

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 524 922**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/44** (2006.01)  
**A61K 31/4412** (2006.01)  
**A61K 31/4704** (2006.01)  
**A61P 9/00** (2006.01)  
**A61P 11/00** (2006.01)  
**A61P 13/12** (2006.01)  
**A61P 29/00** (2006.01)  
**A61P 43/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.05.2006 E 06759440 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.09.2014 EP 1928454**

54 Título: **Derivados de piridona para modular el sistema de proteína cinasa activada por estrés**

30 Prioridad:

**10.05.2005 US 679471 P**  
**01.11.2005 US 732230 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**15.12.2014**

73 Titular/es:

**INTERMUNE, INC. (100.0%)**  
**3280 BAYSHORE BOULEVARD**  
**BRISBANE, CA 94005, US**

72 Inventor/es:

**BLATT, LAWRENCE, M.;**  
**SEIWERT, SCOTT, D.;**  
**BEIGELMAN, LEONID y**  
**RADHAKRISHNAN, RAMACHANDRAN**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 524 922 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Derivados de piridona para modular el sistema de proteína cinasa activada por estrés

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere a compuestos útiles para el tratamiento de varias afecciones inflamatorias y/o afecciones fibróticas, incluyendo aquellas asociadas con actividad potenciada de cinasa p38.

10 **Antecedentes de la invención**

Se ha observado que un gran número de afecciones crónicas y agudas están asociadas con una perturbación de la respuesta inflamatoria. Un gran número de citocinas participan en esta respuesta, incluyendo IL-1, IL-6, IL-8 y TNF $\alpha$ . Parece que la actividad de estas citocinas en la regulación de la inflamación puede asociarse con la activación de una enzima de la vía de señalización celular, un miembro de la familia MAP cinasa conocido generalmente como p38, y también conocido como SAPK, CSBP y RK.

Varios inhibidores de p38, tales como NPC 31169, SB239063, SB203580, FR-167653, y pirfenidona se han ensayado *in vitro* y/o *in vivo* y se ha descubierto que son efectivos para modular respuestas inflamatorias.

Todavía hay una necesidad de fármacos seguros y efectivos para mejorar varias afecciones inflamatorias y/o afecciones fibróticas, tales como fibrosis pulmonar inflamatoria y/o fibrosis pulmonar idiopática.

25 **Sumario de la invención**

La presente invención proporciona compuestos de acuerdo con la reivindicación 1. La presente invención también proporciona compuestos para su uso en el tratamiento de afecciones fibróticas de acuerdo con la reivindicación 2.

Los compuestos de la invención pueden usarse en un método para modular un sistema de proteína cinasa activada por estrés (SAPK), que incluye poner en contacto un compuesto con una proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK), en el que el compuesto muestra un CE<sub>50</sub> en el intervalo de aproximadamente 1  $\mu$ M a aproximadamente 1000  $\mu$ M para la inhibición de al menos una MAPK p38; y en el que la puesta en contacto se lleva a cabo a una concentración moduladora de SAPK que es menor que la CE<sub>30</sub> para la inhibición de la al menos una MAPK p38 por el compuesto.

Los compuestos de la invención pueden usarse en un método para tratar o prevenir un estado de enfermedad en un sujeto, incluyendo, identificar a un sujeto en riesgo de o que tenga una afección seleccionada entre una afección inflamatoria y una afección fibrótica; administrar un compuesto al sujeto en una cantidad efectiva para tratar o prevenir la afección; en el que el compuesto muestra un CE<sub>50</sub> en el intervalo de aproximadamente 1  $\mu$ M a aproximadamente 1000  $\mu$ M para la inhibición de al menos una MAPK p38; y en el que la cantidad efectiva produce una concentración en sangre, suero u otro fluido corporal que es menor que la CE<sub>30</sub> para la inhibición de la al menos una MAPK p38.

Los compuestos de la invención pueden usarse en un método para identificar un compuesto farmacéuticamente activo, que incluye: proporcionar una biblioteca de compuestos; ensayar una pluralidad de compuestos a partir de la biblioteca para la inhibición de al menos una MAPK p38; y seleccionar al menos un compuesto a partir de la pluralidad de compuestos, en el que el compuesto seleccionado muestra una CE<sub>50</sub> en el intervalo de aproximadamente 1  $\mu$ M a aproximadamente 1000 pM para la inhibición de la al menos una MAPK p38.

Los compuestos de la invención pueden usarse en un método para identificar un compuesto farmacéuticamente activo, que incluye: proporcionar una biblioteca de compuestos; ensayar una pluralidad de compuestos a partir de la biblioteca para la inhibición de la secreción de TNF $\alpha$  en un fluido corporal *in vivo*; y seleccionar al menos un compuesto a partir de la pluralidad de compuestos, en el que el compuesto seleccionado muestra una CE<sub>50</sub> en el intervalo de aproximadamente 1  $\mu$ M a aproximadamente 1000  $\mu$ M para la inhibición de la secreción de TNF $\alpha$  en un fluido corporal *in vivo*.

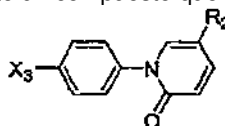
Los compuestos de la invención pueden usarse en un método para identificar un compuesto farmacéuticamente activo, que incluye: proporcionar una biblioteca de compuestos; ensayar una pluralidad de compuestos a partir de la biblioteca para la inhibición de la secreción de TNF $\alpha$  por células cultivadas *in vitro*; y seleccionar al menos un compuesto a partir de la pluralidad de compuestos, en el que el compuesto seleccionado muestra una CE<sub>50</sub> en el intervalo de aproximadamente 1  $\mu$ M a aproximadamente 1000  $\mu$ M para la inhibición de la secreción de TNF $\alpha$  por células cultivadas *in vitro*.

Los compuestos de la invención pueden usarse en un método para identificar un compuesto farmacéuticamente activo, que incluye: proporcionar una biblioteca de compuestos; ensayar una pluralidad de compuestos a partir de la biblioteca para la inhibición de la secreción de TNF $\alpha$  en un fluido corporal *in vivo*; y seleccionar al menos un compuesto a partir de la pluralidad de compuestos, en el que el compuesto seleccionado muestra una CE<sub>50</sub> en el intervalo de

aproximadamente 1  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 1000  $\mu\text{M}$  para la inhibición de la secreción de  $\text{TNF}\alpha$  por células cultivadas *in vitro*.

En el presente documento se describe un método para identificar un compuesto farmacéuticamente activo, que incluye: proporcionar una biblioteca de compuestos; ensayar una pluralidad de compuestos a partir de la biblioteca para la inhibición de la secreción de  $\text{TNF}\alpha$  por células cultivadas *in vitro*; y seleccionar al menos un compuesto a partir de la pluralidad de compuestos, en el que el compuesto seleccionado muestra una  $\text{CE}_{50}$  en el intervalo de aproximadamente 1  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 1000  $\mu\text{M}$  para la inhibición de la secreción de  $\text{TNF}\alpha$  en un fluido corporal *in vitro*.

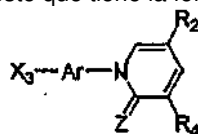
También se describen en el presente documento un compuesto que tiene la fórmula del Subgénero III:



**Subgénero III;**

En la que  $X_3$  se selecciona entre el grupo que consiste en H, F, y OH; y  $R_2$  se selecciona entre el grupo que consiste en H y  $\text{CF}_3$ ; y en la que el compuesto presenta un valor de  $\text{IBC}_{50}$  en el intervalo de aproximadamente 1  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 1000  $\mu\text{M}$  para la inhibición de MAPK de p38; o una sal farmacéuticamente aceptable, éster, solvato o profármaco del compuesto.

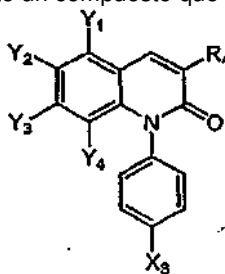
Se describe en el presente documento un compuesto que tiene la fórmula del Género VI:



**Género VI**

En la que Ar es piridinilo o fenilo; Z es O o S;  $X_3$  es H, F, Cl, OH, o  $\text{OCH}_3$ ;  $R_2$  es metilo,  $\text{C}(=\text{O})\text{H}$ ,  $\text{C}(-\text{O})\text{CH}_3$ ,  $\text{C}(=\text{O})\text{O}$ -glucosilo, fluorometoxilo, difluorometilo, trifluorometilo, metilmetoxilo, metilhidroxilo, o fenilo; y  $R_4$  es H o hidroxilo; con la condición de que cuando  $R_2$  es trifluorometilo Z es O,  $R_4$  es H y Ar es fenilo, el fenilo no está únicamente sustituido en la posición 4' por H, F, u OH; en la que el compuesto presenta un valor de  $\text{CE}_{50}$  en el intervalo de aproximadamente 1  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 1000  $\mu\text{M}$  para la inhibición de MAPK de p38; o una sal farmacéuticamente aceptable, éster, solvato o profármaco del compuesto.

También se describen en el presente documento un compuesto que tiene la fórmula del Género VII:



**Género VII**

En la que  $X_3$  es H, halógeno, alcoxi  $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ , u OH;  $Y_1$ ,  $Y_2$ ,  $Y_3$ , y  $R_4$  se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en H, alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ , alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_{10}$  sustituido, alqueno  $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ , haloalquilo  $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ , nitroalquilo  $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ , tioalquilo  $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ , hidroxialquilo  $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ , alcoxi  $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ , fenilo, fenilo sustituido, halógeno, hidroxilo, alcóxialquilo  $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ , carboxi  $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ , alcóxicarbonilo  $\text{C}_1\text{-C}_{40}$ ,  $R_4$  es H, halógeno, u OH; y en la que el compuesto presenta un valor de  $\text{CE}_{50}$  en el intervalo de aproximadamente 1  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 1000  $\mu\text{M}$  para la inhibición de MAPK de p38; o una sal farmacéuticamente aceptable, éster, solvato o profármaco de los compuestos.

Una realización adicional de la presente invención es una composición farmacéutica que contiene un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Estas y otras realizaciones se describen con mayor detalle a continuación.

## Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una representación esquemática de la cascada de señalización de MAPK p38 (técnica anterior, Figura 1 de Underwood et al., 2001 Prog Respir Res 31:342-345). Este esquema muestra la activación de la cascada de señalización de p38 por varios estímulos y los efectos cadena abajo de la activación de p38 en una respuesta inflamatoria a través de la activación transcripcional y traduccional/estabilización de ARNm.

La Figura 2 es una representación que muestra la inhibición fraccional de p38 $\gamma$  por varios metabolitos y análogos de pirfenidona en función de la concentración de los compuestos. Las concentraciones CE<sub>50</sub> de estos compuestos se muestran a la derecha de la representación. Se puede encontrar una descripción detallada del ensayo en el Ejemplo 5.

La Figura 3 es una representación que muestra la inhibición fraccional de p38 $\alpha$  por varios metabolitos y análogos de pirfenidona en función de la concentración de los compuestos. Las concentraciones CE<sub>50</sub> de estos compuestos se muestran a la derecha de la representación. Se puede encontrar una descripción detallada del ensayo en el Ejemplo 5.

La Figura 4 es un resumen de los datos bioquímicos para varios metabolitos y análogos de pirfenidona. Los metabolitos y análogos de pirfenidona citados en las Figuras 2, 3, 5, y 6 se describen mediante el patrón de sustitución mostrado en la Figura 4. El resumen muestra el efecto de sustituciones en tres posiciones sobre las concentraciones CE<sub>50</sub> para la inhibición de p38 $\alpha$  y p38 $\gamma$ .

La Figura 5 es una representación que muestra la actividad fraccional (liberación de TNF $\alpha$  por macrófagos en respuesta a LPS) de varios metabolitos y análogos de pirfenidona en función de la concentración de cada compuesto. Se puede encontrar una descripción detallada del ensayo en el Ejemplo 5.

La Figura 6 es una serie de diagramas de barras que muestran la citotoxicidad de varios metabolitos y análogos de pirfenidona a varias concentraciones de los compuestos. La citotoxicidad se determinó midiendo la liberación de LDH después de la incubación de células en presencia del compuesto. La cantidad de LDH liberado se normaliza con el liberado tras el tratamiento con Triton-X-100 y se representa frente a la concentración de compuesto.

## Descripción detallada de las realizaciones preferidas

Se ha descubierto que puede lograrse un alto efecto terapéutico para tratar varios trastornos asociados con la actividad potenciada de la cinasa p38 usando un compuesto inhibidor de cinasa p38 de relativamente baja potencia. La presente invención proporciona compuestos de acuerdo con la reivindicación 1. La presente invención también proporciona compuestos para su uso en el tratamiento de afecciones fibróticas de acuerdo con la reivindicación 2.

Los compuestos de la invención pueden usarse en un método para modular un sistema de cinasa activada por estrés (SAPK) poniendo en contacto un compuesto con una proteína cinasa p38 activada por mitógeno (MAPK). Un compuesto preferido muestra una CE<sub>50</sub> en el intervalo de aproximadamente 1  $\mu$ M a aproximadamente 1000  $\mu$ M, preferentemente, de aproximadamente 50  $\mu$ M a aproximadamente 650  $\mu$ M para la inhibición de al menos una MAPK p38. La concentración a la cual el compuesto es puesto en contacto con la MAPK p38 es generalmente menor que la CE<sub>30</sub> para la inhibición de la p38 por este compuesto. Preferentemente, la concentración es menor que la CE<sub>20</sub>, incluso más preferentemente, la concentración es menor que la CE<sub>10</sub>.

Las "proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK)" son serina/treonina cinasas conservadas a lo largo de la evolución involucradas en la regulación de varios eventos celulares. Se han identificado varios grupos de MAPK en células de mamífero, incluyendo cinasas reguladas por señales extracelulares (BRK), p38, y SAPK/JNK. Se cree que las MAPK se activan por sus MAPK cinasas específicas (MAPKK): ERK por MEK1 y MEK2, p38 por MKK3 y MKK6, y SAPK/JNK por SEK1 (también conocida como MKK4) y MKK7 (SEK2). Las MAPKK también pueden activarse por varias MAPKK cinasas (MAPKKK), tales como Raf, MLK, MEKK1, TAK1, y ASK1.

Se cree que la red de MAPK incluye al menos doce treonina quinasas dirigidas a prolina clonadas elevadamente conservadas las cuales, cuando se activan por estreses celulares (estrés oxidativo, daño en ADN, choque por calor u osmótico, irradiación ultravioleta, isquemia-reperfusión), agentes exógenos (anisomicina, arsenito de Na, lipopolisacárido, LPS) o citocinas proinflamatorias, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , pueden fosforilar y activar otras cinasas o proteínas celulares, tales como factores de transcripción, tanto en el citoplasma como en el núcleo (FIG. 1).

### MAPK p38

Como se usa en el presente documento, "MAPK p38" es un miembro de la familia de proteínas cinasas activadas por estrés, que incluye al menos 4 isoformas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ), varias de las cuales se consideran importantes en procesos críticos para la respuesta inflamatoria y remodelado tisular (Lee et al., 2000 Immunopharmacol. 47:185-201). Las cinasas predominantes en monocitos y macrófagos, p38 $\alpha$  y p38 $\beta$ , parecen estar más ampliamente expresadas en comparación con p38 $\gamma$  (músculo esquelético) o p38 $\delta$  (testículos, páncreas, próstata, intestino delgado, y en la glándula salival, pituitaria y adrenal). La isoforma p38 $\gamma$  se expresa en miofibroblastos, que tienen algunas similitudes fenotípicas con células musculares, incluyendo la expresión de actina de músculo liso alfa. Se han identificado un número de sustratos de MAP cinasa p38 incluyendo otras cinasas (MAPKAP K2/3, PRAK, MNK 1/2, MSK1/RLPK, RSK-B), factores de transcripción (ATF2/6, factor potenciador de miocitos 2, factor de transcripción nuclear- $\beta$ , CHOP/GADD153, Elk1 y SAP-1A1) y proteínas citosólicas (estatmina), muchas de las cuales son fisiológicamente

importantes.

Jiang, Y. et al., 1996 J Biol Chem 271:17920-17926 comunicó la caracterización de p38 $\beta$  como una proteína de 372 aminoácidos estrechamente relacionada con p38- $\alpha$ . Tanto p38 $\alpha$  como p38 $\beta$  se activan por citocinas proinflamatorias y estreses ambientales, p38 $\beta$  se activa preferentemente por MAP cinasa cinasa-6 (MKK6) y fosforila preferentemente al factor de transcripción 2 (ATF2) activado. Kumar, S. et al., 1997 Biochem Biophys Res Comm 235:533-538 y Stein, B. et al., 1997 J Biol Chem 272:19509-19517 comunicaron una segunda isoforma de p38 $\beta$ , p-38 $\beta$ 2, que contiene 364 aminoácidos con una identidad del 73 % con p38 $\alpha$ . Se cree que p38 $\beta$  se activa por citocinas proinflamatorias y estreses ambientales, aunque la segunda isoforma de p38 $\beta$  comunicada, p38 $\beta$ 2, parece expresarse preferentemente en el sistema nervioso central (SNC), músculo cardíaco y esquelético, en comparación con la expresión tisular más ubicua de p38 $\alpha$ . Además, se cree que el factor de transcripción-2 (ATF-2) activado es un sustrato mejor para p38 $\beta$ 2 que para p38 $\alpha$ .

La identificación de p38 $\gamma$  se comunicó por Li, Z. et al. 1996 Biochem Biophys Res Comm 228:334-340 y la de p38 $\delta$  por Wang, X. et al. 1997 J Biol Chem 272:23668-23674 y por Kumar, S. et al., 1997 Biochem Biophys Res Comm 235:533-538. Estas dos isoformas de p38 ( $\gamma$  y  $\delta$ ) representan un subconjunto único de la familia de MAPK basándose en sus patrones de expresión tisulares, de utilización de sustrato, respuesta a estímulos directos e indirectos, y susceptibilidad a inhibidores de cinasas. Basándose en la conservación de secuencia primaria, p38 $\alpha$  y  $\beta$  están estrechamente relacionados, pero difieren de  $\gamma$  y  $\delta$ , que están más estrechamente relacionados entre sí.

Normalmente, la vía de MAP cinasa p38 está activada directa o indirectamente por receptores de la superficie celular, tales como tirosinas cinasas receptoras, quimiocinas o receptores acoplados a proteína G, que se han activado por un ligando específico, por ejemplo, citocinas, quimiocinas o lipopolisacárido (LPS) uniéndose a un receptor afín. Posteriormente, una MAP cinasa p38 se activa por fosforilación en restos específicos de treonina y tirosina. Después de la activación, una MAP cinasa p38 puede fosforilar otras proteínas intracelulares, incluyendo proteínas cinasas, y puede traslocarse al núcleo celular, donde fosforila y activa factores de transcripción que conducen a la expresión de citocinas proinflamatorias y otras proteínas que contribuyen a la respuesta inflamatoria, adhesión celular, y degradación proteolítica. Por ejemplo, en células de linaje mieloide, tales como macrófagos y monocitos, tanto IL-1 $\beta$  como TNF $\alpha$  se transcriben en respuesta a la activación de p38. La traducción y secreción posterior de estas y otras citocinas inicia una respuesta inflamatoria local o sistémica en tejido adyacente y a través de la infiltración de leucocitos. Mientras que esta respuesta es una parte normal de las respuestas fisiológicas al estrés celular, el estrés celular agudo o crónico conduce al exceso, desregulación, o exceso y desregulación de la expresión de citocinas proinflamatorias. Esto, a su vez, conduce a un daño tisular, que a menudo da como resultado dolor y debilitamiento.

En macrófagos alveolares, la inhibición de cinasas p38 con el inhibidor de p38, SB203580, reduce los productos génicos de citocinas. Se cree que las citocinas inflamatorias (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5) y las quimiocinas (IL-8, RANTES, eotaxina) son capaces de regular o mantener la inflamación crónica de las vías aéreas. La producción y acción de muchos de los mediadores potenciales de la inflamación de las vías aéreas parece ser dependiente del sistema de MAP cinasa activada por estrés (SAPK) o de la cascada de cinasa p38 (Underwood et al., 2001 Prog Respir Res 31:342-345). La activación de la vía de la cinasa p38 por numerosos estímulos ambientales da como resultado la elaboración de mediadores inflamatorios reconocidos cuya producción se considera que está regulada traduccionalmente. Además, varios mediadores activan MAPK p38 que pueden a continuación activar dianas cadena abajo del sistema MAPK incluyendo otras cinasas o factores de transcripción, por lo tanto creando el potencial para un proceso inflamatorio amplificado en el pulmón.

#### Sustratos cadena abajo del grupo p38 de cinasas MAP

Sustratos proteína cinasa de p38 $\alpha$  o p38 $\beta$ : La proteína cinasa activada por MAP cinasa 2 (MAPKAPK2 o M2), proteína cinasa de interacción con MAP cinasa (MNK1), cinasa regulada/activada por p38 (PRAK), cinasa activada por mitógeno y estrés (MSK: RSK-B o RLPK).

Factores de transcripción activados por p38: factor de transcripción activador (ATF)-1,2 y 6, proteína accesoria de SRF 1 (Sap 1), CHOP (gen 153 inducible por daño en el ADN de detención del crecimiento, o GADD153), p53, C/EBP $\beta$ , factor potenciador de miocitos 2C (MEF2C), MEF2A, MITF1, DDIT3, ELK1, NFAT, y la proteína grupo-box de alta movilidad (HBP1).

Otros tipos de sustratos para p38: cPLA2, intercambiador de Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> isoforma-1, tau, queratina 8, y estatmina.

Genes regulados por la vía de p38: c-jun, c-fos, junB, IL-1, TNF, IL-6, IL-8, MCP-1, VCAM-1, iNOS, PPAR $\gamma$ , ciclooxigenasa (COX)-2, collagenasa-1 (MMP-1), collagenasa-3 (MMP-13), HIV-LTR, Fgl-2, péptido natriurético del cerebro (BNP), CD23, CCK, fosfoenolpiruvato carboxi-cinasa-citosólica, ciclina D1, receptor de LDL (Ono et al., 2000 Cellular Signalling 12:1-13).

