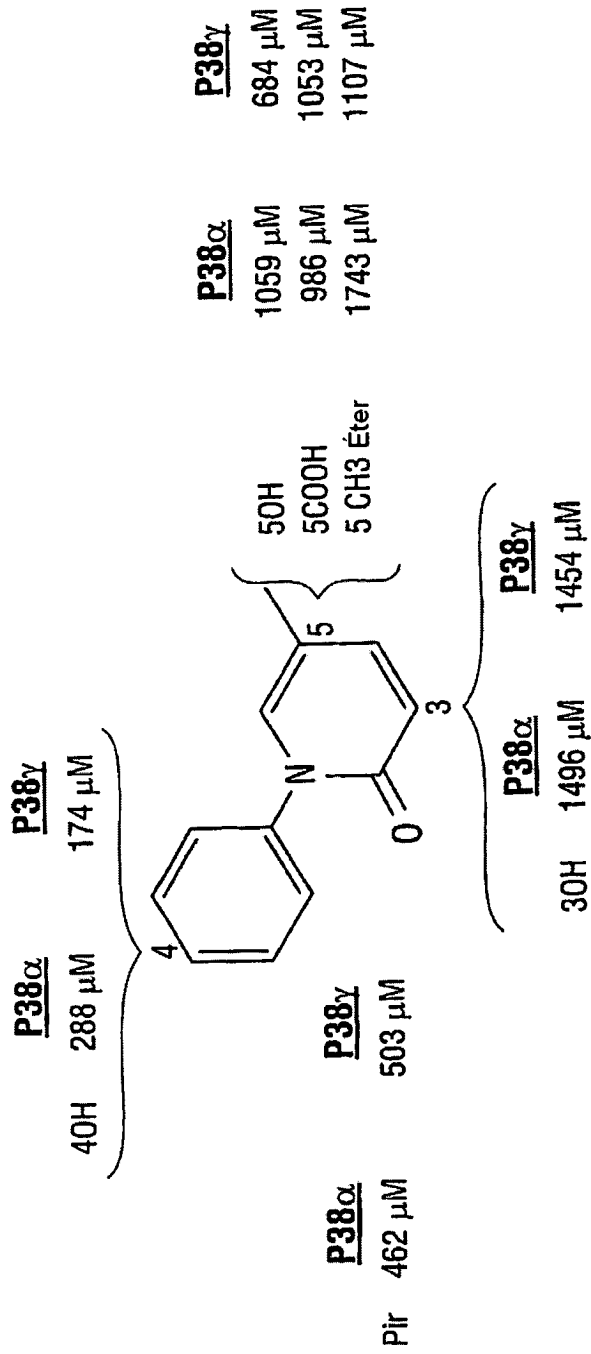
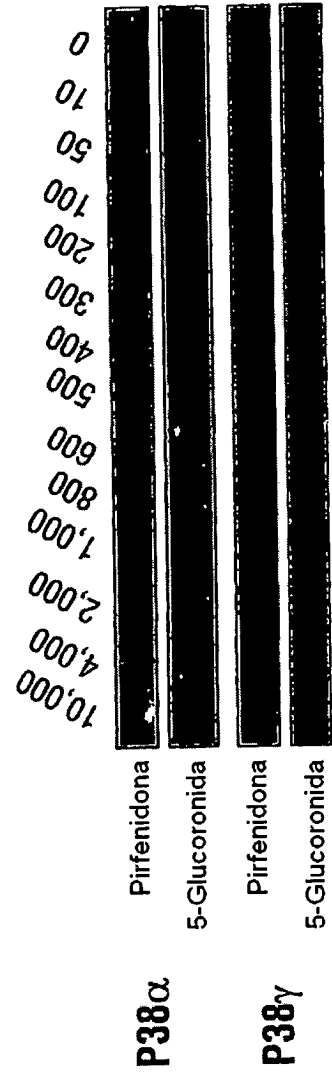
Concentração de Inibidor [μ M]