## Consecuencias biológicas de la activación de p38

### p38 en inflamación

- 5 Se cree que la inflamación aguda y crónica es crucial para la patogénesis de muchas enfermedades, tales como artritis reumatoide, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y síndrome del distrés respiratorio agudo (SRDA). La activación de la vía de p38 puede jugar un papel central en: (1) producción de citocinas proinflamatorias, tales como EL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6; (2) la inducción de encimas, tales como COX-2, que controla el remodelado del tejido conectivo en afecciones patológicas; (3) la expresión de una enzima intracelular, tal como iNOS, que regula la oxidación; (4) la inducción de proteínas adherentes, tales como VCAM-1 y muchas otras moléculas inflamatorias relacionadas. Además de estas, la vía de p38 puede jugar un papel regulado en la proliferación y diferenciación de células del sistema inmunitario. p38 puede participar en la proliferación y/o diferenciación celular inducida por GM-CSF, CSF, EPO y CD40.
- 10
- 15 El papel de la vía de p38 en enfermedades relacionadas con la inflamación se estudió en varios modelos animales. La inhibición de p38 por SB203580 redujo la mortalidad en un modelo murino de choque inducido por endotoxina e inhibió el desarrollo de artritis inducida por colágeno en ratón y de artritis adyuvante en ratas. Un estudio reciente demostró que SB220025, que es un inhibidor más potente de p38, causó una disminución significativa en la densidad vascular del granuloma de manera dependiente de la dosis. Estos resultados indican que p38, o los componentes de la vía de p38 pueden ser una diana terapéutica para enfermedades inflamatorias.
- 20

### p38 y apoptosis

- 25 Parece ser que la activación concomitante de p38 y la apoptosis están inducidas por varios agentes, tales como la privación de NGF y ligación de Fas. Las proteasas de cisteína (caspasas) son cruciales para la vía apoptótica, y se expresan como zimógenos inactivos. Los inhibidores de caspasa pueden por tanto bloquear la activación de p38 a través de la reticulación de Fas. Sin embargo, la sobreexpresión de MKK6b activo dominante también puede inducir la actividad de caspasa y la muerte celular. El papel de p38 en la apoptosis es dependiente del tipo celular y de los estímulos. Aunque se ha demostrado que la señalización de p38 promueve la muerte celular en algunas líneas celulares, se ha demostrado que p38 potencia la supervivencia celular, crecimiento celular y la diferenciación en diferentes líneas celulares.
- 30

### p38 en el ciclo celular

- 35 La sobreexpresión de p38 $\alpha$  en levaduras condice a una disminución significativa de la proliferación celular, lo que demuestra la implicación de p38 $\alpha$  en el crecimiento celular. Una proliferación celular más lenta de células de mamífero cultivadas se observó cuando las células se trataron con un inhibidor de p38 $\alpha/\beta$ , SB203580.

### p38 e hipertrofia de cardiomiocitos

- 40 Se ha estudiado la activación y función de p38 en la hipertrofia de cardiomiocitos. Durante la progresión de la hipertrofia, los niveles tanto de p38 $\alpha$  como de p38 $\beta$  se aumentaron y se potenciaron las respuestas hipertróficas suscitadas por MKK3 constitutivamente activo y MKK6 por la organización sarcomérica y factor de expresión natriurético atrial elevado. Asimismo, la señalización reducida de p38 en el corazón promueve la diferenciación de miocitos a través de un mecanismo que incluye la señalización de calcineurina-NFAT.
- 45

### p38 y desarrollo

- 50 A pesar de la no viabilidad de ratones *knockout* para p38, existen pruebas referentes al papel diferencial de p38 en el desarrollo. Se ha relacionado a p38 con la angiogénesis placentaria pero no con el desarrollo cardiovascular en varios estudios. Además, también se ha relacionado a p38 con la expresión de eritropoyetina, lo que sugiere un papel en la eritropoyesis. Se ha implicado recientemente a PRAK en el desarrollo celular en implantes murinos. El ARNm de PRAK, así como isoformas de p38, se encontró expresado a lo largo del desarrollo del blastocisto.

### p38 y diferenciación celular

- 55 Se encontró que p38 $\alpha$  y/o p38 $\beta$  juegan un papel importante en la diferenciación celular para varios tipos celulares diferentes. La diferenciación de células 3T3-L1 en adipocitos y la diferenciación de células PC12 en neuronas necesitan p38 $\alpha$  y/o  $\beta$ . Se encontró que la vía de p38 es necesaria y suficiente para la diferenciación de SKT6 en células hemoglobinizadas así como en la diferenciación de C2C12 en miotúbulos.
- 60

### p38 en la senescencia y supresión tumoral

- 65 p38 tiene un papel en la tumorigénesis y en la senescencia. Ha habido informes acerca de que la activación de MKK6 y MKK3 conducen a un fenotipo senescente dependiente de la actividad de MAPK p38. Asimismo, la actividad de MAPK p38 se demostró responsable de la senescencia en respuesta al acortamiento de telómeros, exposición a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,

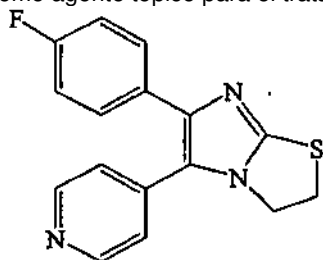
y señalización de RAS de oncogén crónica. Una característica común de las células tumorales es una pérdida de senescencia y p38 está relacionado con la tumorigénesis en determinadas células. Se ha comunicado que la activación de p38 está reducida en tumores y que la pérdida de componentes de la vía de p38, tales como MKK3 y MKK6 dio como resultado en una proliferación aumentada y una probabilidad de conversión tumorigénica independientemente de la línea celular o del agente de inducción tumoral usados en estos estudios.

#### Inhibidores de MAP cinasa p38

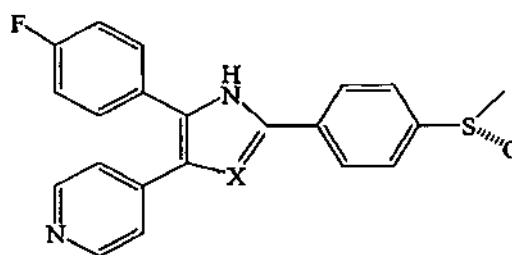
Un "inhibidor de MAPK p38" es un compuesto que inhibe la actividad de p38. Los efectos inhibidores de un compuesto sobre la actividad de p38 pueden medirse mediante varios métodos bien conocidos para un experto en la técnica. Por ejemplo, los efectos inhibidores pueden medirse midiendo el nivel de inhibición de producción de citocina estimulada por lipopolisacárido (LPS) (Lee et al., 1988 Int J Immunopharmacol 10:835-843; Lee et al. 1993 Ann NY Acad Sci 696:149-170; Lee et al. 1994 Nature 372:739-746; Lee et al. 1999 Pharmacol Ther 82:389-397).

Los esfuerzos para desarrollar inhibidores de MAPK p38 se han enfocado en aumentar la potencia. Se descubrió que SB203580 y otros 2,4,5-triaril imidazoles son inhibidores potentes de cinasa p38 con valores de  $CE_{50}$  en el intervalo nanomolar. Por ejemplo, se descubrió que para SB203580 el valor de  $CE_{50}$  era 48 nM. Los piridinilimidazoles SKF 86002 (**P1**) y SB203582 (**P2**) mostrados a continuación se han usado como plantilla para la mayoría de los inhibidores de p38. Publicaciones recientes (Lee et al. 2000 Immunopharmacology 47:185-201) han divulgado los inhibidores de p38 (**P3**- **P6**) mostrados a continuación. Entre estos inhibidores, resulta destacable la relativamente elevada potencia y selectividad descrita para el compuesto **P4** (p38  $CE_{50}$  = 0,19 nM) y la inhibición de la angiogénesis a causa de inflamación por SB 220025 (**P6**).

Dos inhibidores de p38 que se ha comunicado que están en desarrollo clínico son HEP689 (**P7**) y VX-745 (**P8**). Se ha comunicado que VX-745 está en ensayos de Fase II para artritis reumatoide. Se ha divulgado una potente actividad antiinflamatoria tópica para HRP689, que según se ha comunicado, ha entrado en desarrollo clínico para explorar su potencial como agente tópico para el tratamiento de psoriasis y otros trastornos de la piel.

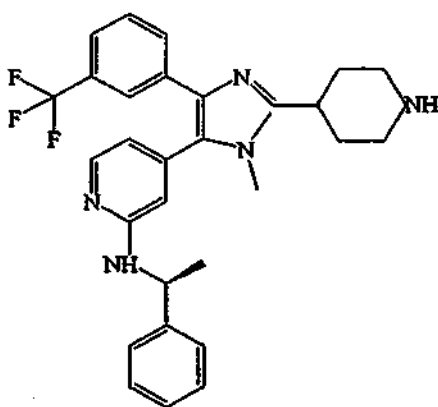


**P1** SK&F 86002

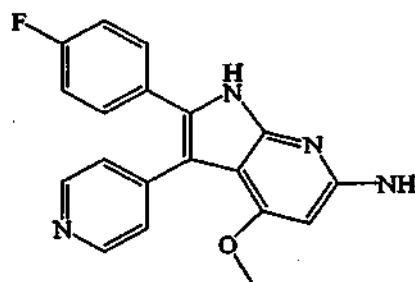


**P2** X = N; SB 203580

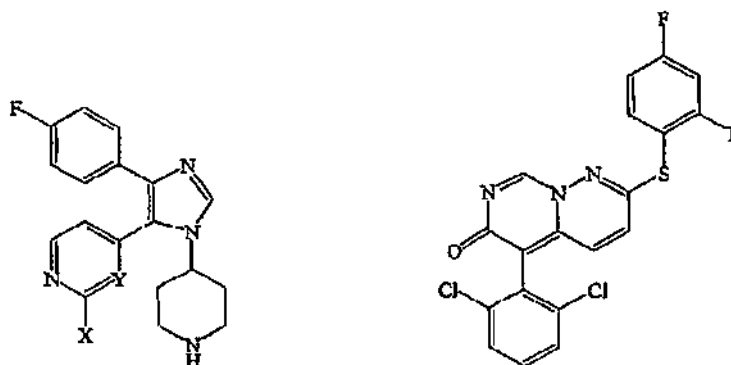
**P3** X = CH; L-167307



**P4**



**P5** RWJ 68354



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

P8 VX-745

P7 X = HN<sub>2</sub>, Y = N; SB 220025

Se puede encontrar una discusión adicional de varios inhibidores de p38 en Boehm et al., 2000 Exp Opin Ther Pat 10:25-37; y Salituro et al., 1999 Curr Med Chem 6:807-823.

Los inhibidores de p38 preferidos descritos en el presente documento son derivados y análogos pirfenidona que muestran relativamente baja potencia de inhibición de p38, mientras que de manera sorprendente, aún mantienen un efecto terapéutico relativamente alto (por ejemplo, para modular un sistema SAPK) como resultado de dicha inhibición. Preferentemente, los inhibidores de p38 de las realizaciones muestran un CE<sub>50</sub> en el intervalo de aproximadamente 1 μM y aproximadamente 1000 μM, preferentemente, de aproximadamente 50 μM a aproximadamente 650 μM para la inhibición de MAPK p38.

#### DERIVADOS Y ANÁLOGOS DE PIRFENIDONA

La pirfenidona (5-metil-1-fenil-2-(1H)-piridona) en sí misma es un compuesto conocido y sus efectos farmacológicos se divulgan, por ejemplo, en las Solicitudes de Patente de Japón KOKAI (abiertas) N° 87677/1974 y 1284338/1976. La patente de Estados Unidos N° 3.839.346, publicada el 1 de octubre de 1974; Patente de los Estados Unidos N° 3.974.281, publicada el 10 de agosto de 1976; Patente de los Estados Unidos N° 4.042.699, publicada el 16 de agosto de 1977; y la Patente de los Estados Unidos N° 4.052.509, publicada el 4 de octubre de 1977, describen métodos de fabricación de 5-metil-1-fenil-2-(1H)-piridona y su uso como agente antiinflamatorio.

La pirfenidona y sus derivados son compuestos útiles para modular el sistema de proteína cinasa activada por estrés (SAPK).

El término "alquilo" utilizado en el presente documento se refiere a un radical monovalente saturado lineal o ramificado que contiene de uno a diez átomos de carbono, incluyendo, pero sin limitación, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, terc-butilo, n-hexilo, y similares.

El término "alquenilo" utilizado en el presente documento se refiere a un radical monovalente saturado lineal o ramificado que contiene de dos a diez átomos de carbono que contiene un doble enlace de carbono que incluye, pero sin limitación, 1-propenilo, 2-propenilo, 2-metil-1-propenilo, 1-butenilo, 2-butenilo, y similares.

El término "halógeno" utilizado en el presente documento se refiere a flúor, cloro, bromo, o yodo.

El término "haloalquilo" utilizado en el presente documento se refiere a uno o más grupos halógeno unidos a un radical alquilo.

El término "nitroalquilo" utilizado en el presente documento se refiere a uno o más grupos nitro unidos a un radical alquilo.

El término "tioalquilo" utilizado en el presente documento se refiere a uno o más grupos tio unidos a un radical alquilo.

El término "hidroxialquilo" utilizado en el presente documento se refiere a uno o más grupos hidroxilo unidos a un radical alquilo.

El término "alcoxi" utilizado en el presente documento se refiere a un radical alquilo lineal o ramificado unido de forma covalente a la molécula progenitora mediante una unión --O--. Los ejemplos de grupos alcoxi incluyen, pero no se limitan a, metoxi, etoxi, propoxi, isopropoxi, butoxi, n-butoxi, sec-butoxi, t-butoxi y similares.

El término "alcoxialquilo" utilizado en el presente documento se refiere a uno o más grupos alcoxi unidos a un radical alquilo.



El término "carboxi" utilizado en el presente documento se refiere a -COOH unido opcionalmente a un grupo alquilo. Los ejemplos de grupos carboxi incluyen, pero sin limitación, -COOH, -CH<sub>2</sub>COOH, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH, -CH(COOH)(CH<sub>3</sub>), y similares.

- 5 El término "alcoxicarbonilo" se refiere a -(CO)-O-alquilo. Los ejemplos de grupos alcoxicarbonilo incluyen, pero no se limitan a, grupo metoxycarbonilo, grupo etoxycarbonilo, grupo propoxycarbonilo, y similares.

Los hidratos de carbono son aldehídos o cetonas polihidroxilados, o bien sustancias que proporcionan dichos compuestos tras hidrólisis. Los hidratos de carbono comprenden los elementos carbono (C), hidrógeno (H) y oxígeno (O) con una relación de hidrógeno que es dos veces el carbono y el oxígeno.

En su forma básica, los hidratos de carbono son azúcares simples o monosacáridos. Estos azúcares simples pueden combinarse entre sí para formar hidratos de carbono más complejos. La combinación de dos azúcares sencillos es un disacárido. Los hidratos de carbono que consisten de dos a diez azúcares sencillos se llaman oligosacáridos, y aquellos con un número mayor se llaman polisacáridos.

El término "uronida" se refiere a un monosacárido que tiene un grupo carboxilo (-COOH) en el carbono que no es parte del anillo. El nombre unronida mantiene la raíz de monosacárido, pero el sufijo -osa de los azúcares se cambia a -uronida. Por ejemplo, la estructura de glucurónido se corresponde a glucosa.

Como se usa en el presente documento, un radical indica una especie que tiene un único electrón desaparejado de forma que la especie que contiene el radical se puede unir covalentemente a otra especie. De este modo, en este contexto, un radical no es necesariamente un radical libre. En su lugar, un radical indica una parte específica de una molécula mayor. El término "radical" puede usarse de forma indistinta con el término "grupo".

Como se usa en el presente documento, un grupo sustituido se deriva de la estructura progenitora no sustituida en que se ha producido el intercambio de uno o más átomos de hidrógeno por otro átomo o grupo. Cuando están sustituidos, el grupo o grupos sustituyentes son uno o más grupo(s) seleccionado(s) de forma independiente e individual entre alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, cicloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, arilo, arilo condensado, heterociclilo, heteroarilo, hidroxi, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, ariloxi, mercapto, alquiltio C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, ariltio, ciano, halógeno, carbonilo, tiocarbonilo, alcoxicarbonilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, nitro, sililo, trihalometanosulfonilo, trifluorometilo, y amino, incluyendo grupos amino mono y disustituidos, y sus derivados protegidos. Los grupos protectores que pueden formar los derivados protectores de todos los sustituyentes anteriores son conocidos de los expertos en la materia y se pueden encontrar en referencias tales como Greene y Wuts Protective Groups in Organic Synthesis; John Wiley and Sons, Nueva York, 1999. Cuando un sustituyente se describe como "opcionalmente sustituido", dicho sustituyente puede estar sustituido por los sustituyentes anteriores.

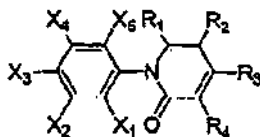
El término "purificado" se refiere a un compuesto que se ha separado de otros compuestos de forma que comprende como mínimo un 95 % de la sustancia medida cuando se ensaya.

En los compuestos descritos en el presente documento pueden aparecer carbonos asimétricos. Todos estos isómeros, incluyendo los diastereómeros y los enantiómeros, así como sus mezclas, están previstos para su inclusión en el alcance del compuesto citado. En algunos casos, los compuestos pueden existir en formas tautómeras. Se pretende que todas las formas tautómeras estén incluidas en el alcance del compuesto citado. Del mismo modo, cuando los compuestos contienen un grupo alqueno o alquenilo, existe la posibilidad de formas isoméricas cis y trans de los compuestos. Ambos isómeros cis y trans, así como las mezclas de isómeros cis y trans, están incluidas. Por tanto, cuando se hace referencia a un compuesto en el presente documento, esta incluye todas las formas isoméricas anteriormente mencionadas salvo que el contexto indique claramente otra cosa.

En las realizaciones están incluidas varias formas, que incluyen polimorfos, solvatos, hidratos, confórmeros, sales, y derivados de profármaco. Un polimorfo es una composición que tiene la misma fórmula química, pero una estructura diferente. Un solvato es una composición formada por solvatación (la combinación de moléculas de disolvente con moléculas o iones del soluto). Un hidrato es un compuesto formado por una incorporación de agua. Un confórmero es una estructura que es un isómero conformacional. El isomerismo conformacional era el fenómeno de moléculas con la misma fórmula estructural pero diferentes conformaciones (confórmeros) de átomos alrededor de un enlace giratorio. Las sales de los compuestos se pueden preparar con los métodos conocidos de los expertos en la materia. Por ejemplo, las sales de los compuestos se pueden preparar haciendo reaccionar la base o ácido adecuados con un equivalente estequiométrico del compuesto. Un profármaco es un compuesto que experimenta biotransformación (conversión química) antes de mostrar sus efectos farmacológicos. Por ejemplo, un profármaco, por tanto, se puede considerar como un fármaco que contiene uno o más grupos protectores especializados utilizados de manera transitoria para alterar o eliminar propiedades indeseables de la molécula progenitora. Por tanto, cuando se hace referencia a un compuesto en el presente documento, esta incluye todas las formas anteriormente mencionadas salvo que el contexto indique claramente otra cosa.

Los compuestos de la invención y los descritos a continuación son útiles en los métodos descritos en el presente documento. Un compuesto como se describe a continuación puede presentar un valor de CE<sub>50</sub> en el intervalo de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 1000 μM para la inhibición de MAPK de p38.

También se describe en el presente documento una familia de compuestos representados por el siguiente género (Género Ia): en el que



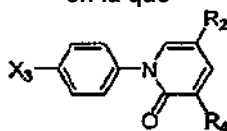
**Género Ia;**

R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, y R<sub>4</sub> se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> sustituido, alqueno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, nitroalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, tioalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, hidroxialquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, fenilo, fenilo sustituido, halógeno, hidroxilo, alcoxialquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, carboxi C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, alcóxicarbonilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, CO-uronida, CO-monosacárido, CO-oligosacárido, y CO-polisacárido; y

X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>, y X<sub>5</sub> se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, halógeno, alcoxi, e hidroxilo.

También se describe en el presente documento una familia de compuestos representados por el siguiente género (Género Ib):

en la que



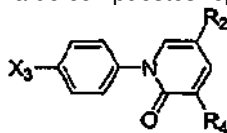
**Género Ib;**

X<sub>3</sub> se selecciona entre el grupo que consiste en H, halógeno, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, y OH;

R<sub>2</sub> se selecciona entre el grupo que consiste en H, halógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> sustituido, hidroxialquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, alcoxialquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, carboxi C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, alcóxicarbonil C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, CO-uronida, CO-monosacárido, CO-oligosacárido, y CO-polisacárido; y

R<sub>4</sub> se selecciona entre el grupo que consiste en H, halógeno, y OH.

Se describe en el presente documento una familia de compuestos representados por el siguiente género (Género Ic):



**Género Ic;**

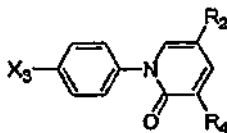
en la que

X<sub>3</sub> se selecciona entre el grupo que consiste en H, F, OH, y OCH<sub>3</sub>;

R<sub>2</sub> se selecciona entre el grupo que consiste en H, CF<sub>3</sub>, CHF<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>F, CH<sub>2</sub>OH, COOH, CO-Glucouronida, Br, CH<sub>3</sub>, y CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>; y

R<sub>4</sub> se selecciona entre el grupo que consiste en H y OH; con la condición de que cuando R<sub>4</sub> y X<sub>3</sub> son H, R<sub>2</sub> no es CH<sub>3</sub>.

También se describe en el presente documento una familia de compuestos representados por el siguiente subgénero (Subgénero Ib):



**Subgénero Ib;**

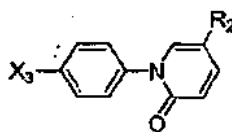
en la que

X<sub>3</sub> se selecciona entre el grupo que consiste en H, OH, y OCH<sub>3</sub>;

R<sub>2</sub> se selecciona entre el grupo que consiste en H, CH<sub>2</sub>OH, COOH, CO-Glucouronida, Br, CH<sub>3</sub>, y CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>; y

R<sub>4</sub> se selecciona entre el grupo que consiste en H y OH, con la condición de que cuando X<sub>3</sub> es OH entonces R<sub>2</sub> no es CH<sub>3</sub>.

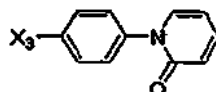
Se describe en el presente documento una familia de compuestos representados por el siguiente subgénero (Subgénero III):

**Subgénero III;**

en la que

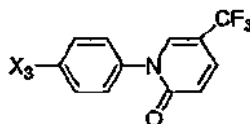
- 5  $X_3$  se selecciona entre el grupo que consiste en H, F, y OH; y  
 $R_2$  se selecciona entre el grupo que consiste en H, Br,  $\text{CH}_2\text{F}$ ,  $\text{CHF}_2$ , y  $\text{CF}_3$ .

También se describe en el presente documento una familia de compuestos representados por el siguiente subgénero (Subgénero IV):

**Subgénero IV;**

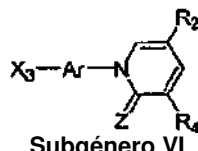
en el que  $X_3$  se selecciona entre el grupo que consiste en H, halógeno, alcoxi  $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ , OH, alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ , alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_{10}$  sustituido, alquenilo  $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ , haloalquilo  $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ , nitroalquilo  $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ , tioalquil  $\text{C}_1\text{-C}_{10}$  hidroxialquilo  $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ , fenilo, fenilo sustituido, alcoxialquilo  $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ , carboxi  $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ , alcoxicarbonilo  $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ , CO-uronida, CO-monosacárido, CO-oligosacárido, y CO-polisacárido.

Se describe en el presente documento una familia de compuestos representados por el siguiente subgénero (Subgénero V):

**Subgénero V;**

en el que  $X_3$  se selecciona entre el grupo que consiste en H, halógeno, alcoxi  $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ , alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ , alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_{10}$  sustituido, alquenilo  $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ , haloalquilo  $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ , nitroalquilo  $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ , tioalquilo  $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ , hidroxialquilo  $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ , fenilo, fenilo sustituido, alcoxialquilo  $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ , carboxi  $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ , alcoxicarbonilo  $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ , CO-uronida, CO-monosacárido, CO-oligosacárido, y CO-polisacárido.

También se describe en el presente documento una familia de compuestos representados por el siguiente género (Género Ib):

**Subgénero VI**

en la que

Ar es piridinilo o fenilo;

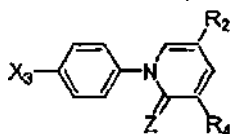
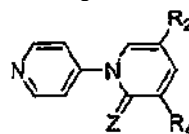
Z es O o S;

$X_3$  es H, F, Cl, OH,  $\text{CH}_3$ , o  $\text{OCH}_3$ ;

$R_2$  es metilo,  $\text{C}(=\text{O})\text{H}$ ,  $\text{C}(=\text{O})\text{CH}_3$ ,  $\text{C}(=\text{O})\text{OCH}_3$ ,  $\text{C}(=\text{O})\text{O-glucosilo}$ , fluorometilo, difluorometilo, trifluorometilo, bromo, metilmetoxilo, metilhidroxilo, o fenilo; y  $R_4$  es H o hidroxilo;

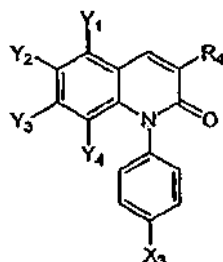
con la condición de que cuando  $R_2$  es trifluorometilo, Z es O,  $R_4$  es H y Ar es fenilo, el fenilo no está únicamente sustituido en la posición 4' por H, F, u OH.

El Género VI incluye las familias de los compuestos representados por el Subgénero VIa y el Subgénero VIb:

**Subgénero VIa****Subgénero VIb;**

en los que Z,  $X_3$ ,  $R_2$  y  $R_4$  son como se han definido para el Género VI. Se reconocerá que el anillo de fenilo en la estructura representada por el Subgénero VIa se sustituye por  $X_3$  en la posición 4'.

Se describe en el presente documento una familia de compuestos representados por el siguiente género (Género VII): en el que



**Género VII**

$X_3$  se selecciona entre el grupo que consiste en H, halógeno, alcoxi  $C_1-C_{10}$ , y OH;

$Y_1$ ,  $Y_2$ ,  $Y_3$ , y  $Y_4$  se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en H, alquilo  $C_1-C_{10}$ , alquilo  $C_1-C_{10}$  sustituido, alquenilo  $C_1-C_{10}$ , haloalquilo  $C_1-C_{10}$ , nitroalquilo  $C_1-C_{10}$ , tioalquilo  $C_1-C_{10}$ , hidroxialquilo  $C_1-C_{10}$ , alcoxi  $C_1-C_{10}$ , fenilo, fenilo sustituido, halógeno, hidroxilo, alcóxialquilo  $C_1-C_{10}$ , carboxi  $C_1-C_{10}$ , alcóxicarbonilo  $C_1-C_{10}$ , y  $R_4$  se selecciona entre el grupo que consiste en H, halógeno, y OH.

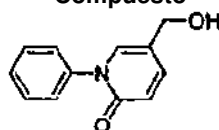
Se reconocerá que un compuesto particular descrito en el presente documento puede ser un miembro de más de uno de los varios géneros descritos anteriormente. Los compuestos descritos en el presente documento son útiles para modular un sistema de proteína cinasa activada por estrés (SAPK). Los compuestos ejemplares del Género Ia-c, Subgéneros II-V y Géneros VI y VII que son útiles para modular un sistema de proteína cinasa activada por estrés (SAPK) se exponen en la Tabla 1 a continuación. Los compuestos 1-6 son ejemplos de compuestos del Subgénero II. Los compuestos 7-12 son ejemplos de compuestos del Subgénero III. El compuesto 13 es pirfenidona, un ejemplo de un compuesto del Subgénero II. Los compuestos 14-32 son ejemplos de compuestos del Género VI. El compuesto 33 es un ejemplo del Género VII.

**Tabla 1**

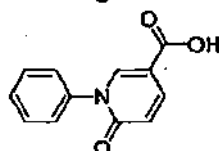
**Número de compuesto**

**Compuesto**

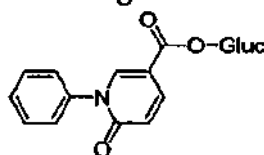
\* 1



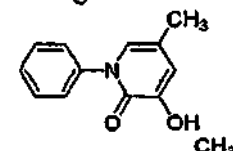
\* 2



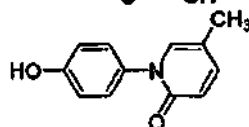
\* 3



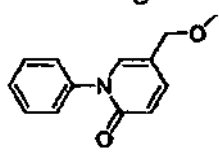
\* 4



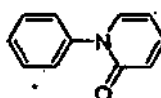
5

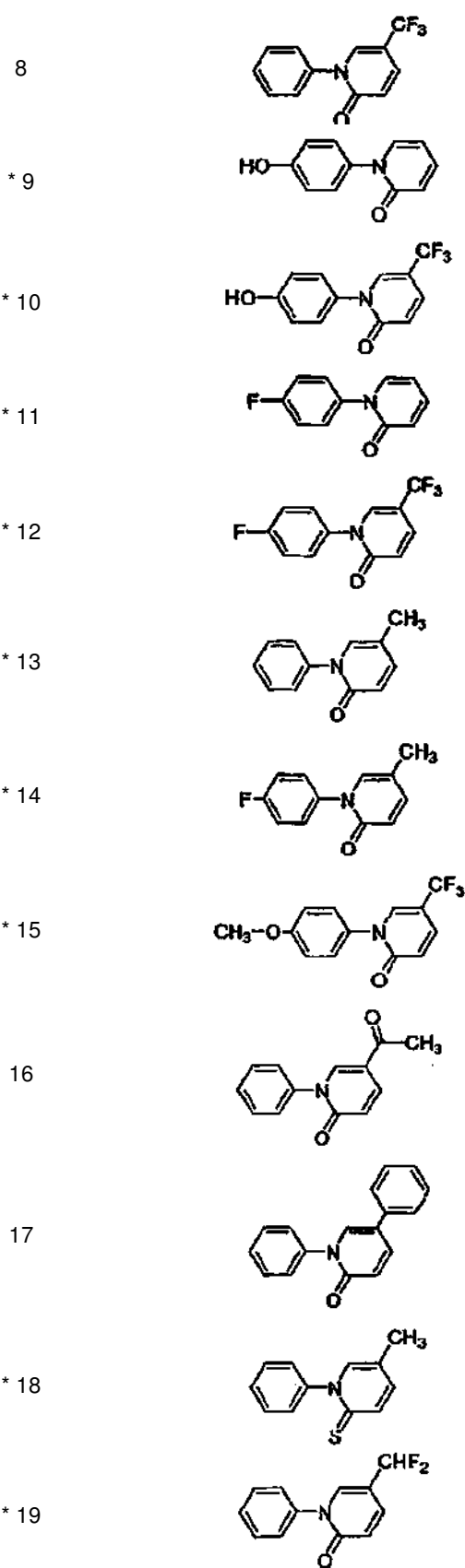


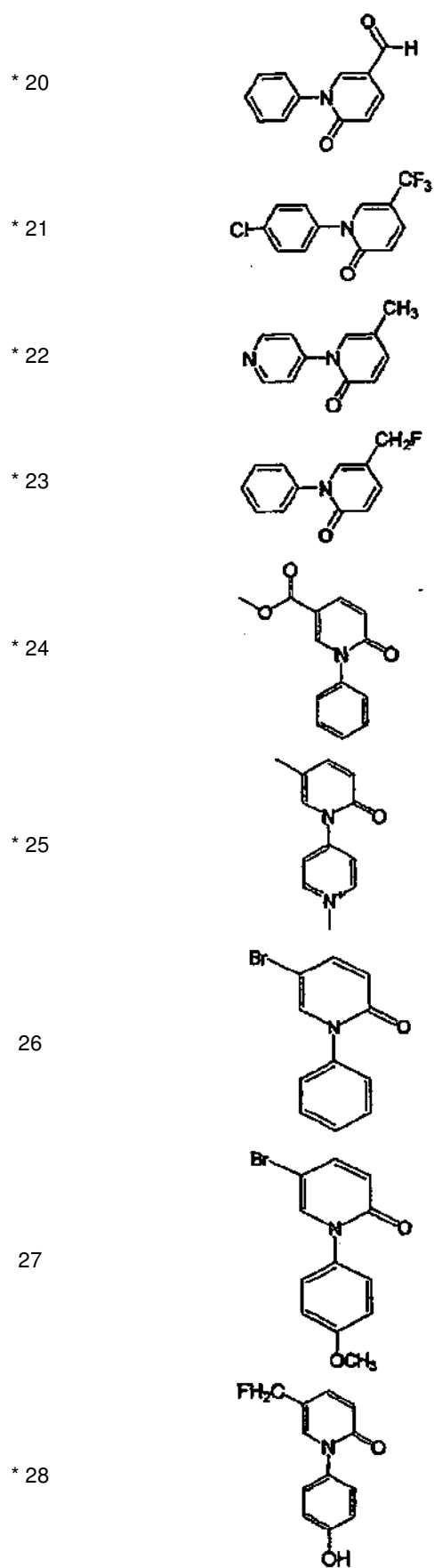
\* 6

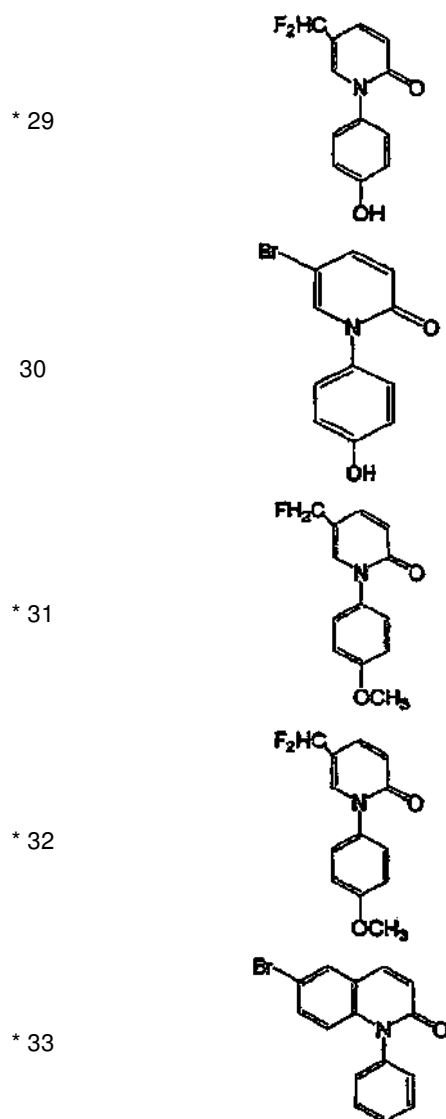


\* 7










---

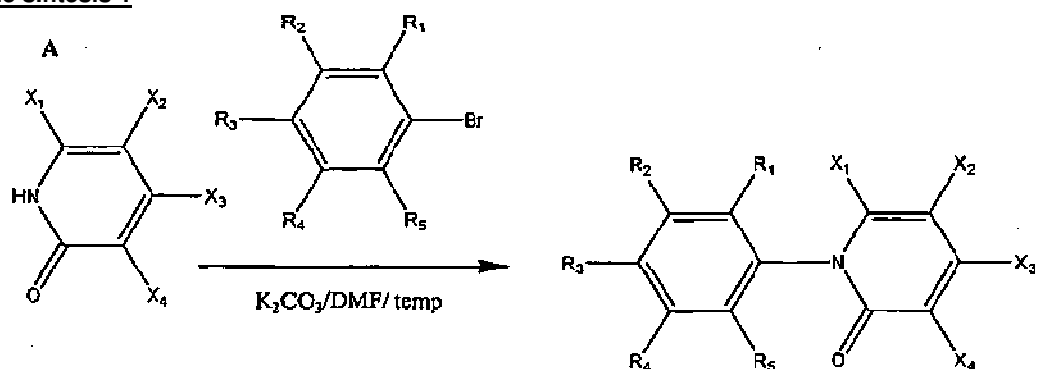
\* denota un compuesto de referencia

---

Se describen en el presente documento compuestos purificados representados por los Géneros Ia-c, los Subgéneros II-V y/o los Géneros VI y VII. El grado de pureza se puede expresar como un porcentaje de lo descrito anteriormente. En realizaciones preferidas, los compuestos purificados representados por los Géneros Ia-c, los subgéneros II-V y/o los Géneros VI y VII tienen una pureza de aproximadamente 96 % o superior, más preferentemente de aproximadamente 98 % o superior, por peso basado en el peso total de la composición que comprende el producto purificado. Por ejemplo, una realización proporciona el Compuesto 3 purificado (Tabla 1).

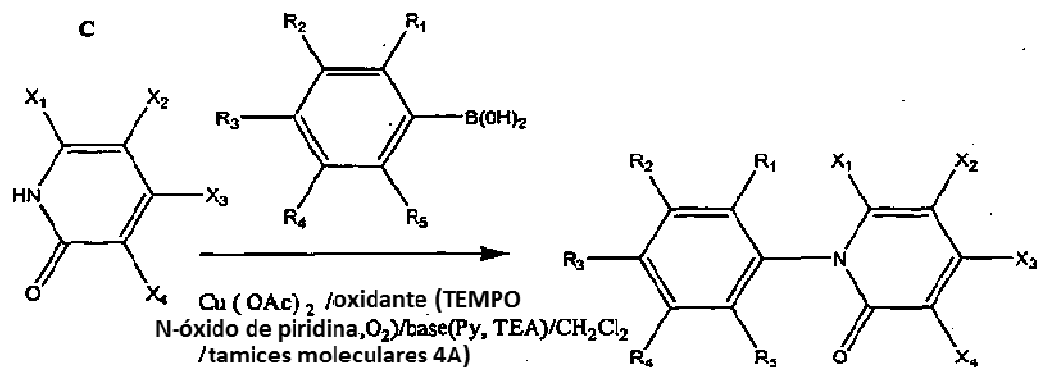
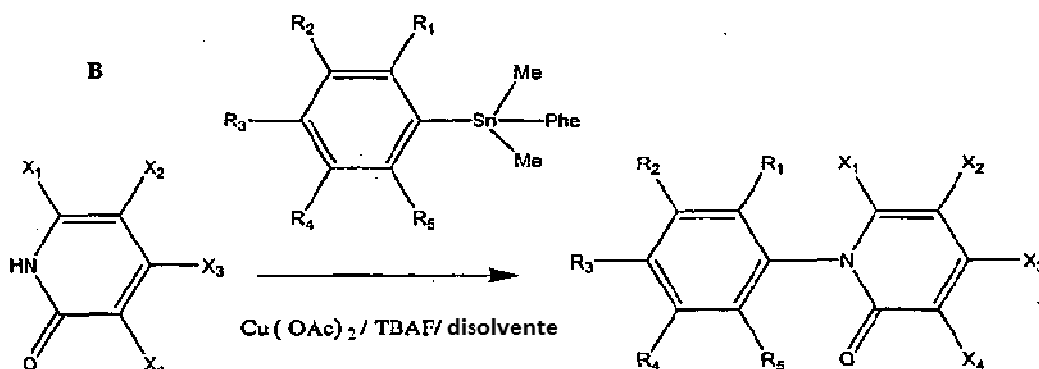
Los compuestos de los Géneros Ia-c, Subgéneros II-V y/o los Géneros VI y VII se pueden sintetizar utilizando varias reacciones. Los ejemplos de síntesis incluyen los siguientes, designados como Esquemas de síntesis 1, 2, y 3.

**Esquema de síntesis 1**

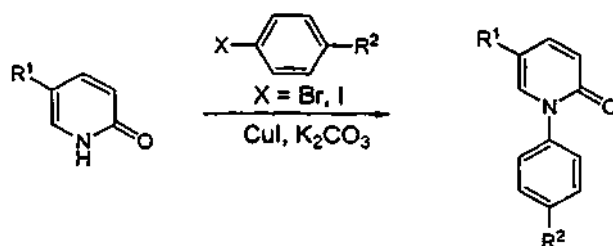


$X_1 = X_2 = X_3 = X_4 = H$ , alquilo, alquenilo, nitroalquilo, tioalquilo, fenilo, fenilo sustituido,  $CH_2Phe$ , halógeno, hidroxilo, alcoxi, haloalquilo

$R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = H$ , alquilo, alquenilo, nitroalquilo, tioalquilo, fenilo, fenilo sustituido,  $CH_2Phe$ , halógeno, hidroxilo, alcoxi, haloalquilo



**Esquema de síntesis 2**



5

Reacción de Ullman: Chem.Pharm.Bull. 45(4) 719-721. Las N-aril-piridina-2-onas diana se obtuvieron por arilación de 2-hidroxipiridinas. La reacción de Ullmann es útil en la preparación de los compuestos descritos, excepto para los análogos de 5-bromo y el compuesto 33, que se consiguen, por ejemplo, mediante el esquema de síntesis 3.

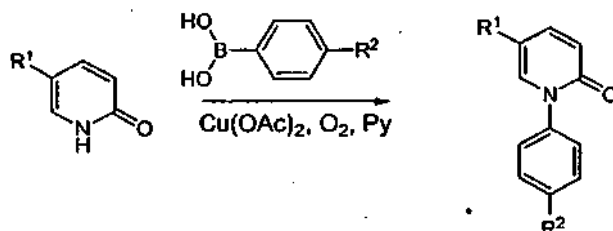
10 Una mezcla de 2-hidroxipiridina (1 mmol), yoduro o bromuro de arilo (2 mmol), CuI (0.1-0.5 mmol) y carbonato de



potasio anhidro (1 mmol) en DMF (3 ml) se agitó durante la noche a 135 °C bajo atmósfera de argón. La mezcla de reacción de color intenso se capturó en acetato de etilo e hidróxido de amonio al 10 %. La capa orgánica se lavó con salmuera y se secó con sulfato de magnesio. La cromatografía en columna proporcionó los compuestos diana como sólidos de color crema con un rendimiento de 25-60 %.

5

### Esquema de síntesis 3



10

Las N-aril-2-piridonas diana pueden obtenerse mediante arilación de 2-hidroxipiridinas con ácidos alquilborónicos (Tetrahedron Lett., 42 (2001) 3415-3418). La ruta del ácido alquilborónico es útil para la preparación de los compuestos divulgados. Una mezcla de 2-hidroxipiridina (5 mmol), ácido ariborónico (10 mmol), acetato de cobre (II) (0,5-1 mmol), piridina (10 mmol) y tamices moleculares A4 (0,5-1 g) en diclorometano (25 ml) se agitaron durante 24-48 horas a temperatura ambiente expuestos a la atmósfera. La mezcla de reacción se lavó con solución de bicarbonato de sodio con EDTA saturada y la fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio. Las N-aril-2-piridonas diana se aislaron mediante cromatografía en columna en forma de sólidos de color blanco con un rendimiento del 85-100 %.

15

Como derivados de pirfenidona, los compuestos de los Géneros Ia-c, Subgéneros II-V y/o Géneros VI y VII también pueden sintetizarse mediante cualquier reacción convencional conocida en la técnica basándose en los esquemas de síntesis conocidos para pirfenidona, tales como los divulgados en las Patentes de los Estados Unidos Nº 3.839.346; 3.974.281; 4.042.699; y 4.052.509, todas ellas incorporada en este documento por referencia en su totalidad.

Los materiales de partida descritos en el presente documento están disponibles comercialmente, son conocidos, o pueden prepararse mediante métodos conocidos en la técnica. Adicionalmente, los materiales de partida no descritos en el presente documento están disponibles comercialmente, son conocidos, o pueden prepararse mediante métodos conocidos en la técnica.

Los materiales de partida pueden tener los sustituyentes adecuados para dar en último lugar los productos deseados con los sustituyentes correspondientes. Como alternativa, pueden añadirse los sustituyentes en cualquier momento de la síntesis para, en última instancia, proporcionar los productos deseados con los sustituyentes correspondientes.

Los esquemas de síntesis 1-3 muestran métodos que pueden usarse para preparar compuestos de los Géneros Ia-c, Subgéneros II-V y/o Géneros VI y VII. Un experto en la técnica apreciará que pueden usarse un número de diferentes esquemas de reacción sintética para sintetizar los compuestos de los Géneros Ia-c, Subgéneros II-V y/o Géneros VI y VII. Además, un experto en la técnica entenderá que un número de diferentes disolventes, agentes de acoplamiento, y condiciones de reacción pueden usarse en las reacciones de síntesis para producir resultados comparables.

Un experto en la técnica apreciará variaciones en la secuencia, y además, reconocerá variaciones en las condiciones de reacción apropiadas a partir de las reacciones análogas mostradas o conocidas que pueden usarse de manera adecuada en los procesos anteriores para producir los compuestos de los géneros Ia-c, Subgéneros II-V y/o Géneros VI y VII.

En los procesos descritos en el presente documento para la preparación de los compuestos de Géneros Ia-c, Subgéneros II-V y/o Géneros VI y VII, el uso de grupos protectores está generalmente bien reconocido por un experto en la técnica de química orgánica, y por consiguiente, el uso de grupos protectores adecuados puede, en algunos casos, estar implicado por los procesos de los esquemas del presente documento, aunque dichos grupos pueden no estar ilustrados de manera expresa. La introducción y retirada de dichos grupos protectores adecuados se conoce bien en la técnica de química orgánica; véase, por ejemplo, T.W. Greene, "Protective Groups in Organic Synthesis", Wiley (New York), 1999. Los productos de las reacciones descritas en el presente documento pueden aislarse mediante medios convencionales, tales como extracción, destilación cromatografía, y similares.