FIG. 4

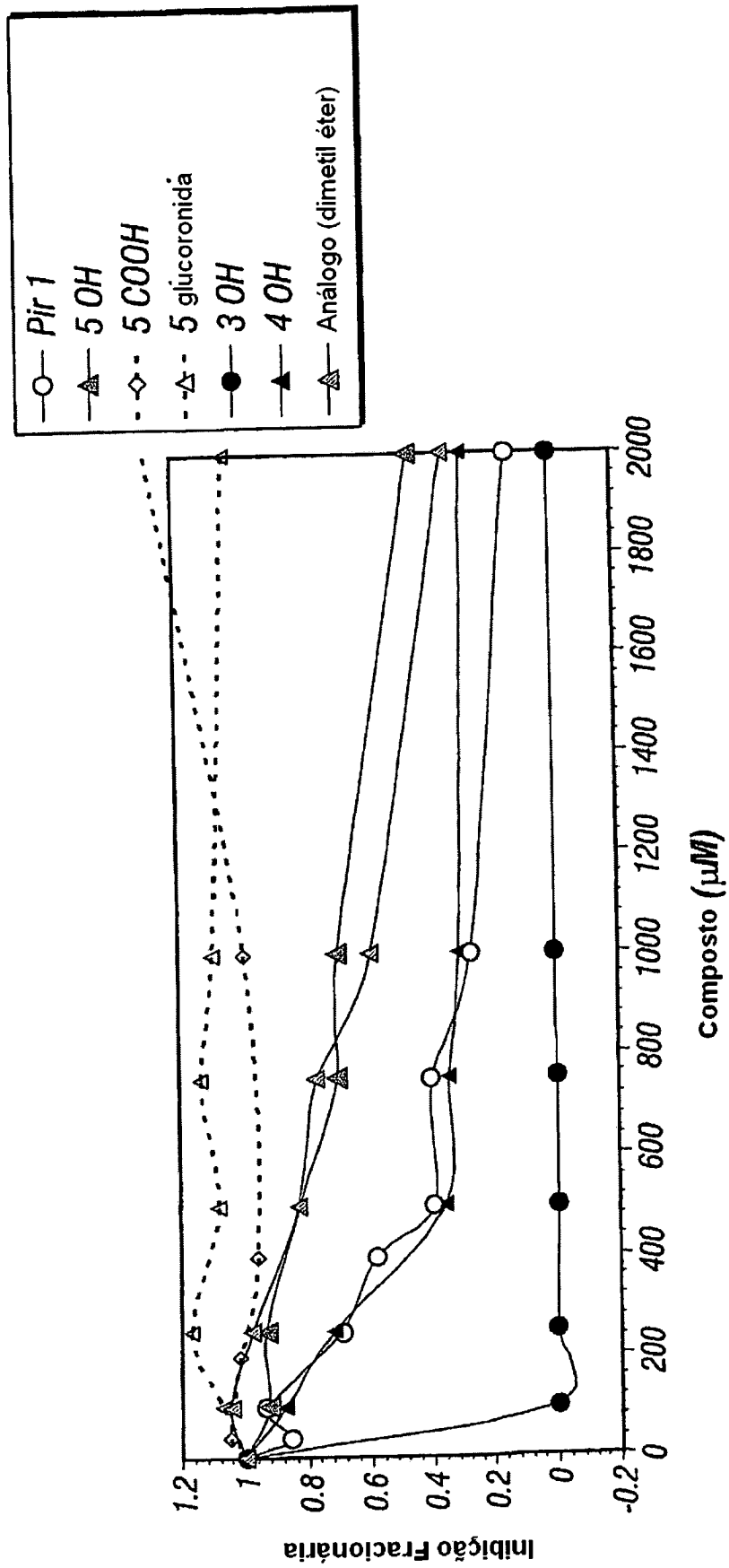


FIG. 5

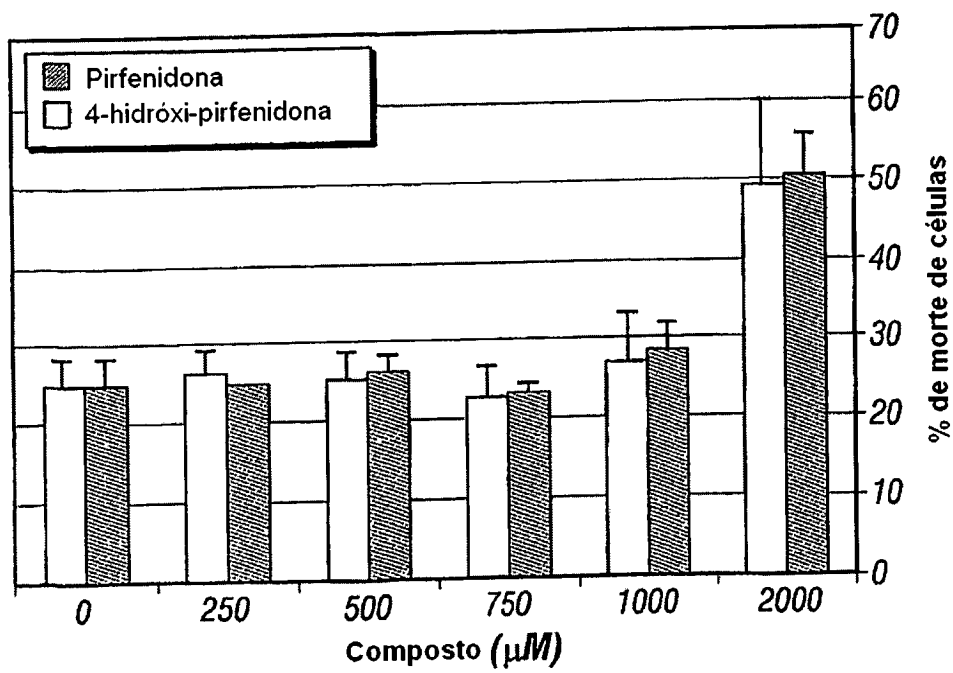
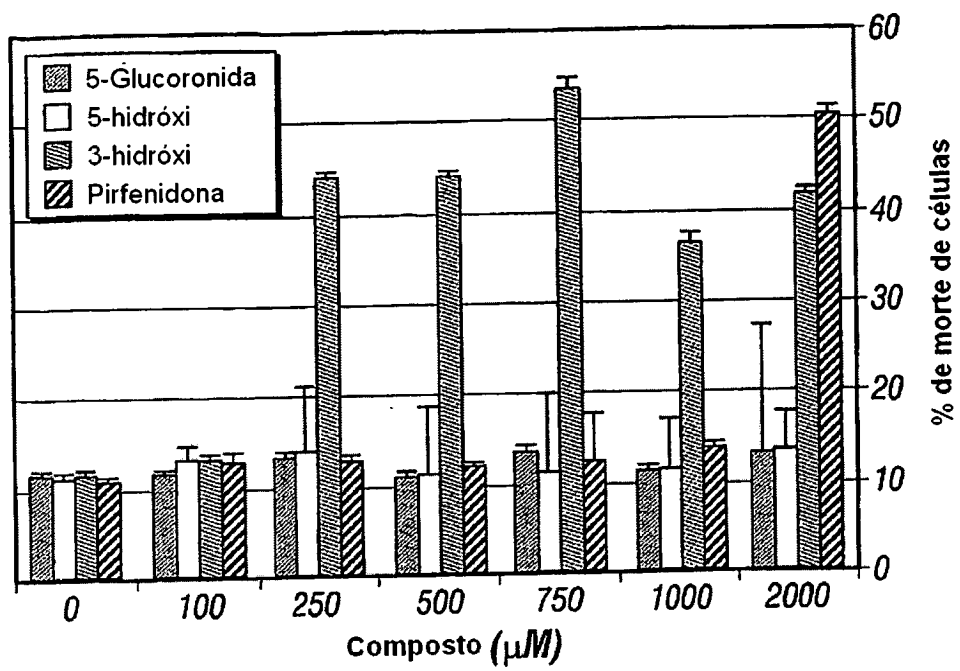