50

Las sales, por ejemplo, sales farmacéuticamente aceptables, de los compuestos de los Géneros Ia-c, Subgéneros II-V y/o Géneros VI y VII pueden prepararse haciendo reaccionar la base o ácido adecuados con un equivalente estequiométrico de los compuestos. De manera similar, los derivados farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, ésteres), metabolitos, hidratos, solvatos y profármacos de los compuestos de los Géneros Ia-c, Subgéneros II-V y/o Géneros VI y VII pueden prepararse mediante métodos conocidos generalmente por los expertos en la técnica. Por

55

tanto, se describen en el presente documento compuestos que son profármacos de un compuesto activo. En general, un profármaco es un compuesto que se metaboliza *in vivo* (por ejemplo, mediante una transformación metabólica, tal como desaminación, desalquilación, desesterificación, y similares) para proporcionar un compuesto activo. Un "profármaco farmacéuticamente aceptable" significa un compuesto que es, dentro del alcance del buen criterio médico, adecuado para uso farmacéutico en un paciente sin toxicidad indebida, irritación, respuesta alérgica, y similares, y efectivo para el uso previsto, incluyendo un éster farmacéuticamente aceptable así como una forma zwitteriónica, en los casos en los que sea posible, de los compuestos de las realizaciones. Los ejemplos de tipos de profármacos farmacéuticamente aceptables se describen en T. Higuchi y V. Stella, *Pro-drugs as Novel Delivery Systems*, Vol. 14 de la A.C.S. Serie Symposium, y en Edward B. Roche, ed., *Bioreversible Carriers in Drug Design*, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987.

Los compuestos y composiciones descritos en el presente documento también pueden incluir metabolitos. Como se usa en el presente documento, el término "metabolito" significa un producto de metabolismo de un compuesto o una sal, análogo o derivado del mismo farmacéuticamente aceptable, que muestra una actividad similar *in vitro* o *in vivo* para un compuesto descrito en el presente documento. Los compuestos y composiciones descritos en el presente documento también pueden incluir hidratos y solvatos. Como se usa en el presente documento, el término "solvato" se refiere a un complejo formado por un soluto (en el presente documento, un compuesto de los Géneros Ia-c, Subgéneros II-V y/o Géneros VI y VII) y un disolvente. Dichos disolventes deben preferentemente no interferir con la actividad biológica del soluto. Los disolventes pueden ser, a modo de ejemplo, agua, etanol, o ácido acético. En vista de lo anterior, la referencia en el presente documento a un compuesto o género concreto de los compuestos se entenderá como inclusivo de las varias formas descritas anteriormente, incluyendo sales farmacéuticamente aceptables, ésteres, profármacos, metabolitos y solvatos, a menos que se indique lo contrario.

#### Métodos para inhibir MAP cinasa p38

Los compuestos de la invención pueden usarse en métodos para modular un sistema SAPK, *in vitro* o *in vivo*. Los métodos incluyen poner en contacto una concentración de un compuesto que modula a SAPK con al menos una MAPK p38 (por ejemplo, poniendo el compuesto con una célula o tejido que contiene al menos una MAPK p38), en el que el compuesto tiene una potencia relativamente baja de inhibición de la al menos una MAPK p38, correspondiente a una concentración inhibidora relativamente elevada para la inhibición de la al menos una MAPK p38 por el compuesto.

"Poner en contacto una célula" se refiere a una condición en la que un compuesto u otra composición material está en contacto directo con una célula o tejido, o está lo suficientemente cerca como para inducir un efecto biológico deseado en una célula o tejido. Por ejemplo, poner en contacto una célula o tejido con una MAPK p38 con un compuesto puede llevarse a cabo de cualquier modo que permita una interacción entre la MAPK p38 y el compuesto, que da como resultado el efecto biológico deseado en una célula. Poner en contacto una célula o tejido puede efectuarse, por ejemplo, entremezclando o administrando un compuesto (tal como un compuesto de los Géneros Ia-c, Subgéneros II-V y/o Géneros VI y VII) y/o una sal, éster, profármaco y/o intermedio de los mismos, y/o una composición farmacéutica que comprende uno o más de los anteriores).

Como alternativa, poner en contacto una célula o tejido puede llevarse a cabo introduciendo un compuesto de tal modo que el compuesto se dirija, directa o indirectamente, a una célula o tejido en contacto con una MAPK p38. Poner en contacto una célula o tejido puede llevarse a cabo en condiciones tales que un compuesto se una a al menos una MAPK p38. Dichas condiciones pueden incluir proximidad del compuesto a la célula o tejido que contiene p38, pH, temperatura, o cualquier condición que afecte a la unión de un compuesto a MAPK p38.

La célula puede ponerse en contacto con el compuesto *in vitro*; o la célula puede ponerse en contacto con el compuesto *in vivo*.

Cuando la célula se pone en contacto *in vivo*, la concentración efectiva (CE) de un compuesto es una concentración que da como resultado una reducción de un punto final en un porcentaje diana (por ejemplo, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10%) en relación a la reducción máxima observable del punto final por ese compuesto. Dicho punto final puede ser una respuesta fisiológica, por ejemplo, la reducción en sangre o en otro fluido corporal de la concentración de TNF $\alpha$ . Por ejemplo, CE<sub>50</sub>, CE<sub>40</sub>, CE<sub>30</sub>, CE<sub>20</sub> y CE<sub>10</sub> se determinan como concentraciones que dan como resultado reducciones en la concentración en suero de TNF $\alpha$  en un 50 %, 40 %, 30 %, 20 % y 10 %, respectivamente, en relación a la reducción máxima observable en una curva de respuesta a dosis.

Cuando la célula se pone en contacto *in vitro*, excepto en un ensayo basado en células, la concentración efectiva (CE) es una concentración que da como resultado una reducción de la actividad de la diana específica en un porcentaje dado (por ejemplo, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 %). Por ejemplo, CE<sub>50</sub>, CE<sub>40</sub>, CE<sub>30</sub>, CE<sub>20</sub> y CE<sub>10</sub> se determinan como concentraciones que dan como resultado reducciones en la actividad de la diana en un 50 %, 40 %, 30 %, 20 % y 10 %, respectivamente, en una curva de respuesta a dosis. Cuando no se obtiene la inhibición completa de una diana específica, la concentración efectiva (CE) de un compuesto es una concentración que da como resultado una reducción de una actividad diana en un porcentaje dado (por ejemplo, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10%) en relación a la reducción máxima observable de la actividad diana por ese compuesto.

Quando la célula se pone en contacto *in vitro*, en un ensayo basado en células, la concentración efectiva (CE) de un compuesto es una concentración que da como resultado una reducción de un punto final en un porcentaje diana (por ejemplo, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10%) en relación a la reducción máxima observable del punto final por ese compuesto. Dicho punto final puede ser una respuesta celular, por ejemplo, reducción en la secreción de TNF $\alpha$  determinada por la concentración de TNF $\alpha$  en medio celular. Por ejemplo, CE<sub>50</sub>, CE<sub>40</sub>, CE<sub>30</sub>, CE<sub>20</sub> y CE<sub>10</sub> se determinan como concentraciones que dan como resultado reducciones en la concentración de TNF $\alpha$  en un 50 %, 40 %, 30 %, 20 % y 10 %, respectivamente, en relación a la reducción máxima observable en una curva de respuesta a dosis.

La CE<sub>50</sub> del compuesto modulador del sistema SAPK está preferentemente en el intervalo de aproximadamente 1  $\mu$ M a aproximadamente 1000  $\mu$ M, más preferentemente, de aproximadamente 50  $\mu$ M a aproximadamente 650  $\mu$ M para la inhibición de al menos una MAPK p38. Por tanto, por ejemplo, la modulación del sistema SAPK puede incluir poner en contacto un compuesto (por ejemplo, un compuesto de los Géneros Ia-c, Subgéneros II-V y/o Géneros VI y VII) con al menos una MAPK p38 a una concentración menor de la CE<sub>40</sub>, preferentemente, menos de la CE<sub>30</sub>, más preferentemente, menos de la CE<sub>20</sub>, aún más preferentemente, menos de la CE<sub>10</sub> para la inhibición de la al menos una MAPK p38 por el compuesto, determinada por una curva de respuesta a dosis *in vivo*.

En determinadas realizaciones, el compuesto de la invención se proporciona en forma de una composición farmacéutica, junto con un transportador farmacéuticamente aceptable.

### Exploración de una biblioteca de compuestos para inhibidores de p38 de baja potencia

En el presente documento se describe un método para identificar un compuesto farmacéuticamente activo, por ejemplo, para determinar si un compuesto es potencialmente útil como un agente terapéutico, por ejemplo, para la prevención o tratamiento de una afección inflamatoria (tal como una afección asociada con p-38 o citocinas). El método incluye ensayar una pluralidad de compuestos para la inhibición de al menos una MAPK p38 y seleccionar un compuesto que muestre una potencia relativamente baja para inhibir MAPK p38. Preferentemente, una CE<sub>50</sub> de dicho inhibidor de p38 de baja potencia está en el intervalo de aproximadamente 1  $\mu$ M a aproximadamente 1000  $\mu$ M, preferentemente, de aproximadamente 50  $\mu$ M a aproximadamente 650  $\mu$ M para la inhibición de la al menos una MAPK p38. La pluralidad de compuestos a ensayar se selecciona preferentemente de una biblioteca de compuestos potenciales. El ensayo de la pluralidad de compuestos a partir de la biblioteca puede llevarse a cabo de varios modos. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los métodos comprenden adicionalmente poner en contacto al menos una MAPK p38 con la pluralidad de compuestos, y determinar si los compuestos inhiben la actividad de citocinas. Una MAPK p38 se selecciona preferentemente del grupo que consiste en p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\gamma$ , y p38 $\delta$ . En un aspecto preferido, la etapa de puesta en contacto tiene lugar *in vitro*: en determinados aspectos preferidos, la etapa de puesta en contacto comprende poner en contacto una célula que comprende MAPK p38 con el compuesto.

También se describen en el presente documento métodos para inhibir la actividad de MAPK p38 en una célula, *in vitro* o *in vivo*. En general, dichos métodos incluyen poner en contacto una célula que contiene al menos una MAPK p38 con una cantidad efectiva inhibidora de p38 de un compuesto (por ejemplo, un compuesto de los Géneros Ia-c, Subgéneros II-V y/o Géneros VI y VII), en condiciones tales que la actividad de p38 en la célula se inhiba. Los ejemplos de dichos métodos se proporcionan en la sección de EJEMPLOS más adelante. El compuesto muestra preferentemente una CE<sub>50</sub> en el intervalo de aproximadamente 1  $\mu$ M a aproximadamente 1000  $\mu$ M, preferentemente, de aproximadamente 50  $\mu$ M a aproximadamente 650  $\mu$ M para la inhibición de la al menos una MAPK p38. La puesta en contacto de al menos una MAPK p38 con el compuesto se lleva a cabo a una concentración moduladora de sistema SAPK que es menor que la CE<sub>30</sub>, preferentemente, menos de la CE<sub>20</sub>, más preferentemente, menos de la EC<sub>10</sub> para la inhibición de la al menos una MAPK p38 por el compuesto.

Los métodos *In vivo* incluyen por ejemplo, introducir en un grupo de animales por vía oral o por inyección un compuesto de interés (por ejemplo, un compuesto de los Géneros Ia-c, Subgéneros II-V y/o Géneros VI y VII) en varias concentraciones. Después de la introducción del compuesto, se administra lipopolisacárido por vía intravenosa. Los niveles de TNF $\alpha$  en suero se miden y comparan con aquellos de animales control. Los compuestos preferidos inhiben la liberación de TNF $\alpha$ , por tanto reduciendo los niveles de TNF $\alpha$  en las muestras de sangre de los animales ensayados. El compuesto muestra preferentemente una CE<sub>50</sub> en el intervalo de aproximadamente 1  $\mu$ M a aproximadamente 1000  $\mu$ M, preferentemente, de aproximadamente 50  $\mu$ M a aproximadamente 650  $\mu$ M para la inhibición de la liberación de TNF $\alpha$ .

El método para identificar un compuesto farmacéuticamente activo puede incluir adicionalmente determinar una toxicidad en mamífero del compuesto seleccionado. Dichos métodos son conocidos generalmente por los expertos en la técnica. El método para identificar un compuesto farmacéuticamente activo también puede incluir administrar el compuesto seleccionado a un sujeto de prueba, en conjunción con la determinación de toxicidad en mamífero o por otros motivos. Como se describe en el presente documento, el sujeto de prueba tiene o está en riesgo de tener una afección inflamatoria. Preferentemente, el sujeto de prueba es un mamífero, y puede ser un ser humano.

## Métodos de tratamiento y/o de prevención

Los compuestos de la invención pueden usarse en métodos para tratar o prevenir estados de enfermedad, por ejemplo, afecciones inflamatorias y/o afecciones fibróticas. Los métodos incluyen identificar a un sujeto en riesgo de o que tiene al menos una afección seleccionada de una afección inflamatoria y una afección fibrótica y administrar un compuesto al sujeto en una cantidad efectiva para tratar o prevenir la afección inflamatoria y/o afección fibrótica. En realizaciones preferidas, el compuesto muestra una  $CE_{50}$  en el intervalo de aproximadamente 1  $\mu M$  a aproximadamente 1000  $\mu M$ , preferentemente, de aproximadamente 50  $\mu M$  a aproximadamente 650  $\mu M$  para la inhibición de al menos una MAPK p38. En realizaciones preferidas, la cantidad efectiva produce una concentración en sangre, suero u otro fluido corporal que es menor que la  $CE_{30}$  o, preferentemente, una  $CE_{20}$  o, más preferentemente, una  $CE_{10}$  para la inhibición de MAPK p38 por el compuesto. En realizaciones preferidas, el compuesto muestra una  $CE_{50}$  en el intervalo de aproximadamente 1  $\mu M$  a aproximadamente 1000  $\mu M$ , preferentemente, de aproximadamente 50  $\mu M$  a aproximadamente 650  $\mu M$  para la inhibición de la secreción de TNF $\alpha$ . En otra realización preferida, la cantidad efectiva produce una concentración en sangre, suero u otro fluido corporal que es menor que la  $CE_{30}$  o, preferentemente, una  $CE_{20}$  o, más preferentemente, una  $CE_{15}$  o, más preferentemente, una  $CE_{10}$  para la inhibición de la liberación de TNF $\alpha$  estimulada por LPS en un fluido corporal por el compuesto. La cantidad efectiva es preferentemente de aproximadamente el 70 % o menos, más preferentemente, menos de aproximadamente el 50 %, de una cantidad que causa un efecto secundario no deseado en el sujeto, tal como, pero sin limitación, somnolencia, náuseas, síntomas del resfriado, molestias gastrointestinales, y erupción por fotosensibilidad. El compuesto descrito en el presente documento usado para el tratamiento o prevención es preferentemente un compuesto de los Géneros la-c, Subgéneros II-V y/o Géneros VI y VII.

Los métodos para identificar un sujeto en riesgo o que tenga una afección inflamatoria son conocidos para los expertos en la técnica. Los ejemplos de afecciones inflamatorias que pueden tratarse o prevenirse por los métodos descritos en el presente documento incluyen afecciones asociadas con p38, por ejemplo, afecciones asociadas con actividad alterada de citocinas, afecciones asociadas con la modulación de un sistema SAPK, enfermedades autoinmunes, y enfermedades asociadas con inflamación aguda y crónica. La citocina (o citocinas) se selecciona(n) preferentemente del grupo que consiste en, pero sin limitación, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, y TNF $\alpha$ . Los compuestos de la invención que pueden usarse para tratar o prevenir la afección inflamatoria son compuestos que inhiben una cinasa en la vía de señalización de SAPK. Los ejemplos de compuestos preferidos descritos en el presente documento incluyen compuestos de los Géneros la-c, Subgéneros II-V y/o Géneros VI y VII.

La expresión "afección asociada con p38" significa una enfermedad u otra afección perjudicial en la que está implicada la vía de señalización de MAP cinasa p38, ya sea directa o indirectamente. Los ejemplos de afecciones asociadas con p38 incluyen afecciones causadas por la desregulación o sobreexpresión de IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6 o IL-8 como resultado de niveles sostenidos, prolongados o elevados de la actividad de p38. Dichas afecciones incluyen, sin limitación, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes, enfermedades fibróticas, trastornos destructivos del hueso, trastornos proliferativos enfermedades infecciosas, enfermedades neurodegenerativas, alergias, isquemia de reperusión en ictus, ataques cardíacos, trastornos angiogénicos, hipoxia de órganos, hiperplasia vascular, hipertrofia cardíaca, agregación plaquetaria inducida por trombina, y afecciones asociadas con las vías de prostaglandinas o ciclooxigenasa, por ejemplo, afecciones que incluyan prostaglandina endoperoxidasa sintasa. Una afección asociada a p38 puede incluir cualquier afección asociada con o mediada por una isoforma de p38.

Una "afección fibrótica", "afección fibroproliferativa", "enfermedad fibrótica", "enfermedad fibroproliferativa", "trastorno fibrótico," y "trastorno fibroproliferativo" se usan de manera intercambiable para referirse a una afección, enfermedad o trastorno que se caracteriza por la proliferación desregulada o la actividad de fibroblastos y/o acumulación patológica o excesiva de tejido colagenoso. Normalmente, cualquiera de dichas enfermedades, trastornos o afecciones son susceptibles de tratamiento mediante la administración de un compuesto que tenga actividad antifibrótica. Los trastornos fibróticos incluyen, pero sin limitación, fibrosis pulmonar, incluyendo fibrosis pulmonar idiopática (FPI) y fibrosis pulmonar de una etiología conocida, fibrosis hepática, y fibrosis renal. Otras afecciones fibróticas ejemplares incluyen fibrosis musculoesquelética, fibrosis cardíaca, adherencias post-quirúrgicas, escleroderma, glaucoma, y lesiones cutáneas, tales como queloides.

La expresión "modular el sistema de SAPK" significa aumentar o disminuir la actividad del sistema de proteína cinasa activada por estrés, por ejemplo, inhibiendo la actividad de p38, ya sea *in vitro* o *in vivo*. En determinadas realizaciones, el sistema SAPK se modula cuando la actividad de p38 en una célula está inhibida en aproximadamente el 50 %, preferentemente en aproximadamente un 40 %, más preferentemente en aproximadamente un 30 %, aún más preferentemente en aproximadamente un 20 %, o incluso aún más preferentemente en aproximadamente un 10 % en comparación con la actividad de p38 de una célula de control no tratada.

Una afección asociada con actividad alterada de citocinas, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una afección en la que la actividad de citocinas está alterada en comparación con un estado no de enfermedad. Esto incluye, pero sin limitación, afecciones causadas por la sobreproducción o desregulación de IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6 o IL-8 que dan como resultado niveles de actividad de citocinas sostenidos, prolongados, potenciados o elevados, que pueden asociarse con la actividad de p38. Dichas afecciones incluyen, sin limitación, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes, enfermedades fibróticas, trastornos destructivos del hueso, trastornos proliferativos

enfermedades infecciosas, enfermedades neurodegenerativas, alergias, isquemia de reperusión en ictus, ataques cardíacos, trastornos angiogénicos, hipoxia de órganos, hiperplasia vascular, hipertrofia cardíaca, agregación plaquetaria inducida por trombina, y afecciones asociadas con las vías de señalización de ciclooxigenasa y lipooxigenasa, tales como prostaglandina endoperoxido sintasa. Una afección asociada a citocinas puede incluir cualquier afección asociada con o mediada por IL-1 (en particular, IL-1 $\beta$ ), TNF $\alpha$ , IL-6 o IL-8, o cualquier otra citocina que pueda regularse mediante p38. La afección asociada a citocinas puede ser una afección asociada con TNF $\alpha$ .

Los métodos descritos en el presente documento también pueden usarse para tratar enfermedades autoinmunes y enfermedades asociadas con la inflamación aguda y crónica. Estas enfermedades incluyen, pero sin limitación: enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), síndrome de bronquiolitis obliterante, fibrosis de aloinjerto crónica, fibrosis pulmonar inflamatoria (FPI), artritis reumatoide; espondilitis reumatoide; artrosis; gota, otras afecciones artríticas; septicemia; choque séptico; choque endotóxico; septicemia por bacterias gram negativas; síndrome de choque tóxico; síndrome del dolor miofacial (SDM); shigelosis; asma; síndrome de dificultad respiratoria del adulto; enfermedad inflamatoria del intestino; enfermedad de Crohn; psoriasis; eccema; colitis ulcerosa; nefritis glomerular; escleroderma; tiroiditis crónica; enfermedad de Grave; enfermedad de Ormond; gastritis autoinmune; miastenia grave; anemia hemolítica autoinmune; neutropenia autoinmune; trombocitopenia; fibrosis pancreática; hepatitis activa crónica, incluyendo fibrosis hepática; enfermedad renal aguda y crónica; fibrosis renal, síndrome del intestino irritable; piresis; restenosis; malaria cerebral; lesión por infarto e isquémica; traumatismo neurológico; enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington; enfermedad de Parkinson; dolor agudo y crónico; alergias, incluyendo rinitis alérgica y conjuntivitis alérgica; hipertrofia cardíaca, insuficiencia cardíaca crónica; síndrome coronario agudo; caquexia; malaria; lepra; leishmaniasis; enfermedad de Lyme; síndrome de Reiter; sinovitis aguda; degeneración muscular, bursitis; tendinitis; tenosinovitis; síndrome del disco intervertebral herniado, roto o prolapsado; osteopetrosis; trombosis, silicosis; sarcosis pulmonar; enfermedades de resorción ósea, tales como osteoporosis o trastornos óseos relacionados con mieloma múltiple; cáncer, incluyendo pero sin limitación carcinoma de mama metastásico, carcinoma colorrectal, melanoma maligno, cáncer gástrico, y cáncer de pulmón no microcítico; reacción de hospedador contra injerto; y enfermedades autoinmunes, tales como esclerosis múltiple, lupus y fibromialgia; SIDA y otras enfermedades virales tales como Herpes Zoster, Herpes Simplex I o II, virus de la gripe, síndrome respiratorio agudo severo (SRAS) y citomegalovirus; y diabetes mellitus. Además, los métodos de las realizaciones pueden usarse para tratar trastornos proliferativos (incluyendo hiperplasias benignas y malignas), incluyendo leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica, sarcoma de Kaposi, melanoma metastásico, mieloma múltiple, cáncer de mama, incluyendo carcinoma metastásico de mama; carcinoma colorrectal; melanoma maligno; cáncer gástrico; cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), metástasis óseas, y similares; trastornos de dolor, incluyendo dolor neuromuscular, cefalea, dolor del cáncer, dolor dental, y dolor de artritis; trastornos angiogénicos incluyendo angiogénesis de tumores sólidos, neovascularización ocular, y hemangioma infantil; afecciones asociadas con las vías de señalización de ciclooxigenasa y lipooxigenasa, incluyendo afecciones asociadas con prostaglandina endoperoxido sintasa-2 (incluyendo edema, fiebre, analgesia, y dolor); hipoxia de órganos; agregación plaquetaria inducida por trombina. Además, los métodos descritos en el presente documento pueden ser útiles para el tratamiento de enfermedades causadas por protozoos en animales, incluyendo mamíferos.

Un sujeto puede incluir una o más células o tejidos, u organismos. Un sujeto preferido es un mamífero. Un mamífero puede incluir cualquier mamífero. Como ejemplo no limitante, los mamíferos preferidos incluyen ganado, cerdos, ovejas, cabras, caballos, camellos, búfalos, gatos, perros, ratas, ratones, y seres humanos. Un sujeto altamente preferido es un ser humano. El compuesto (o los compuestos) puede administrarse al sujeto a través de cualquier vía de dispensación de fármacos conocida en la técnica. Las vías de administración ejemplares específicas incluyen vía oral, ocular, rectal, bucal, vía tópica, nasal, oftálmica, subcutánea, intramuscular, intravenosa (en bolo e infusión), intracerebral, transdermal, y pulmonar.

Las expresiones "cantidad terapéuticamente efectiva" y "cantidad profilácticamente efectiva", tal como se usa en el presente documento, se refieren a una cantidad de un compuesto suficiente para tratar, mejorar, o prevenir la enfermedad o afección identificada, o para mostrar un efecto terapéutico, profiláctico o inhibidor detectable. El efecto puede detectarse mediante, por ejemplo, los ensayos divulgados en los siguientes ejemplos. La cantidad efectiva precisa para un sujeto dependerá del peso corporal del paciente, tamaño, y estado de salud; el tipo y alcance de la afección; y del agente terapéutico o combinación de agentes terapéuticos seleccionados para administración. Las cantidades terapéuticamente y profilácticamente efectivas para una situación dada pueden determinarse mediante experimentación rutinaria que se encuentra dentro de las capacidades y el juicio del médico. Preferentemente, la cantidad efectiva del compuesto de las realizaciones produce una concentración en sangre, suero u otro fluido corporal que es menor que la CE<sub>30</sub>, CE<sub>20</sub> o CE<sub>10</sub> para la inhibición de MAP cinasa p38.

Para cualquier compuesto, la cantidad terapéuticamente o profilácticamente efectiva puede estimarse inicialmente en ensayos de cultivos celulares, por ejemplo, de células neoplásicas, o en modelos animales, generalmente ratas, ratones, conejos, perros, o cerdos. El modelo animal también puede usarse para determinar el intervalo de concentración adecuado y la pauta de administración. Dicha información puede usarse seguidamente para determinar dosis útiles y rutas para la administración en seres humanos.

La eficacia terapéutica/profiláctica y toxicidad puede determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, la DE<sub>50</sub> (la dosis terapéuticamente efectiva en el 50 % de

la población) y la  $DL_{50}$  (la dosis letal para el 50 % de la población). La relación de dosis entre efectos terapéuticos y tóxicos es el índice terapéutico, y puede expresarse como la proporción,  $DE_{50}/DL_{50}$ . Se prefieren las composiciones farmacéuticas que muestran índices terapéuticos grandes. Sin embargo, las composiciones farmacéuticas que muestran índices terapéuticos pequeños también se encuentran dentro del alcance de las realizaciones. Los datos obtenidos a partir de ensayos de cultivos celulares y estudios en animales pueden usarse para formular un intervalo de dosificaciones para uso en seres humanos. La dosificación contenida en dichas composiciones se encuentra preferentemente en el intervalo de concentraciones circulantes que incluyen una  $DE_{50}$  con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada, la sensibilidad del paciente, y la vía de administración.

Más específicamente, las concentraciones máximas en plasma ( $C_{m\acute{a}x}$ ) pueden estar en el intervalo de aproximadamente 65  $\mu M$  a aproximadamente 115  $\mu M$ , o de aproximadamente 75  $\mu M$  a aproximadamente 105  $\mu M$ , o de aproximadamente 85  $\mu M$  a aproximadamente 95  $\mu M$ , o de aproximadamente 85  $\mu M$  a aproximadamente 90  $\mu M$  dependiendo de la vía de administración. Una orientación en referencia a dosificaciones particulares y métodos de dispensación se proporciona en la bibliografía y están disponibles de manera general para los expertos en la técnica. En general, la dosis estará en el intervalo de aproximadamente 100 mg/día a aproximadamente 10 g/día, o de aproximadamente 200 mg a aproximadamente 5 g/día o de aproximadamente 400 mg a aproximadamente 3 g/día o de aproximadamente 500 mg a aproximadamente 2 g/día en dosis unitarias, divididas o continuas para un paciente que pese entre aproximadamente 40 a aproximadamente 100 kg (dicha dosis puede ajustarse para pacientes por encima o por debajo de este intervalo de peso, particularmente para niños de menos de 40 kg). La dosis estará generalmente en intervalo de aproximadamente 25 mg/kg a aproximadamente 300 mg/kg de peso corporal por día.

La dosificación exacta se determinará por el médico, a la vista de factores relacionados con el sujeto que requiere tratamiento. La dosificación y administración se ajustan para proporcionar niveles suficientes del principio activo (o principios activos) o para mantener el efecto deseado. Los factores que pueden tenerse en cuenta incluyen la gravedad del estado de enfermedad, salud general del sujeto, edad, peso, y sexo del sujeto, la dieta, tiempo y frecuencia de administración, combinación (o combinaciones) de fármacos, reacciones de sensibilidad, y tolerancia/respuesta a la terapia. Las composiciones farmacéuticas de acción prolongada pueden administrarse dos veces al día, una vez al día, una vez cada dos días, tres veces a la semana, dos veces a la semana, cada 3 o 4 días, o cada semana dependiendo de la semivida y velocidad de eliminación de la formulación particular. Por ejemplo, una composición farmacéutica puede contener una cantidad de un compuesto como se describe en el presente documento que se selecciona para administración a un paciente en una pauta seleccionada entre: dos veces al día, una vez al día, una vez cada dos días, tres veces a la semana, dos veces a la semana, y una vez a la semana.

Se apreciará que el tratamiento, tal como se describe en el presente documento, incluye prevenir una enfermedad, mejorar los síntomas, frenar la progresión de la enfermedad, revertir los daños, o curar una enfermedad.

Tratar una afección inflamatoria puede dar como resultado un aumento del tiempo de supervivencia de una población de sujetos tratados en comparación con una población de sujetos no tratados. Preferentemente, el tiempo de supervivencia media se aumenta en más de aproximadamente 30 días; más preferentemente, en más de aproximadamente 60 días; más preferentemente, en más de aproximadamente 90 días; y aún más preferentemente en más de aproximadamente 120 días. Un aumento en el tiempo de supervivencia de una población puede medirse mediante cualquier medio reproducible. En un aspecto preferido, un aumento en el tiempo medio de supervivencia de una población puede medirse, por ejemplo, calculando para una población la duración media de supervivencia después del inicio del tratamiento con un compuesto activo. Un aumento en la supervivencia media de una población también puede medirse, por ejemplo, calculando para una población la duración media de supervivencia después completar un primer ciclo del tratamiento con un compuesto activo.

Tratar una afección inflamatoria da como resultado una disminución de la tasa de mortalidad de una población de sujetos tratados en comparación con una población de sujetos que reciben solo transportador. Tratar una afección inflamatoria puede tener como resultado una disminución de la tasa de mortalidad de una población de sujetos tratados en comparación con una población no tratada. Tratar una afección inflamatoria puede dar como resultado una disminución de la tasa de mortalidad de una población de sujetos tratados en comparación con una población que recibe monoterapia con un fármaco que no es un compuesto de las realizaciones, o una sal farmacéuticamente aceptable, metabolito, análogo o derivado del mismo. Preferentemente, la tasa de mortalidad se reduce en más de aproximadamente un 2 %; más preferentemente, en más de aproximadamente un 5 %; más preferentemente, en más de aproximadamente un 10 %; y lo más preferentemente, en más de aproximadamente un 25 %. Una disminución en la tasa de mortalidad de una población de sujetos tratados puede medirse mediante cualquier medio reproducible. Una disminución en la tasa de mortalidad de una población puede medirse, por ejemplo, calculando para una población el número medio de muertes relacionadas con la enfermedad por unidad de tiempo después del inicio del tratamiento con un compuesto activo. En otro aspecto preferido, una disminución en la tasa de mortalidad de una población también puede medirse, por ejemplo, calculando para una población el número medio de muertes relacionadas con la enfermedad por unidad de tiempo después de terminar un primer ciclo de tratamiento con un compuesto activo.

Tratar una afección inflamatoria puede dar como resultado una disminución del crecimiento de un tumor. Preferentemente, después del tratamiento, la tasa de crecimiento del tumor se reduce en al menos aproximadamente

un 5 % en relación a un número antes del tratamiento; más preferentemente, la tasa de crecimiento del tumor se reduce en al menos aproximadamente un 10 %; más preferentemente, se reduce en al menos aproximadamente un 20 %; más preferentemente, se reduce en al menos aproximadamente un 30 %; más preferentemente, se reduce en al menos aproximadamente un 40 %; más preferentemente, se reduce en al menos aproximadamente un 50 %; incluso más preferentemente, se reduce en al menos un 60 %; y lo más preferentemente, se reduce en al menos aproximadamente un 75 %. La tasa de crecimiento tumoral puede medirse mediante cualquier medio de medida reproducible. La tasa de crecimiento tumoral se mide de acuerdo con un cambio en el diámetro del tumor por unidad de tiempo.

Tratar una afección inflamatoria da como resultado una reducción en la tasa de proliferación celular. Preferentemente, después del tratamiento, la tasa de proliferación celular se reduce en al menos aproximadamente un 5 %; más preferentemente, en al menos aproximadamente un 10 %; más preferentemente, en al menos aproximadamente un 20 %; más preferentemente, en al menos aproximadamente un 30 %; más preferentemente, en al menos aproximadamente un 40 %; más preferentemente, en al menos aproximadamente un 50 %; incluso más preferentemente, en al menos aproximadamente un 60 %; y lo más preferentemente, en al menos aproximadamente un 75 %. La tasa de proliferación celular puede medirse mediante cualquier medio de medida reproducible. La tasa de proliferación celular puede medirse, por ejemplo, midiendo el número de células en división en una muestra de tejido por unidad de tiempo.

Tratar una afección inflamatoria da como resultado una reducción en la proporción de células en proliferación. Preferentemente, después del tratamiento, la proporción de células en proliferación se reduce en al menos aproximadamente un 5 %; más preferentemente, en al menos aproximadamente un 10 %; más preferentemente, en al menos aproximadamente un 20 %; más preferentemente, en al menos aproximadamente un 30 %; más preferentemente, en al menos aproximadamente un 40 %; más preferentemente, en al menos aproximadamente un 50 %; incluso más preferentemente, en al menos aproximadamente un 60 %; y lo más preferentemente, en al menos aproximadamente un 75 %. La proporción de células en proliferación puede medirse mediante cualquier medio de medida reproducible. La proporción de células en proliferación puede medirse, por ejemplo, cuantificando el número de células en división en relación al número de células que no están en división en una muestra de tejido. La proporción de células en proliferación puede ser equivalente al índice mitótico.

Tratar una afección inflamatoria da como resultado una disminución en el tamaño de un área o zona de proliferación celular. Preferentemente, después del tratamiento, el tamaño de un área o zona de proliferación celular se reduce en al menos un 5 % en relación a su tamaño antes del tratamiento; más preferentemente, se reduce en al menos aproximadamente un 10 %; más preferentemente, se reduce en al menos aproximadamente un 20 %; más preferentemente, se reduce en al menos aproximadamente un 30 %; más preferentemente, se reduce en al menos aproximadamente un 40 %; más preferentemente, se reduce en al menos aproximadamente un 50 %; incluso más preferentemente, se reduce en al menos aproximadamente un 60 %; y lo más preferentemente, se reduce en al menos aproximadamente un 75 %. El tamaño de un área o zona de proliferación celular puede medirse mediante cualquier medio de medida reproducible. El tamaño de un área o zona de proliferación celular puede medirse como un diámetro o ancho de un área o zona de proliferación celular.

Los métodos descritos en el presente documento pueden incluir identificar un sujeto que necesite tratamiento. En una realización preferida, los métodos incluyen identificar a un mamífero que necesite tratamiento. Los métodos incluyen identificar a un ser humano que necesite tratamiento. Identificar a un sujeto que necesite tratamiento puede lograrse mediante cualquier medio que indique que a un sujeto que pueda beneficiarse del tratamiento. Por ejemplo, identificar a un sujeto que necesite tratamiento puede ocurrir mediante diagnóstico clínico, pruebas de laboratorio, o por cualquier otro medio conocido para los expertos en la técnica, incluyendo cualquier combinación de medios de identificación.

Los compuestos de la invención pueden formularse en composiciones farmacéuticas, si se desea, y pueden administrarse mediante cualquier vía que permite el tratamiento de la enfermedad o afección. Una vía de administración preferida es la administración oral. La administración puede tomar la forma de una administración monodosis, o el compuesto de las realizaciones puede administrarse durante un periodo de tiempo, ya sea en dosis divididas o en una formulación o método de administración de liberación continua (por ejemplo, una bomba). Independientemente del modo en que los compuestos de las realizaciones se administran al sujeto, las cantidades de compuesto administrado y la vía de administración elegida deben seleccionarse para permitir un tratamiento eficaz de la enfermedad o afección.

Los métodos descritos en el presente documento también incluyen el uso de un compuesto o compuestos como se describen en el presente documento junto con uno o más agentes terapéuticos para el tratamiento de afecciones patológicas. Por tanto, por ejemplo, la combinación de principios activos puede: (1) coformularse y administrarse o dispensarse de manera simultánea en una formulación combinada; (2) dispensarse de manera alterna o en paralelo como formulaciones separadas; o (3) mediante cualquier otra pauta de terapia de combinación conocida en la técnica. Cuando se dispensa en terapia alterna, los métodos descritos en el presente documento pueden comprender administrar o suministrar los principios activos de manera secuencial, por ejemplo, en soluciones, emulsiones, suspensiones, comprimidos, píldoras o cápsulas separadas, o mediante inyecciones diferentes en jeringuillas separadas. En general, durante el tratamiento alternativo, una dosificación eficaz de cada principio activo se administra

secuencialmente, es decir, en serie, mientras que en una terapia simultánea, las dosificaciones eficaces de dos o más principios activos se administran juntas. También pueden usarse varias secuencias de terapia de combinación intermitente.

5 Se contemplan las pruebas diagnósticas. Por ejemplo, puede tomarse una muestra de biopsia de tejido de un sujeto que padece una afección inflamatoria, por ejemplo, una afección asociada a p38 o asociada a citocinas. Puede ensayarse la muestra de biopsia para determinar el nivel de actividad de p38 (o niveles de citocina) presentes en la muestra; la muestra puede a continuación ponerse en contacto con un compuesto seleccionado de las realizaciones, y medirse la actividad de p38 (o niveles de citocina) para determinar si el compuesto tiene un efecto deseado (por ejemplo, inhibición de p38 o actividad de citocina con una  $CE_{50}$  en el intervalo de aproximadamente 100  $\mu$ M y aproximadamente 1000  $\mu$ M, preferentemente de aproximadamente 50  $\mu$ M a aproximadamente 650  $\mu$ M). Dicha prueba puede usarse para determinar si el tratamiento con dicho compuesto es probable que sea efectivo en ese sujeto. Como alternativa, la muestra puede ponerse en contacto con un compuesto marcado (por ejemplo, un compuesto marcado fluorescentemente, o un compuesto marcado radiactivamente) y la muestra examinarse a continuación y detectarse la señal fluorescente o radiactiva para determinar la distribución de p38 en la muestra de tejido. También pueden usarse muestras de biopsia repetidas tomadas durante el transcurso del tratamiento para estudiar la eficacia del tratamiento. Otras pruebas diagnósticas que usen los compuestos descritos en el presente documento serán evidentes para un experto habitual en la técnica a la luz de las enseñanzas de esta memoria descriptiva.

20 Los ejemplos incluyen métodos para determinar la presencia, localización, o cantidad, o cualquier combinación de las mismas de proteína p38 en una célula o muestra de tejido. Los métodos incluyen: a) poner en contacto la célula o muestra de tejido con un compuesto de las realizaciones en condiciones que permitan que el compuesto pueda unirse a al menos una MAPK p38; y b) determinar la presencia, localización, o cantidad, o cualquier combinación de las mismas del compuesto en la célula o muestra de tejido, determinando por lo tanto la presencia, localización, o cantidad, o cualquier combinación de las mismas de la al menos una MAPK p38 en la célula o muestra de tejido. Determinar la presencia, localización, o cantidad, o cualquier combinación de las mismas del compuesto en la célula o muestra de tejido puede llevarse a cabo mediante cualquier medio que revele la presencia, localización, o cantidad, o cualquier combinación de las mismas del compuesto en la célula o tejido. Por ejemplo, como se describe anteriormente, pueden usarse medios de marcaje fluorescente o radiactivo. Los métodos adicionales para determinar la presencia, localización, o cantidad, o cualquier combinación de las mismas del compuesto serán evidentes para un experto en la técnica.

También se describen en el presente documento métodos para determinar: (1) si un compuesto será un agente terapéutico útil para tratar a un sujeto que padece una afección inflamatoria, o (2) la gravedad de la enfermedad o (3) el transcurso de la enfermedad durante el tratamiento con un agente modificador de la enfermedad. Los métodos incluyen: a) obtener una célula o muestra del tejido del sujeto antes, durante y después de la terminación del tratamiento con un compuesto como se describe en el presente documento u otro agente modificador de la enfermedad; b) poner en contacto la muestra con el compuesto; y c) determinar la cantidad de compuesto que se une a la muestra, en el que la unión a MAPK p38 por el compuesto está relacionada con la cantidad de MAPK p38 en la muestra.

Ejemplos específicos de enfermedades contempladas para ser tratadas por los compuestos y métodos descritos en el presente documento

#### 45 EPOC

La enfermedad pulmonar oclusiva crónica (EPOC) se caracteriza por un proceso inflamatorio crónico en el pulmón que incluye (1) número aumentado de células inflamatorias (neutrófilos, macrófagos y linfocitos T SD8+) en las vías aéreas y parénquima, (2) expresión de citocinas inflamatorias y quimiocinas aumentada, y (3) número de proteasas aumentado (elastasas, catepsinas, y metaloproteasas de matriz, MMP). Se cree que la producción y acción de muchos mediadores potenciales de la inflamación de las vías aéreas es dependiente de la cascada de MAPK inducida por estrés o de cinasa p38. Varios informes apoyan la asociación de la activación de la cinasa p38 con tan gran cantidad de eventos pulmonares: expresión de molécula de adhesión intercelular 1 inducida por LPS y TNF $\alpha$  en células endoteliales microvasculares pulmonares, activación de MMP-9, estimulación de células arteriales pulmonares inducida por hipoxia, expresión de IL-8 en células epiteliales bronquiales inducida por hiperosmolaridad, y tráfico y supervivencia potenciados de eosinófilos.

Trifillieff et al. (2005 *Brit J Pharmacol* **144**:1002-10) comunicaron que CGH2466, un antagonista de receptor de adenosina combinado, MAPK p38 e inhibidor de fosfodiesterasa tipo 4 mostraron potentes actividades antiinflamatorias *in vitro* e *in vivo* en enfermedades como asma y EPOC. Underwood et al. (2000 *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **279**: L895-L902) demostraron que el potente y selectivo inhibidor de MAPK p38, SB239063, redujo la producción de citocinas proinflamatorias, incluyendo IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, e IL-8, que se han relacionado con fibrosis de las vías aéreas debido a su capacidad para regular la proliferación de fibroblastos y producción de matriz; que conduce a un tráfico y activación de neutrófilos disminuido en el pulmón. Con anterioridad, se descubrió que el mismo compuesto era capaz de alterar las respuestas asociadas con la fibrosis crónica inducida por bleomicina. Esta actividad inhibidora fue selectiva para las isoformas  $\alpha$  y  $\beta$  de p38. Los compuestos y métodos descritos en el presente



documento son útiles para el tratamiento de EPOC.

### **Fibrosis pulmonar**

5 La fibrosis pulmonar, también llamada fibrosis pulmonar idiopática (FPI), fibrosis pulmonar difusa intersticial, fibrosis pulmonar inflamatoria, o alveolitis fibrosante, es un trastorno inflamatorio del pulmón y un grupo heterogéneo de afecciones caracterizadas por una formación anormal de tejido fibroso entre los alveolos causado por la alveolitis que comprende una infiltración celular inflamatoria en los septos alveolares que dan como resultado la fibrosis. Los efectos de FPI son crónicos, progresivos, y a menudo fatales. La activación de MAPK p38 se ha demostrado en el pulmón de  
10 pacientes con fibrosis pulmonar. Un número de investigaciones acerca de la fibrosis pulmonar han indicado que la expresión sostenida y aumentada de algunas citocinas en el pulmón son relevantes para el reclutamiento de células inflamatorias y la acumulación de componentes de la matriz extracelular seguido del remodelado de la arquitectura del pulmón. En particular, se demostró que las citocinas inflamatorias, tales como TNF- $\alpha$  e interleucina IL-1 $\beta$ , juegan papeles centrales en la formación de neumonitis y fibrosis pulmonar. Además, las citocinas profibróticas, tales como  
15 TGF- $\beta$  y CTGF, también juegan papeles cruciales en la patogénesis de la fibrosis pulmonar. Matsuoka et al. (2002 Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 283:L103-L112) han demostrado que un inhibidor de p38, FR-167653, mejora la fibrosis pulmonar murina inducida por bleomicina. Además, la pirfenidona (5-metil-1-fenil-2-(1H)-piridona, se encontró que un compuesto con efectos antiinflamatorios, antioxidantes y antifibróticos combinados es efectivo en modelos experimentales de fibrosis pulmonar así como en estudios clínicos (Raghu et al., 1999 Am J Respir Crit Care Med  
20 159:1061-1069; Nagai et al. 2002 Intern Med 41:1118-1123; Gahl et al. 2002 Mol Genet Metab 76:234-242; Azuma et al. 2002 Am J Respir Crit Care Med 165:A729). Los compuestos de la invención son útiles en el tratamiento de fibrosis pulmonar, tal como FPI.