FIG. 6

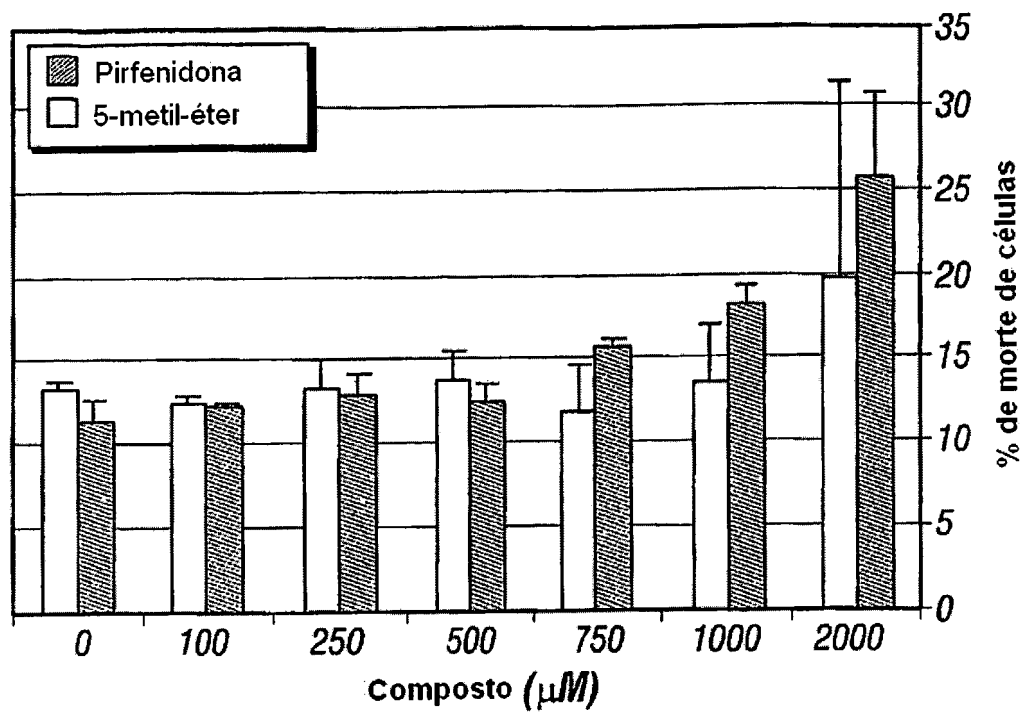


FIG. 6
(Continuação)

MÉTODO DE MODULAÇÃO DE SISTEMA DE PROTEÍNA CINASE ATIVADA
POR ESTRESSE

São apresentados métodos de modulação de um sistema de proteína cinase ativada por estresse (SAPK) com um
5 composto ativo, onde o composto ativo apresenta baixa
potência para inibição de pelo menos uma MAPK p38; e onde o
contato é realizado a uma concentração de modulação de SAPK
que está a uma baixa percentagem de concentração inibitória
para inibição de pelo menos uma MAPK p38 pelo composto. São
10 também apresentados derivados de pirfenidona. Estes
derivados podem modular um sistema de proteína cinase
ativada por estresse (SAPK).