### **Bronquiolitis obliterante y síndrome de bronquiolitis obliterante**

25 La bronquiolitis obliterante, y su afección clínica correlacionada síndrome de bronquiolitis obliterante, se caracterizan por una obstrucción de las vías aéreas pulmonares mediante la obliteración de las vías aéreas pulmonares pequeñas. En la bronquiolitis obliterante, el examen patológico encuentra característicamente lesiones que obstruyen u obliteran las vías aéreas pequeñas en el pulmón. Estas lesiones son tejido granular o fibromixóide y tejido cicatrizal submucosal  
30 denso. Las lesiones progresan a partir de una inflamación prolongada, anormal o aberrante de estructuras epiteliales y localizadas en los epitelios de las vías aéreas pequeñas, mediadas por citocinas proinflamatorias, tales como TNF- $\alpha$  y dan como resultado una fibroproliferación excesiva. La obliteración de las vías aéreas pulmonares pequeñas conduce de manera progresiva a la obstrucción del flujo aéreo, caracterizada por una pérdida progresiva en el volumen expiratorio forzado en un segundo (VEF<sub>1</sub>), y se acompaña frecuentemente de infecciones recurrentes del tracto respiratorio inferior y colonización del tejido pulmonar por microorganismos patógenos.  
35

El síndrome de bronquiolitis obliterante afecta a un 50-60 % de los pacientes que sobreviven cinco años después de la cirugía de trasplante de pulmón, y la supervivencia a los cinco años después de la aparición del síndrome de bronquiolitis obliterante es solo del 30-40 %. Los pacientes con trasplante de pulmón que padecen síndrome de  
40 bronquiolitis obliterante a menudo responden débilmente a una inmunosupresión aumentada. En pacientes con fibrosis pulmonar idiopática, la supervivencia al síndrome de bronquiolitis obliterante es más corta que en pacientes con enfisema. Los compuestos de la invención son útiles en el tratamiento del síndrome de bronquiolitis obliterante.

### **Fibrosis de aloinjerto crónica**

45 El rechazo de aloinjerto es una gran preocupación en el control de trasplantes. Una de las causas principales de rechazo de aloinjertos es la disfunción de aloinjerto crónica. Las señales de identidad de la disfunción crónica del aloinjerto son la inflamación crónica y la fibrosis crónica, ambas asociadas con la producción de citocinas inflamatorias y factores de crecimiento. La mediación de citocinas inflamatorias y factores de crecimiento, que dan como resultado  
50 en particular la interrupción de la producción de colágeno y TGF, es útil para el tratamiento de fibrosis crónica del aloinjerto. La expresión "fibrosis crónica del aloinjerto", como se usa en el presente documento, pretende incluir tanto la inflamación crónica como la fibrosis crónica asociada con la fibrosis crónica del aloinjerto. Los compuestos de la invención son útiles en el tratamiento de fibrosis crónica del aloinjerto,

### **Fibrosis renal**

Independientemente a la naturaleza de la lesión inicial, la fibrosis renal se considera la vía final común por la que la enfermedad renal progresa a la etapa final del fallo renal. Stambé et al. (2004 J Am Soc Nephrol 15:370-379) probaron un inhibidor de la forma activa (fosforilada) de p38, NPC 31169, desarrollada por Scios Inc. (San Francisco, CA) en un  
60 modelo de rata de fibrosis renal, y comunicaron una reducción significativa de la fibrosis renal determinada por volumen intersticial, deposición de colágeno IV, y aumento de los niveles de ARNm de tejido conectivo. Los compuestos de la invención son útiles en el tratamiento de fibrosis renal.

## Leiomioma

Los leiomiomas o fibroides uterinos son los tumores pélvicos más comunes en mujeres sin fármacos terapéuticos de larga duración efectivos disponibles. Los leiomiomas se caracterizan por una proliferación celular aumentada y fibrosis tisular. Se probó la pirfenidona en la proliferación celular y expresión de colágeno en células musculares lisas miometriales y de leiomioma, y se observó que era un inhibidor eficaz de la proliferación celular miometrial y de leiomioma (Lee et al., 1998 J Clin Endocrinol Metab 83:219-223). Los compuestos de la invención son útiles en el tratamiento de leiomiomas.

## Fibrosis endomiocárdica

La fibrosis endomiocárdica (FEM) es un trastorno caracterizado por el desarrollo de una cardiomiopatía restrictiva. La FEM se considera a veces parte de un espectro de un solo proceso de enfermedad que incluye la endocarditis de Löffler (fibrosis endomiocárdica eosinofílica no trópica o endocarditis parietal fibroplástica con eosinofilia). En la FEM, el proceso subyacente produce fibrosis parcheada de la superficie endocárdica del corazón, lo que conduce a un rendimiento reducido y, en última instancia, a una fisiología restrictiva ya que la superficie endomiocárdica está cada vez más comprometida. La fibrosis endomiocárdica involucra principalmente a los tractos de flujo de entrada de los ventrículos derecho e izquierdo y puede afectar a las válvulas atrioventriculares, lo que conduce a una regurgitación de las válvulas tricúspide y mitral. Se ha demostrado que la activación de MAPK contribuye al remodelado estructural atrial arritmogénico en la FEM. Los compuestos de la invención son útiles en el tratamiento y/o prevención de la fibrosis endomiocárdica.

## Otras enfermedades inflamatorias

Varias enfermedades autoinmunes y enfermedades asociadas con la inflamación crónica, así como respuestas agudas, se han relacionado con la activación de MAP cinasa p38 y la sobreexpresión o desregulación de citocinas proinflamatorias. Estas enfermedades incluyen, pero sin limitación: artritis reumatoide; espondilitis reumatoide; artrosis; gota, otras afecciones artríticas; septicemia; choque séptico; choque endotóxico; septicemia por bacterias gram negativas; síndrome de choque tóxico; asma; síndrome de dificultad respiratoria del adulto; enfermedad pulmonar obstructiva crónica; inflamación pulmonar crónica; enfermedad inflamatoria del intestino; enfermedad de Crohn; psoriasis; eccema; colitis ulcerosa; fibrosis pancreática; fibrosis hepática; enfermedad renal aguda y crónica; síndrome del intestino irritable; piresis; restenosis; malaria cerebral; lesión por infarto e isquémica; traumatismo neurológico; enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington; enfermedad de Parkinson; dolor agudo y crónico; rinitis alérgica; conjuntivitis alérgica; insuficiencia cardíaca crónica; síndrome coronario agudo; caquexia; malaria; lepra; leishmaniasis; enfermedad de Lyme; síndrome de Reiter; sinovitis aguda; degeneración muscular, bursitis; tendinitis; tenosinovitis; síndrome del disco intervertebral herniado, roto o prolapsado; osteopetrosis; trombosis, cáncer; restenosis; silicosis; sarcosis pulmonar; enfermedades de resorción ósea, tales como osteoporosis, reacción de hospedador contra injerto; y enfermedades autoinmunes, tales como esclerosis múltiple, lupus y fibromialgia; SIDA y otras enfermedades virales tales como Herpes Zoster, Herpes Simplex I o II, virus de la gripe o citomegalovirus; y diabetes mellitus.

Muchos estudios han mostrado que reducir la actividad de MAP cinasa p38, sus activadores cadena arriba o sus efectores cadena abajo, ya sea a través de medios genéticos o químicos, mitiga la respuesta inflamatoria y previene o minimiza el daño de tejidos (véase, por ejemplo, English, et al., 2002 Trends Pharmacol Sci 23:40-45; y Dong et al. 2002 Annu Rev Immunol 20:55-72). Por tanto, los inhibidores de la actividad de p38, que también muestran un exceso o una desregulación de la producción de citocinas pueden inhibir a más de una sola citocina proinflamatoria, pueden ser útiles como agentes antiinflamatorios y como agentes terapéuticos. Además, el gran número de enfermedades asociadas con respuestas inflamatorias asociadas con MAP cinasa p38 indica que hay una necesidad de métodos efectivos para tratar estas afecciones.

Enfermedad cardiovascular. La inflamación y activación/infiltración de leucocitos juegan un papel principal en la iniciación y progresión de enfermedades cardiovasculares, incluyendo aterosclerosis e insuficiencia cardíaca. La inhibición de la vía de proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) p38 aguda atenúa el daño tisular y la acumulación de leucocitos en la lesión isquémica/de reperusión en el miocardio. Los compuestos y métodos descritos en el presente documento son útiles para tratar la enfermedad cardiovascular.

Esclerosis múltiple. La inflamación en el sistema nervioso central sucede en enfermedades, tales como la esclerosis múltiple, y conduce a una disfunción y destrucción de axones. Las observaciones tanto *in vitro* como *in vivo* han demostrado un papel importante del óxido nítrico (NO) como intermediario de la axonopatía inflamatoria. La MAP cinasa p38 se activa por exposición a NO y se ha demostrado que la inhibición de la señalización de p38 conduce a efectos de supervivencia axonal y neuronal. OCM e IGF-1 redujeron la activación de p38 en células corticales expuestas a NO y mejoraron la supervivencia axonal en cultivos expuestos a NO, un proceso dependiente de proteína cinasa activada por mitógeno/señalización de cinasa relacionada con señal extracelular. Los compuestos y métodos descritos en el presente documento son útiles para tratar la esclerosis múltiple.

Disfunción primaria del injerto. La inflamación no específica se asocia con una disfunción primaria del injerto (PNF).

El daño inflamatorio de los islotes está mediado, al menos en parte, por citocinas proinflamatorias, tales como interleucina-1  $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) y factor de necrosis del tumor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) producidas por macrófagos residentes en islotes. Se sabe que la vía de p38 está involucrada en la producción de citocinas en las células del linaje de monocitos-macrófagos. La inhibición de la vía de p38 por un inhibidor químico de p38, SB203580, suprime la producción de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  en islotes de ser humano expuestos a lipopolisacárido (LPS) y/o citocinas inflamatorias. Aunque IL-1 $\beta$  se produce principalmente por macrófagos residentes, se descubrió que las células ductales y células endoteliales vasculares de islote son otra fuente celular de IL-1 $\beta$  en células aisladas de ser humano. SB203580 también inhibió la expresión de la sintasa inducible por óxido nítrico (iNOS) y de ciclooxigenasa-2 (COX-2) en los islotes tratados. Además, los islotes humanos tratados con SB203580 durante 1 h antes del trasplante mostraron una función del injerto mejorada de manera significativa. Los compuestos y métodos descritos en el presente documento son útiles para mejorar la supervivencia del injerto en trasplante clínico de islotes.

Lesión renal aguda. El cisplatino es un agente quimioterapéutico importante, pero puede causar lesión renal aguda. Una parte de esta lesión renal aguda está mediada a través del factor de necrosis del tumor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). El cisplatino activa la MAPK p38 e induce la apoptosis en células cancerosas. La activación de MAPK p38 conduce a una producción aumentada de TNF- $\alpha$  en la lesión isquémica y en macrófagos. *In vitro*, el cisplatino causó una activación dependiente de la dosis de MAPK p38 en las células tubulares proximales. La inhibición de la activación de MAPK p38 condujo a la inhibición de la producción de TNF- $\alpha$ . *In vivo*, los ratones tratados con una sola dosis de cisplatino desarrollaron una disfunción renal severa, que se acompañó de un aumento en la actividad de MAPK p38 y un aumento en la infiltración de leucocitos. Sin embargo, los animales tratados con un inhibidor de MAPK p38 análogo de SKF86002 con cisplatino mostraron una menor disfunción renal, un daño histológico menos grave y menos leucocitos, en comparación con los animales tratados con cisplatino+vehículo. Los compuestos y métodos descritos en el presente documento son útiles para prevenir la lesión renal aguda.

Periodontitis. El mediador proinflamatorio bradicinina (BK) estimula la producción de interleucina-8 (IL-8) en los fibroblastos gingivales humanos *in vitro* y juega un papel importante en la patogénesis de varias enfermedades inflamatorias, incluyendo la periodontitis. El inhibidor de proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) específica para p38, SB 203580 redujo la producción de IL-8 estimulada por la combinación de BK e IL-1 $\beta$  así como la producción de IL-8 estimulada por IL-1 $\beta$ . Los compuestos y métodos descritos en el presente documento son útiles para tratar o prevenir la periodontitis.

### Composiciones farmacéuticas

Aunque es posible administrar los compuestos de la invención de manera individual, puede ser preferible formular los compuestos como composiciones farmacéuticas. Como tales, en otro aspecto más, se proporcionan composiciones farmacéuticas útiles en los métodos de la invención. Más particularmente, las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden ser útiles, *entre otras cosas*, para tratar o prevenir afecciones inflamatorias, por ejemplo, afecciones asociadas con la actividad de p38 o la actividad de citocina o cualquier combinación de las mismas. Una composición farmacéutica es cualquier composición que puede administrarse *in vitro* o *in vivo* o de ambas formas a un sujeto para tratar o mejorar una afección. Una composición farmacéutica puede administrarse *in vivo*. Un sujeto puede incluir una o más células o tejidos, u organismos. Un sujeto preferido es un mamífero. Un mamífero incluye cualquier mamífero, tales como, a modo de ejemplo no limitante, ganado, cerdos, ovejas, cabras, caballos, camellos, búfalos, gatos, perros, ratas, ratones, y seres humanos. Un sujeto altamente preferido es un ser humano.

En una realización, las composiciones farmacéuticas pueden formularse con excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como transportadores, disolventes, estabilizantes, adyuvantes, diluyentes, etc., dependiendo del modo concreto de administración y forma de dosificación. Las composiciones farmacéuticas deben generalmente formularse para lograr un pH fisiológico compatible, y puede estar en el intervalo de un pH de aproximadamente 3 a un pH de aproximadamente 11, preferentemente de aproximadamente pH 3 a aproximadamente pH 7, dependiendo de la formulación y vía de administración. En realizaciones alternativas, se puede preferir ajustar el pH a un intervalo de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 8. Más particularmente, las composiciones farmacéuticas pueden comprender una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva de al menos un compuesto de la invención, junto con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender una combinación de los compuestos descritos en el presente documento, o pueden incluir un segundo principio activo útil en el tratamiento o prevención de una infección bacteriana (por ejemplo, agentes antibacterianos o antimicrobianos).

Las formulaciones, por ejemplo, para administración parenteral u oral, son normalmente sólidos, soluciones líquidas, emulsiones o suspensiones, mientras que las formulaciones inhalables para administración pulmonar son generalmente líquidos o polvos, prefiriéndose de manera general formulaciones en polvo. Una composición farmacéutica preferida también puede formularse como un sólido liofilizado que se reconstituye con un disolvente fisiológicamente compatible antes de la administración. Las composiciones farmacéuticas alternativas pueden formularse como jarabes, cremas, pomadas, comprimidos, y similares.

La expresión "excipiente farmacéuticamente aceptable" se refiere a un excipiente para la administración de un agente farmacéutico, tal como los compuestos descritos en el presente documento. La expresión se refiere a cualquier excipiente farmacéutico que puede administrarse sin toxicidad excesiva.

- 5 Los excipientes farmacéuticamente aceptables se determinan en parte por la composición particular que se está administrando, así como por el método particular usado para administrar la composición. Por consiguiente, hay una gran variedad de formulaciones adecuadas de composiciones farmacéuticas (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences).
- 10 Los excipientes farmacéuticos pueden ser moléculas transportadoras que incluyen macromoléculas grandes de metabolización lenta, tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, y partículas virales inactivas. Otros excipientes ejemplares incluyen antioxidantes, tales como ácido ascórbico; agentes quelantes, tales como el EDTA; hidratos de carbono, tales como dextrina, hidroxialquilcelulosa, hidroxialquilmethylcelulosa, ácido esteárico; líquidos, tales como aceites, agua, solución
- 15 salina, glicerol y etanol; agentes humectantes o emulsionantes; sustancias tamponadoras de pH; y similares. Los liposomas se incluyen también en la definición de excipientes farmacéuticamente aceptables.

- Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden formularse de cualquier forma adecuada para el método previsto de administración. Cuando el uso previsto es oral, pueden prepararse, por ejemplo,
- 20 comprimidos, trociscos, pastillas para chupar, suspensiones acuosas u oleosas, soluciones no acuosas, polvos dispersables o gránulos (incluyendo partículas micronizadas o nanopartículas), emulsiones, cápsulas duras o blandas, jarabes o elixires. Las composiciones previstas para uso oral pueden prepararse de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica para la fabricación de composiciones farmacéuticas, y dichas composiciones pueden contener uno o más agentes que incluyen agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes colorantes y agentes
- 25 conservantes, con el fin de proporcionar una preparación sabrosa.

- Los excipientes farmacéuticamente aceptables en particular adecuados para su uso junto con comprimidos incluyen, por ejemplo, diluyentes inertes, tales como celulosas, carbonato de calcio o de sodio, lactosa, fosfato de calcio o sodio; agentes disgregantes, tales como povidona reticulada, almidón de maíz, o ácido algínico; agentes aglutinantes, tales
- 30 como povidona, almidón, gelatina o goma arábiga; y agentes lubricantes, tal como estearato de magnesio, ácido esteárico o talco.

- Los comprimidos pueden estar sin revestir o pueden estar revestidos mediante técnicas conocidas que incluyen la microencapsulación para retrasar la desintegración y la adsorción en el tracto gastrointestinal y proporcionar por tanto una acción sostenida durante un periodo más largo. Por ejemplo, se puede emplear un material con retraso de tiempo tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo o con una cera,
- 35

- Las formulaciones para uso oral también pueden presentarse como cápsulas de gelatina dura, en las que el principio activo se mezcla con un diluyente sólido inerte, por ejemplo, celulosas, lactosa, fosfato de calcio o caolín, o como
- 40 cápsulas de gelatina blanda, en las que el principio activo se mezcla con medio no acuoso u oleoso, tal como glicerina, propilenglicol, polietilenglicol, aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva.

- Las composiciones farmacéuticas pueden formularse como suspensiones que comprenden un compuesto de las realizaciones mezclado con al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable para la fabricación de una
- 45 suspensión.

Las composiciones farmacéuticas pueden formularse como polvos dispersables y gránulos adecuados para la preparación de una suspensión mediante la adición de excipientes adecuados.

- 50 Los excipientes adecuados para su uso en conexión con suspensiones incluyen agentes de suspensión, tales como carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidroxipropil metilcelulosa, alginato sódico, polivinilpirrolidona, goma de tragacanto, goma arábiga, agentes dispersantes o humectantes tales como fosfátidos de origen natural (por ejemplo, lecitina), un producto de condensación de un óxido de alqueno con un ácido graso (por ejemplo, estearato de polioxietileno), un producto de condensación de óxido de etileno con un alcohol alifático de cadena larga (por ejemplo,
- 55 heptadecaetilenoxietanol), un producto de condensación de óxido de etileno con un éster parcial derivado de un ácido graso y un hexitol anhidro (por ejemplo, monooleato de polioxietilen sorbitán). Polisacáridos y compuestos similares a polisacáridos (por ejemplo, sulfato de dextrano); glucoaminoglucanos y compuestos similares a glucosaminoglucanos (por ejemplo, ácido hialurónico); y agentes espesantes, tales como carbomer, cera de abeja, parafina dura o alcohol cetílico. Las suspensiones pueden contener uno o más conservantes, tales como ácido acético, p-hidroxi-benzoato de metilo y/o de n-propilo; uno o más agentes colorantes; uno o más agentes aromatizantes; y uno o más agentes
- 60 edulcorantes, tales como sacarosa o sacarina.

- Las composiciones farmacéuticas también pueden estar en forma de emulsiones de aceite en agua. La fase oleosa puede ser un aceite vegetal, tal como aceite de oliva o aceite de cacahuete, un aceite mineral, tal como parafina líquida, o una mezcla de estas. Los agentes emulsionantes adecuados incluyen gomas de origen natural, tales como goma arábiga y goma de tragacanto; fosfátidas de origen natural, tales como lecitina de soja, ésteres o ésteres
- 65

parciales derivados de ácidos grasos; anhídridos de hexitol, tales como monooleato de sorbitán, y productos de condensación de estos ésteres parciales con óxido de etileno, tales como monooleato de polioxietilen sorbitán. Las emulsiones también pueden contener agentes edulcorantes y aromatizantes. Los jarabes y elixires pueden formularse con agentes edulcorantes, tales como glicerol, sorbitol o sacarosa. Dichas formulaciones pueden contener un emoliente, un conservante, un aromatizante o un agente colorante.

Adicionalmente, las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de una preparación inyectable estéril, tal como una emulsión acuosa o una suspensión oleaginosa inyectable estéril. Esta emulsión o suspensión puede formularse de acuerdo con la técnica conocida utilizando los agentes dispersantes y humectantes y los agentes de suspensión adecuados que se han citado anteriormente. La preparación inyectable estéril puede ser también una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable, tal como una solución en 1,2-propanodiol.

La preparación inyectable estéril también puede prepararse como un polvo liofilizado. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse están agua, solución de Ringer, y solución isotónica de cloruro sódico. Además, pueden usarse aceites estériles no volátiles como disolvente o medio de suspensión. Para este propósito, cualquier aceite blando no volátil puede emplearse, incluyendo mono o diglicéridos de síntesis. Además, se pueden usar igualmente ácidos grasos, tales como ácido oleico, en la preparación de los inyectables.

Para obtener una forma de dosificación estable soluble en agua de una composición farmacéutica, puede disolverse una sal farmacéuticamente aceptable de un compuesto descrito en el presente documento en una solución acuosa de un ácido orgánico o inorgánico, tal como solución de ácido succínico 0,3 M, o más preferentemente, ácido cítrico. Si no está disponible una sal soluble, el compuesto puede disolverse en un co-disolvente adecuado o combinación de co-disolventes. Los ejemplos de co-disolventes adecuados incluyen alcohol, propilenglicol, polietilenglicol 300, polisorbato 80, glicerina y similares en concentraciones en el intervalo de aproximadamente un 0 a aproximadamente un 60 % del volumen total. Como ejemplo, el compuesto activo se disuelve en DMSO y se diluye con agua.

La composición farmacéutica también puede estar en forma de solución de una forma de sal del principio activo en un vehículo acuoso adecuado, tal como agua, suero salino isotónico o solución de dextrosa. También se contemplan compuestos que se han modificado mediante sustituciones o adiciones de restos químicos o bioquímicos que los hacen más adecuados para su dispensación (por ejemplo, aumentan la solubilidad, bioactividad, palatabilidad, disminuyen las reacciones adversas, etc.), por ejemplo, mediante esterificación, glucosilación, PEGilación, etc.

Los compuestos descritos en el presente documento pueden formularse para administración oral en una formulación de base lipídica adecuada para compuestos de baja solubilidad. Las formulaciones de base lipídica pueden potenciar de manera general la biodisponibilidad oral de dichos compuestos.

Una composición farmacéutica preferida comprende una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva de un compuesto descrito en el presente documento, junto con al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable seleccionado del grupo que consiste en ácidos grasos de cadena media o ésteres de propilenglicol de los mismos (por ejemplo, ésteres de propilenglicol de ácidos grasos comestibles, tales como ácidos grasos caprílicos o cápricos) y tensioactivos farmacéuticamente aceptables, tales como polioxil 40 aceite de ricino hidrogenado.

Pueden añadirse ciclodextrinas como potenciadores de la solubilidad acuosa. Las ciclodextrinas preferidas incluyen derivados de hidroxipropilo, hidroxietilo, glucosilo, maltosilo y maltotiosilo de  $\alpha$ -,  $\beta$ -, y  $\gamma$ -ciclodextrina. Un potenciador de la solubilidad de ciclodextrina particularmente preferido es hidroxipropil-o-ciclodextrina (BPBC), que puede añadirse a cualquiera de las composiciones descritas anteriormente para mejorar adicionalmente las características de solubilidad en agua de los compuestos de las realizaciones. Las composiciones comprenden de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 20 % de hidroxipropil-o-ciclodextrina, más preferentemente, de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 15 % de hidroxipropil-o-ciclodextrina, y aún más preferentemente, de aproximadamente un 2,5 % a aproximadamente un 10 % de hidroxipropil-o-ciclodextrina. La cantidad de potenciador de solubilidad empleado dependerá de la cantidad del compuesto en la composición.

Una composición farmacéutica contiene una cantidad total del principio activo (o principios activos) suficiente para lograr un efecto terapéutico previsto. Más específicamente, en algunas realizaciones, la composición farmacéutica contiene una cantidad terapéuticamente efectiva (por ejemplo, una cantidad de un compuesto que modula a SAPK que es efectiva para la prevención o tratamiento de los síntomas de una enfermedad o afección inflamatoria, en la que el compuesto muestra una  $CE_{50}$  en el intervalo de aproximadamente 1  $\mu$ M a aproximadamente 1000  $\mu$ M, preferentemente de aproximadamente 50  $\mu$ M a aproximadamente 650  $\mu$ M, para la inhibición de al menos una MAPK p38). Las cantidades totales del compuesto que pueden combinarse con los materiales transportadores para producir una forma de dosificación unitaria variarán dependiendo del hospedador tratado y del modo particular de administración. Preferentemente, las composiciones se formulan de tal forma que se administra una dosis de entre 0,01 y 100 mg/kg de peso corporal/día de un compuesto que modula SAPK a un paciente que recibe las composiciones.

## EJEMPLO 1

Los compuestos se seleccionan por su capacidad para inhibir la fosforilación de ATF2 por MAP cinasa p38 *in vitro*. La capacidad de los compuestos para inhibir la fosforilación de ATF2 en este ensayo *in vitro* se correlaciona con la inhibición de MAP cinasa p38 y la expresión de TNF $\alpha$  *in vivo*, y es por lo tanto un indicador de actividad terapéutica *in vivo* potencial (Raingaud, J. et al. 1995 J. Biol. Chem. 270:7420-7426; Brinkman, M.N., et al., 1999 J. Biol. Chem. 274:30882-30886; y Fuchs, S.Y. et al. J. Biol. Chem. 275:12560-12564, 2000).

Todas las cinasas y el sustrato ATF2 se adquieren a través de Upstate (Charlottesville, VA). Las MAP cinasas p38 son proteínas de longitud completa humanas recombinantes con fusión GST amino-terminal, expresadas y purificadas a partir de *E. coli*. ATF2 es una proteína de fusión de GST que contiene los aminoácidos 19-96 de ATF2 humana expresados en *E. coli*. Todas las proteínas se alícuotan y almacenan a -80 °C.

Los ensayos de MAP cinasa p38 se efectúan usando un tampón de ensayo que contiene HEPES 25 mM, pH 7,5, 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, DTT 2 mM,  $\beta$ -glicerofosfato 20 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 0,1 mM, ATP 40  $\mu$ M y 1,25  $\mu$ M de ATF2, junto con 6 ng de proteína p38 $\alpha$ , 12 ng de proteína p38 $\beta$ , 1,5 ng de p38 $\gamma$ , o 0,4 ng de INK2 $\alpha$ 2. Los compuestos se diluyen en serie en DMSO y se usan 2  $\mu$ L de compuesto de ensayo a varias concentraciones. El control de vehículo recibe solo DMSO.

Los compuestos de ensayo se preincuban con 20  $\mu$ L de enzima en tampón de cinasa (HEPES 25 mM, pH 7,5, 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, DTT 2 mM,  $\beta$ -glicerofosfato 20 mM y Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 0,1 mM) a temperatura ambiente durante 15 minutos. Las reacciones se inician mediante la adición de 30  $\mu$ L de solución de sustrato para dar una concentración final de ATP 40  $\mu$ M y ATF2 1,25  $\mu$ M en tampón de cinasa. Las reacciones se incuban durante 30 minutos a 37 °C y se finalizan mediante la adición de 18  $\mu$ L de EDTA 200 mM. Se usa un método ELISA para medir la fosforilación de ATF3 en Thr 69. Se recubren placas de 96 pocillos de alta unión con 50  $\mu$ L de reacción de cinasa durante 1 h a 37 °C. Las placas recubiertas se lavan con 200  $\mu$ L de tampón de lavado (Tris HCl 25 mM, pH 8,3, glicina 192 mM, SDS al 0,1 % y Tween-20 al 0,05 %) tres veces. Las placas se lavan a continuación con SuperBlock en TBS (Pierce, 37535). Después del bloqueo, se incuban las placas con 50  $\mu$ L de anticuerpo de ratón anti-fosfo-ATF2 (Cell Signaling, 9221L, 1:500) durante 30 minutos a 37 °C.

Las placas se lavan a continuación tres veces con tampón de lavado antes de la incubación con 50  $\mu$ L de anticuerpo de cabra anticonejo conjugado a HRP (Cell Signaling, 7074, 1:500) durante 30 minutos a 37 °C. Las placas se lavan a continuación tres veces con tampón de lavado antes de la incubación con 50  $\mu$ L de TMB-ELISA Ultra (Pierce, 34028) durante 8 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se añaden 50  $\mu$ L de ácido fosfórico (1 M) para detener las reacciones y se lee la placa a 450 nm en un lector de placas SpectraMax 250.

Los compuestos inhiben la fosforilación de ATF2 en este ensayo *in vitro*. Los compuestos preferidos muestran valores de CE<sub>50</sub> de entre aproximadamente 1  $\mu$ M y aproximadamente 1000  $\mu$ M, preferentemente de aproximadamente 50  $\mu$ M a aproximadamente 650  $\mu$ M.

## EJEMPLO 2

Los compuestos se seleccionan por su capacidad para inhibir la liberación de TNF $\alpha$  por parte de células THP-1 estimuladas con lipopolisacárido (LPS) *in vitro*. La capacidad de los compuestos para inhibir la liberación de TNF $\alpha$  en este ensayo *in vitro* se correlaciona con la inhibición la actividad de p38 y TNF $\alpha$ , y es por lo tanto un indicador de actividad terapéutica *in vivo* potencial (Lee J. C. et al., 1993 Ann. N.Y. Acad. Sci. 696:149-170; y 1994 Nature 372:739-746).

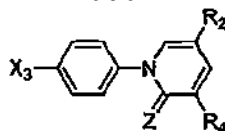
Las células THP-1 de ATCC (TIB202) se mantienen a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 % en medio RPMI 1640 (MediaTech, Herndon, VA) que contiene 4,5 g/L de glucosa, suplementado con suero fetal bovino al 10 %, penicilina/estreptomina al 1 % y  $\beta$ -mercaptoetanol 50  $\mu$ M.

Los compuestos de ensayo se disuelven inicialmente en medio RPMI con DMSO al 1 % (v/v). Los compuestos se diluyen en serie en medio RPMI para todas las diluciones posteriores. El ensayo se lleva a cabo en condiciones estériles. Se recogen y resuspenden las células THP-1 a una densidad de cultivo de 6-8 x 10<sup>5</sup> células/ml en el medio RPMI a 10<sup>6</sup> células/ml. Se añaden 100  $\mu$ L de células resuspendidas a cada pocillo, que contienen 100  $\mu$ L de un compuesto de ensayo. Los compuestos de ensayo se preparan a una concentración del doble de la concentración final. La concentración final de DMSO no es mayor del 0,5 % (v/v). Las células se preincuban con compuesto durante 60 minutos a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 % antes de la estimulación con lipopolisacárido (LPS) (Sigma L-2880, 4 mg/ml de solución madre en PBS). La concentración final de LPS en cada pocillo es 10 o 30  $\mu$ g/ml para liberación de TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , respectivamente. Las suspensiones de células de control reciben solo vehículo de PBS. Las mezclas de células se incuban durante 18 o 48 horas para la liberación de TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , respectivamente. Se retiran 150  $\mu$ L de sobrenadantes y se transfieren a una placa nueva y se almacenan a -20 °C hasta el análisis posterior. Los niveles de TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  se miden usando kits ELISA. Se usa una luminiscencia como lector de placas. El análisis se efectúa por regresión no lineal para generar una curva de respuesta a dosis. El valor de CE<sub>50</sub> calculado es la concentración del compuesto de ensayo que causa una disminución del 50 % en los niveles de TNF $\alpha$  o IL-1 $\beta$ .

Los compuestos inhiben la liberación de TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  o tanto TNF $\alpha$ , como IL-1 $\beta$  en este ensayo *in vitro*. Los compuestos preferidos muestran valores de CE<sub>50</sub> para TNF $\alpha$  y/o IL-1 $\beta$  de entre aproximadamente 1  $\mu$ M y aproximadamente 1000  $\mu$ M, preferentemente de aproximadamente 50  $\mu$ M a aproximadamente 650  $\mu$ M. Los datos se proporcionan en la Tabla 2 a continuación.

5

Tabla 2



Nº <sup>1</sup>	X3	R2	R4	Z	TNF CE <sub>50</sub> ( $\mu$ M) <sup>2</sup>	Toxicidad
* 13	-H		-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 <sub>3</sub>	-H	O	B	D
* 12	-F	-CF <sub>3</sub>	-H	O	C	D
5	-OH	-CH <sub>3</sub>	-H	O	A	≥ 1 mM
* 1	-H	-CH <sub>2</sub> OH,	-H	O	B	D
* 2	-H	-COOH	-H	O	C	D
* 3	-H	-glucuronida	-H	O	C	D
* 6	-H	-CH <sub>2</sub> OCH <sub>3</sub>	-H	O	A	≥ 1 mM
* 4	-H	-CH <sub>3</sub>	-OH	O	A	≥ 1 mM
* 14	-F	-CH <sub>3</sub>	-H	O	B	D
* 15	-OCH <sub>3</sub> ,	-CF <sub>3</sub>	-H	O	C	D
* 16	-COCH <sub>3</sub>	-H	-H	O	C	D
* 10	-OH	-CF <sub>3</sub>	-H	O	A	D
17	-H,-	-fenil	-H	O	C	D
* 18	-H	-CH <sub>3</sub>	-H	S	C	D
* 25	Véase la nota 4		-H	O	B	B
26	-H	-Br	-H	O	A	B
27	-OCH <sub>3</sub> ,	-Br	-H	O	A	A
*28	-OH	-CH <sub>2</sub> F	-H	O	C	D
* 29	-OH	-CHF <sub>2</sub>	-H	O	C	D
30	-OH	-Br	-H	O	A	A
* 31	-OCH <sub>3</sub> ,	-CH <sub>2</sub> F	-H	O	A	A
*32	-OCH <sub>3</sub> ,	-CHF <sub>2</sub>	-H	O	A	A
* 33	-H	Véase la nota 5	-H	O	C	D
* 24	-H	CO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-H	O	C	D

<sup>1</sup> Número de compuesto según se muestra en la Tabla 1

<sup>2</sup> A: ≤ 2.000; B: > 2.000; C: Inconclusivo (por ejemplo, no hay datos o no se observa actividad)

<sup>3</sup> D: Inconclusivo (por ejemplo, no hay datos o no se observa toxicidad)

<sup>4</sup> Compuesto 25 según se representa en la Tabla 1, concretamente el grupo arilo unido a un nitrógeno de la 2-piridona es un resto N-metilpiridinio

<sup>5</sup> Compuesto 33 según se representa en la Tabla 1, concretamente un grupo bromoarilo condensado en las posiciones 5 y 6 de un anillo 2-piridona

\* compuesto de referencia

## 10 EJEMPLO 3

Los compuestos se seleccionan por su capacidad para inhibir la liberación de TNF $\alpha$  por parte de células mononucleadas de sangre periférica (PBMC) humanas estimuladas con lipopolisacárido (LPS) *in vitro*. La capacidad de los compuestos para inhibir la liberación de TNF $\alpha$  en este ensayo *in vitro* se correlaciona con la inhibición de la actividad de p38 y es por lo tanto un indicador de actividad terapéutica *in vivo* potencial (2002 Osteoarthritis & Cartilage 10:961-967; y Laufer, S.A. y Wagner, G.K. 2002 J. Med. Chem. 45: 2733-2740).

Las células mononucleadas de la sangre periférica (PBMC) humanas se aíslan por centrifugación diferencial a través de un gradiente de densidad Ficoll-HyPaque procedente de suero agrupado de 3-8 donantes de sangre individuales. Las PBMC aisladas contiene aproximadamente un 10 % de monocitos CD-14 positivos, un 90 % de linfocitos y <1 % de granulocitos y plaquetas. Las PBMC (10<sup>6</sup> /ml) se cultivan en placas de poliestireno y se estimulan con lipopolisacárido (LPS; 50 ng/ml; Sigma, St. Louis, MO) en presencia o ausencia del compuesto de ensayo en diluciones seriadas, por duplicado, durante 24 horas a 37 °C en medio GIBCO™ RPM1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) sin suero. En nivel de TNF $\alpha$  en sobrenadantes celulares se determina mediante ELISA usando un kit comercialmente disponible (MDS Panlabs Nº 309700).

Los compuestos preferidos inhiben la liberación de TNF $\alpha$  en este ensayo con un valor de CE<sub>50</sub> entre aproximadamente 1  $\mu$ M y aproximadamente 1000  $\mu$ M, preferentemente de aproximadamente 50  $\mu$ M a aproximadamente 650  $\mu$ M.

#### EJEMPLO 4

Los compuestos se seleccionan por su capacidad para inhibir la liberación de TNF $\alpha$  en un modelo animal *in vivo* (véase, por ejemplo, Griswold D. E. et al. 1993 *Drugs Exp. Clin. Res.* 19:243-248; Badger, A.M. et al. 1996 *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 279:1453-1461; Dong, C. et al. 2002 *Annu. Rev. Immunol.* 20:55-72 (y las referencias citadas en este); Ono, K. y Han, J. 2000 *Cellular Signalling* 12:1-13 (y las referencias citadas en este); y Griffiths, J.B. et al. 1999 *Curr. Rheumatol. Rep.* 1:139-148).

Sin estar ligado a ninguna teoría, se cree que la inhibición de TNF $\alpha$  en este modelo se debe a la inhibición de MAP cinasa p38 por el compuesto.

Se dividen al azar ratas Sprague-Dawley macho (0,2 - 0,35 kg) en grupos de seis o más y se les dosifica por vía intravenosa mediante infusión o inyección de bolo, o se les dosifica por vía oral con compuestos de ensayo en una formulación adecuada en cada caso. Treinta minutos después del final de la infusión o inyección del bolo, y 1-2 horas después de la administración oral, se administra por vía intravenosa lipopolisacárido de *E. coli*/0127:B8 (0,8 mg/kg). Se recogen muestras de sangre 1,5 horas después del tratamiento con LPS. Los niveles de TNF $\alpha$  en suero se determinan usando el kit de ELISA de Biosource (KRC3011C) y se comparan con los de los controles tratados con vehículo.

Los compuestos preferidos inhiben la liberación de TNF $\alpha$  en este ensayo *in vivo*. Los compuestos preferidos muestran un valor de DE<sub>50</sub> de menos de 500 mg/kg, preferentemente de menos de 400 mg/kg, preferentemente de menos de 200 mg/kg, preferentemente de menos de 100 mg/kg, más preferentemente, menos de 50 mg/kg, más preferentemente, menos de 40 mg/kg, más preferentemente, menos de 30 mg/kg, más preferentemente, menos de 20 mg/kg, más preferentemente, menos de 10 mg/kg.

Los métodos para determinar la CE<sub>50</sub> de la inhibición de p38 incluye cualquier método conocido en la técnica que permite la detección cuantitativa de cualquiera de los sustratos cadena abajo de MAPK p38 como se ha descrito anteriormente. Por lo tanto, Estos métodos incluyen adicionalmente, pero sin limitación, la detección de la expresión de genes conocidos por estar regulados por p38 de manera individual, o mediante matrices de genes.

#### EJEMPLO 5

Los siguientes métodos pueden usarse para (1) un ensayo de cinasa para la determinación de la CE<sub>50</sub>, (2) un ensayo de cinasa no radiométrico para la determinación de la CE<sub>50</sub>, (3) modulación de la inducción de la expresión de TNF $\alpha$ , (4) una prueba de toxicidad celular, y (5) un ensayo para probar el efecto de los compuestos sobre la producción de colágeno.

#### Ensayo de cinasa

La actividad de las isoformas de cinasa P38 P38 $\gamma$  y P38 $\alpha$  se determina mediante fosforilación de ATF-2 en presencia de 32P- $\gamma$ -ATP. Se determina la incorporación de <sup>32</sup>P en ATF-2 en presencia o ausencia de inhibidores. Se ensaya la inhibición de la actividad de cinasa de P38 $\gamma$  y P38 $\alpha$  mediante pirfenidona y sus distintos derivados en este ensayo bioquímico. Los compuestos se solubilizan en agua o DMSO y se ensayan a diferentes concentraciones, de 0 a 10 mM usando el disolvente adecuado para disoluciones y un control de vehículo. Las enzimas P38 $\gamma$  y P38 $\alpha$  se obtienen como proteína recombinante purificada y activada (Upstate, Charlottesville, VA). La enzima activada se usa a 24,8 nM en la reacción final. Las enzimas se diluyen antes de la reacción en el tampón siguiente (HEPES 1 M, pH 7,4, DTT 500 mM, Triton X-100 al 1 % y 10 mg/ml de BSA). La reacción se efectúa en la siguiente solución que se prepara como una solución madre doble (HEPES 1 M, pH 7,4, DTT 500 mM y Triton X-100 1 %) y está presente ATP no radiactivo en la reacción a 6,25  $\mu$ M de ATP (Cell Signaling, Beverly, MA). Para determinar la fosforilación de ATF-2, se añade  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATP 3000 Ci/mmol a cada reacción a una concentración de 7,5  $\mu$ M. Se usa como sustrato de cinasa ATF-2 (Cell Signalling, Beverly, MA) a 3  $\mu$ M. Como primer paso en el montaje de la reacción enzimática, se añaden la cinasa activada y el inhibidor o el control de vehículo adecuado al tampón de reacción y se incuban durante 30 min a temperatura ambiente. La reacción de cinasa se inicia mediante la adición de ATF-2 y mezcla de ATP. El volumen final para cada reacción es 20  $\mu$ l y se efectúa a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de 30 minutos de incubación, se añaden 80  $\mu$ l de tampón de Laemmli. A continuación, se separa un 20 % de la reacción mediante SDS-Page (BioRad, Hercules, CA) en condiciones reductoras. Después de la electroforesis, se expone el gel a una placa fosforimager y se analiza usando un fosforimager (Storm System, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). La señal obtenida se cuantifica después de la corrección de fondo y se calcula el porcentaje de inhibición usando la actividad de cinasa no inhibida con el control de vehículo como 0 % de inhibición. La actividad de cinasa, EN presencia de diferentes concentraciones de inhibidor, se representa usando Kaleidagraph (Synergy Software, Reading, PA) para determinar la CE<sub>50</sub> para cada compuesto y cinasa P38 ensayada.



Ensayo de cinasa no radiométrico

También se usó un ensayo de cinasa alternativo no radiométrico para definir la  $CE_{50}$  para la inhibición de P38. En este ensayo, la cinasa p38 transfiere un fosfato de ATP a un sustrato peptídico de EGF-R, lo que da como resultado la formación de péptido de EGF-R fosforilado con la conversión concomitante de ATP a ADP. En una reacción no acoplada, p38 hidroliza también ATP a una velocidad más lenta en ausencia de sustrato peptídico (Fox et al., FEBS Lett 1999), lo que contribuye ligeramente al consumo de ATP. Por tanto, la cantidad de ATP consumido es directamente proporcional a la actividad de p38. Al final de la reacción de cinasa, se determina la cantidad de ATP restante usando el ensayo de cinasa luminiscente Kinase-Glo Plus (Promega, Inc., Madison, WI). Estos reactivos usan ATP residual para mantener la conversión enzimática dependiente de ATP de luciferina de escarabajo a oxiluciferina con la producción de luz concomitante, que se detecta en un luminómetro.

Las reacciones de cinasa se llevan a cabo mezclando compuesto (diluido en DMSO y tampón de ensayo) con p38 $\alpha$  o p38 $\gamma$ , y sustrato de péptido de EGF-R (AnaSpec, Inc., San Jose, CA) en tampón de ensayo. Las reacciones se inician a continuación mediante la adición de ATP y se deja que se desarrollen durante 45 minutos a temperatura ambiente. Las condiciones finales del tampón son: HEPES 20 mM (pH 7,4), DTT 2 mM, Triton-X-100 al 0,1 %, 10 mM de  $MgCl_2$ , glicerol al 10 %, p38 $\alpha$  o p38 $\gamma$  12,5 mM (Upstate, Charlottesville, VA), sustrato de péptido de EGF-R 50  $\mu$ M, y ATP 10  $\mu$ M. El volumen final del ensayo es 10  $\mu$ l. Se efectúa una reacción de control en ausencia de compuesto. Las reacciones de control adicionales que omiten p38 se efectúan con cada concentración de compuesto. Todas las reacciones se efectúan por triplicado.

Cuarenta y cinco minutos después del inicio de la reacción de cinasa, la reacción se inactiva mediante la adición de 10  $\mu$ l de reactivo de ensayo Kinase-Glo Plus. Se deja equilibrar la reacción de luciferasa durante 15 minutos antes de leerse en un lector de placas Envision Multilabel (Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Boston, MA). Los datos se representan como señal luminiscente frente a logaritmo de la concentración de compuesto en KaleidaGraph (Synergy Software, Reading, PA). Los valores de  $CE_{50}$  se determinan ajustando los datos a una ecuación de unión de 4 parámetros usando un límite superior fijo que se determina a partir de reacciones de control en ausencia de p38 (ya que la luminiscencia es inversamente proporcional a la actividad de cinasa).

Inhibición de la inducción de TNF $\alpha$ 

Se crecen células THP-1 (ATCC, Rockville, MD) en condiciones de cultivo regulares recomendadas por ATCC. 18 horas antes del experimento, se emplacaron las células en formato de 96 pocillos en medio de cultivo regular que contiene suero al 1 % y un volumen de cultivo de 0,25 ml a una densidad de 500.000 células por pocillo. El compuesto se añade a cada pocillo en triplicados y se incluye el control de disolvente adecuado en cada ensayo. Se incluye el inhibidor de p38 SB203850 a 1  $\mu$ M/ml (Upstate, Waltham, MA) como control positivo en cada ensayo. Para la inducción de la expresión de TNF $\alpha$ , se añade 1  $\mu$ g/ml de LPS a cada pocillo 30 minutos después de la adición del compuesto. Después de 4 horas de incubación en condiciones de cultivo tisular, las células se sedimentan por centrifugación (10 minutos, 1000 rpm, centrifugadora de mesa Beckman) y una fracción del sobrenadante libre de células se recolecta y usa en una dilución de diez veces para la cuantificación en el ELISA específico de TNF $\alpha$  (R&D Systems, Minneapolis, MN). El ELISA de TNF $\alpha$  se efectúa de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante. El TNF $\alpha$  se detecta en pg/ml y se representa como actividad fraccional normalizada para la expresión de TNF $\alpha$  en el control de disolvente.

Prueba de toxicidad del compuesto en un ensayo basado en células

La liberación de LDH como resultado de la ruptura de membranas celulares se aplica como medida de la toxicidad celular. LDH se detecta por su actividad enzimática usando un kit diagnóstico comercial (Roche Diagnostics, N° de Cat 1 644 793). Se usan células THP-1 para la determinación de toxicidad celular por consistencia con la expresión inducida de TNF $\alpha$  en el experimento anterior. Como se describió anteriormente para probar la inhibición de la inducción de TNF $\alpha$ , se cultivan las células en un formato de 96 pocillos con suero al 1 % y condiciones de cultivo tisular regulares. Los compuestos se añaden a diferentes concentraciones por triplicado. Se usa el control de disolvente adecuado en cada ensayo. Después de la adición de compuesto, se cultivan las células durante 18 horas en condiciones de cultivo tisular regulares. Después de este periodo de incubación, se inicia el control positivo añadiendo Triton-X-100 (al 2 % v/v) a las células no tratadas y se incuba durante 10 minutos adicionales para completar la lisis celular. A continuación, las células se sedimentan mediante centrifugación y se retira una fracción del sobrenadante y se analiza para la actividad enzimática de LDH de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los datos se comunican normalmente como % de toxicidad celular normalizado a las células lisadas de Triton-X-100 como una toxicidad celular del 100%.

Los datos de toxicidad también se obtienen usando un ensayo de ATP disponible comercialmente (Kit de Determinación de ATP de Sondas Moleculares A22066, disponible a través de Invitrogen) y/o usando un ensayo MTT. Tanto los ensayos de ATP como de MTT miden la competencia metabólica de la célula. El ensayo MTT mide la capacidad de la célula para reducir un sustrato indicador, que está relacionado con la competencia metabólica (es decir, viabilidad). El ensayo de ATP mide la concentración celular de ATP en presencia y ausencia de compuesto. Los compuestos tóxicos conducen a actividades metabólicas reducidas, lo que da lugar a una reducción en la

concentración de ATP.

#### Ensayo para el efecto de los compuestos sobre la producción de colágeno

- 5 Se crecieron células HFL-1 (ATCC, Rockville, MD) en condiciones de cultivo tisular regulares en medio completo que contiene suero fetal bovino al 10 % (FBS; Mediatech, Inc., Herndon, VA). Se emplacaron las células en pases tempranos en placas de 6 pocillos. Cuando las células alcanzaron la confluencia, se retiró el medio, se lavaron las células con PBS, y se dejó a las células durante una noche en medio completo que contiene FBS al 0,1 %. Se substituyó el medio por medio fresco más FCS al 0,1 %, L-prolina 10 µM (EMD Chemicals, Gibbstown, NJ), ácido ascórbico 20 µg/ml (EMD Chemicals, Gibbstown, NJ). Los compuestos se añadieron a pocillos triplicados a una concentración final de 1 mM a partir de soluciones madre 100X en DMSO. Una hora después de la adición de compuesto, se trata a las células con TGF-β1 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) a una concentración final de 10 ng/ml (25 ng en total). Tres días después de la adición de TGF-β, se retiró el medio, las células se lavaron con PSB y se lisaron a continuación. El contenido total de colágeno de las células lisadas se determinó con un ensayo de colágeno basado en tintes (Sircol Collagen Assay, Newtownabbey, Irlanda del Norte) y un espectrofotómetro basado en µQuant (BioTek Instrumants, Inc., Winooski, VT) con curvas patrón adecuadas. El intervalo dinámico del ensayo se define por células de tratamiento simulado (DMSO al 1 % sin compuesto) en presencia y ausencia de TGF-β. Los datos se comunican en la Tabla 3 como el porcentaje de inhibición de colágeno inducido por TGF-β determinado en la siguiente ecuación:

$$20 \quad \% \text{ inhibición} = 100 * [(\text{colágeno, simulado} / +\text{TGF-}\beta) - (\text{colágeno, tratadas} / +\text{TGF-}\beta)] / [(\text{colágeno, simulado} / +\text{TGF-}\beta) - (\text{colágeno, simulado} / -\text{TGF-}\beta)]$$

Tabla 3

Compuesto Nº	% de inhibición de síntesis de colágeno estimulada por TGF-β
8	48
* 14	23
* 15	49
26	58
30	69

\* compuesto de referencia

#### EJEMPLO de referencia 6

- 25 Preparación de 1-(4-hidroxifenil)-5-(triflorometil)-2-piridona (Compuesto 10): Una mezcla de 5-(trifluorometil)-2(1H)-piridona (815,5 mg, 5 mmol), 4-yodoanisol (2,34g, 10 mmol), CuI (952 mg, 5 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (691 mg, 5 mmol) y DMF (5 ml) se calentó a 135 °C durante la noche. La mezcla de reacción se diluyó con amoniaco al 10 % y se extrajo con acetato de etilo. El extracto orgánico se lavó con una solución acuosa saturada de cloruro de sodio, se secó con sulfato de magnesio y se evaporó. La purificación mediante cromatografía en columna (acetato de etilo al 30 % en hexano) dio como resultado 526 mg (39,2 %) de 1-(4-metoxifenil)-5-(triflorometil)-2-piridona. Este compuesto (268,2 mg, 1 mmol) se trató con una solución de BBr<sub>3</sub> en diclorometano (DCM, 2 ml) en DCM (5 ml) durante 2 horas a 0 °C. La mezcla de reacción se diluyó con DCM y se lavó 3 veces con agua. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio y se evaporó. El residuo se separó mediante cromatografía en columna (acetato de etilo al 20 % en hexano) para dar el compuesto del título como un sólido de color crema, 226 mg (89 %). El espectro de RMN <sup>1</sup>H fue consistente con la estructura del Compuesto 10.

#### EJEMPLO 7

- 40 Preparación de 1-fenil-5-acetil-2-piridona (Compuesto 16): 2-metoxi-5-acetil piridina (1,51 g, 10 mmol) se trató con HCl 6 N a 100 °C durante 5 horas. La mezcla de reacción se neutralizó con hidróxido de sodio hasta pH 7 y a continuación se extrajo varias veces con DCM. La capa orgánica se secó con sulfato de sodio, se evaporó, y el residuo se cristalizó en acetato de etilo para dar la 5-acetil-2(1H)-piridona como un sólido de color blanco, 1,06 g (78 %). Este compuesto (685,7 mg, 5 mmol) se hizo reaccionar con yodobenceno (0,84 ml, 7,5 mmol) en presencia de CuI (95 mg, 0,5 mmol) y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (691 mg, 5 mmol) en DMF (5 ml) a 135 °C durante la noche. La mezcla de reacción se diluyó con amoniaco al 10 % y se extrajo con acetato de etilo. El extracto orgánico se lavó con una solución acuosa saturada de cloruro de sodio, se secó con sulfato de magnesio y se evaporó. La cromatografía en columna (acetato de etilo al 10 % en-DCM) dio como resultado 407 mg (38 %) del compuesto diana como un sólido de color blanco. El espectro de RMN <sup>1</sup>H fue consistente con la estructura del Compuesto 16.

#### EJEMPLO de referencia 8

- 55 Preparación de 1-(4-piridinil)-5-metil-2-piridona (Compuesto 22): El Compuesto 22 se sintetizó a partir de la condensación de 5-metil-2(1H)-piridona (327,4 mg, 3 mmol) con clorhidrato de 4-bromopiridina (778 mg, 4 mmol) en presencia de CuI (60 mg, 03 mmol) y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (136 g, 10 mmol) en DMF (3 ml) a 135 °C durante la noche. La mezcla de reacción se diluyó con amoniaco al 10 % (15 ml) y se extrajo con acetato de etilo. El extracto orgánico se lavó con una solución acuosa saturada de cloruro de sodio, se secó con sulfato de magnesio y se evaporó. La cromatografía en columna (MeOH al 5 % en DCM) dio como resultado 197 mg (35 %) del compuesto diana como un sólido de color

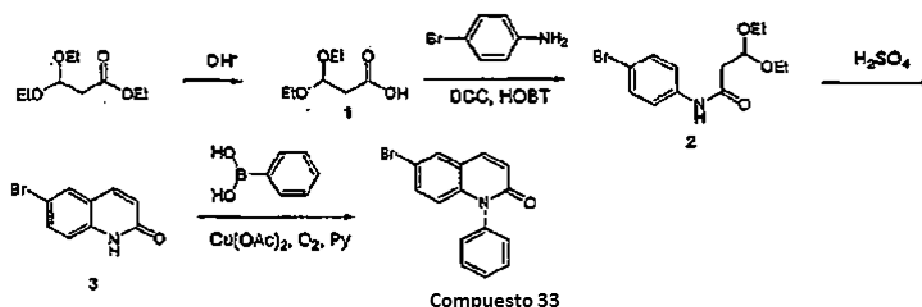
amarillento. El espectro de RMN  $^1\text{H}$  fue consistente con la estructura del Compuesto 22.

#### EJEMPLO de referencia 9

- 5 Preparación de 1-fenil-5-metil-2-piridinona (Compuesto 18): 1-fenil-5-metil-2-piridinona (555,7 mg, 3 mmol) se hizo reaccionar con reactivo de Lawesson (606,7 mg, 1,5 mmol) en tolueno (5 ml) a 90 °C. La mezcla de reacción se evaporó, y el compuesto diano se aisló mediante cromatografía en columna (acetato de etilo 20-30% en hexano) seguido de cristalización en metil terc-butil éter. Rendimiento 403 mg (67 %), sólido de color amarillo. El espectro de RMN  $^1\text{H}$  fue consistente con la estructura del Compuesto 18.

#### EJEMPLO de referencia 10

El Compuesto 33 se preparó de acuerdo con el siguiente esquema de síntesis:



Una mezcla de 3,3-dietoxipropionato de etilo comercial (9,7 ml, 50 mmol), hidróxido sódico (10 M, 6 ml 60 mmol) y agua (15 ml) se mantuvo a temperatura de reflujo hasta homogeneidad (aproximadamente 30 min.). Tras enfriar a 0 °C se añadió ácido clorhídrico 6 N para llevar el pH de la solución a 2-3 (~10 ml). La mezcla se extrajo con diclorometano, la fase orgánica se lavó con agua, se secaron sobre sulfato sódico, y el disolvente se eliminó a vacío para dar el ácido 1, que se utilizó sin ninguna purificación adicional.

A una solución del ácido 1 bruto (aproximadamente 50 mmol) en DCM (100 ml) a 0 °C se añadió secuencialmente 4-bromoanilina (10,3 g, 60 mmol), HOBT (675 mg, 5 mmol) y finalmente DCC (12,4 g, 60 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 1 hora y a continuación a temperatura de reflujo durante 4 horas más. El sólido se eliminó por filtración, el filtrado se lavó con bicarbonato sódico saturado, se secaron sobre sulfato sódico, y el disolvente se eliminó a vacío para obtener la amida 2 en forma de un sólido de color amarillento. Este sólido se disolvió en ácido sulfúrico (96 %, 50 ml) a 0 °C. La solución se mantuvo a la misma temperatura durante otras 3 h y a continuación se vertió sobre hielo-agua (500 ml). El sólido se eliminó por filtración, se lavó con agua, y se agitó en acetonitrilo caliente (100 ml). La quinolinona 3 se eliminó por filtración y se secó a vacío. El rendimiento fue 10 g (91 %).

Mezcla de compuesto 3 (309 mg, 1,38 mmol), ácido fenilborónico (336 mg, 2,76 mmol),  $\text{Cu}(\text{OAc})_2$  (36 mg, 0,2 mmol), tamices moleculares 4a (0,3 g), piridina (0,24 ml) y DCM (10 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 2 días. La mezcla de reacción se filtró a través de Celite, se lavó con bicarbonato de sodio saturado con EDTA y la fase orgánica se secó con sulfato de sodio. El Compuesto 33 se aisló mediante cromatografía (acetato de etilo al 50 % en hexano - acetato de etilo). El rendimiento fue 352 mg (85 %).

#### EJEMPLO 11

Las propiedades farmacocinéticas (PF) de pirfenidona, análogos y derivados de pirfenidona se determinaron en ratas Sprague-Dawley (Charles River Laboratories, Inc., Wilmington, MA) doblemente canuladas (yugular derecha/carótida izquierda). Se administró a ratas macho de peso aproximadamente 275-300 g una dosis intravenosa (5 mg/kg) u oral (50 mg/kg mediante sonda) de un compuesto en una formulación adecuada. Se recogieron muestras de plasma a través de cánula intraarterial a tiempos deseados en las 24 horas posteriores a la dosificación usando EDTA como anticoagulante. Se usaron tres animales para cada compuesto. Todos los experimentos se efectuaron por personal cualificado de acuerdo con las guías de los comités de cuidados y uso de animales institucionales (IACUC).

Las concentraciones de compuesto se determinaron mediante CL-EM usando un espectrómetro de masas MDS SCIEX API 3000 (Applied Biosystems, Foster City, CA) acoplado a un HPLC Shimadzu VP HPLC (Shimadzu Corp., Kyoto, Japón) equipado con un cartucho de guarda Duragel G C<sub>18</sub> (Peeke Scientific, Redwood City, CA). Las muestras de calibración se prepararon mezclando cantidades conocidas de pirfenidona, o un análogo o derivado de pirfenidona, con plasma de rata. Se creó una curva patrón mediante dilución en serie de la muestra de calibración en la matriz de muestra. Las muestras tanto patrón como analíticas se prepararon para inyección al HPLC mezclando una alícuota de muestra de plasma con 3 volúmenes de acetonitrilo enfriado en hielo que contiene patrón interno. A continuación se centrifugaron las muestras. Se mezcló a continuación una alícuota del sobrenadante resultante con cinco volúmenes

de ácido fórmico en agua al 0,2 %, inyectados al HPLC, y resueltos en un gradiente de metanol (que contiene ácido fórmico al 0,18-0,2 %). La señal integrada del analito se corrigió por la del patrón interno y se comparó con la de la curva patrón adecuada para definir la concentración del analito.

Los parámetros farmacocinéticos mostrados en la Tabla 4 se derivaron usando el paquete informático WinNonlin (Pharsight Corp, Mountain View, CA).

Tabla 4						
Ruta de Admin.	Dosificación mg/kg	Compuesto	T <sub>1/2</sub> h	MRTinf hr	Clobs ml/hr/kg	AUClast ng-hr/ml E %
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
		* 19				191,7
		26				65,8
* compuesto de referencia						63,9

1. Un aspecto de la presente divulgación proporciona un método para modular un sistema de proteína cinasa activada por estrés (SAPK), que comprende poner en contacto un compuesto con una proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) p38,

en el que el compuesto muestra una CE<sub>50</sub> en el intervalo de aproximadamente 1 µM a aproximadamente 1000 µM para la inhibición de al menos una MAPK p38; y

en el que la puesta en contacto se lleva a cabo a una concentración moduladora de SAPK que es menor que la CE<sub>30</sub> para la inhibición de la al menos una MAPK p38 por el compuesto.

2. El método del Párrafo 1, en el que la MAPK p38 se selecciona del grupo que consiste en p38α, p38β, p38γ, y p38δ.

3. El método del Párrafo 1 en el que la puesta en contacto se lleva a cabo a una concentración moduladora de SAPK que es menor que la CE<sub>20</sub> para la inhibición de MAPK p38 por el compuesto.

4. El método del Párrafo 1 en el que la puesta en contacto se lleva a cabo a una concentración moduladora de SAPK que es menor que la CE<sub>10</sub> para la inhibición de MAPK p38 por el compuesto.

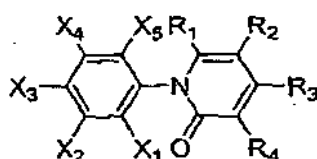
5. El método del párrafo 1, en el que los valores de CE<sub>50</sub> y los valores de CE<sub>30</sub> se obtienen a partir de una curva de respuesta a dosis.

6. El método del párrafo 1 en el que la concentración moduladora de SAPK es efectiva para alterar la liberación de TNFα en sangre completa en al menos un 15 %.

7. El método del párrafo 1 en el que la CE<sub>50</sub> está en el intervalo de aproximadamente 50 µM a aproximadamente 650 µM.

8. El método del Párrafo 1 en el que el compuesto comprende un anillo de piridona.

9. El método del párrafo 1 en el que el compuesto es del Genero Ia:



**Genero Ia;**

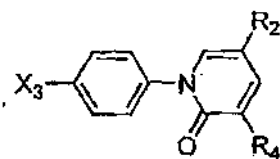
en la que

R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, y R<sub>4</sub> se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> sustituido, alqueno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, nitroalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, tioalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, hidroxialquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, alcoxi C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>, fenilo, fenilo sustituido, halógeno, hidroxilo, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, carboxi C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, alcoxycarbonilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, CO-uronida, CO-monosacárido, CO-oligosacárido, y CO-polisacárido; y

X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>, y X<sub>5</sub> se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, halógeno, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, e hidroxilo.

10. El método del párrafo 9, en el que el compuesto es un metabolito, hidrato, solvato, o profármaco de un compuesto del Genero Ia.

11. El método del párrafo 1 en el que el compuesto es del Genero Ib:

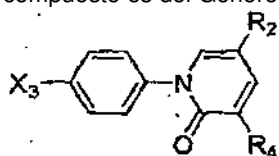


**Género Ib;**

en la que

- X<sub>3</sub> se selecciona entre el grupo que consiste en H, halógeno, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, y OH;  
 R<sub>2</sub> se selecciona entre el grupo que consiste en H, halógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> sustituido, hidroxialquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, alcoxialquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, carboxi C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, alcóxicarbonilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, CO-uronida, CO-monosacárido, CO-oligosacárido, y CO-polisacárido; y  
 R<sub>4</sub> se selecciona entre el grupo que consiste en H, halógeno, y OH.

12. El método del párrafo 1 en el que el compuesto es del Género Ic:

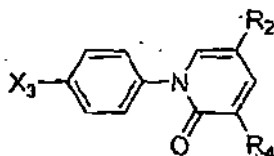


**Género Ic;**

en la que

- X<sub>3</sub> se selecciona entre el grupo que consiste en H, F, OH y OCH<sub>3</sub>;  
 R<sub>2</sub> se selecciona entre el grupo que consiste en H, CF<sub>3</sub>, CHF<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>F, CH<sub>2</sub>OH, COOH, CO-Glucouronida, Br, CH<sub>3</sub>, y CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub> y  
 R<sub>4</sub> se selecciona entre el grupo que consiste en H y OH; con la condición de que cuando R<sub>4</sub> y X<sub>3</sub> son H, R<sub>2</sub> no es CH<sub>3</sub>.

13. El método del párrafo 1 en el que el compuesto es del Subgénero II:

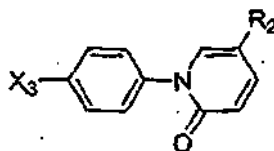


**Subgénero II;**

en la que

- X<sub>3</sub> se selecciona entre el grupo que consiste en H, OH y OCH<sub>3</sub>;  
 R<sub>2</sub> se selecciona entre el grupo que consiste en H, CH<sub>2</sub>OH, COOH, CO-Glucouronida, CH<sub>3</sub>, y CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>; y  
 R<sub>4</sub> se selecciona entre el grupo que consiste en H y OH, con la condición de que cuando X<sub>3</sub> es OH, entonces R<sub>2</sub> no es CH<sub>3</sub>.

14. El método del párrafo 1 en el que el compuesto es del Subgénero III:

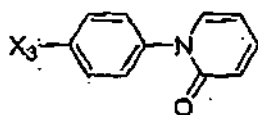


**Subgénero III;**

en la que

- X<sub>3</sub> se selecciona entre el grupo que consiste en H, F, y OH; y  
 R<sub>2</sub> se selecciona entre el grupo que consiste en H, Br, CH<sub>2</sub>F, CHF<sub>2</sub>, y CF<sub>3</sub>.

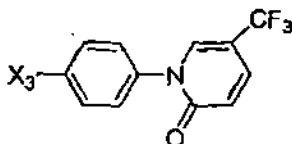
15. El método del párrafo 1 en el que el compuesto es del Subgénero IV:



Subgénero IV;

en el que  $X_3$  se selecciona entre el grupo que consiste en H, halógeno, alcoxi  $C_1-C_{10}$ , OH, alquilo  $C_1-C_{10}$ , alquilo  $C_1-C_{10}$  sustituido, alqueno  $C_1-C_{10}$ , haloalquilo  $C_1-C_{10}$ , nitroalquilo  $C_1-C_{10}$ , tioalquilo  $C_1-C_{10}$ , hidroalquilo  $C_1-C_{10}$ , fenilo, fenilo sustituido, alcohalquilo  $C_1-C_{10}$ , carboxi  $C_1-C_{10}$ , alcocarbonilo  $C_1-C_{10}$ , CO-uronida, CO-monosacárido, CO-oligosacárido, y CO-polisacárido.

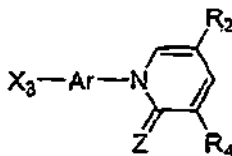
16. El método del párrafo 1 en el que el compuesto es del Subgénero V:



Subgénero V

en el que  $X_3$  se selecciona entre el grupo que consiste en H, halógeno, alcoxi  $C_1-C_{10}$ , alquilo  $C_1-C_{10}$ , alquilo  $C_1-C_{10}$  sustituido, alqueno  $C_1-C_{10}$ , haloalquilo  $C_1-C_{10}$ , nitroalquilo  $C_1-C_{10}$ , tioalquilo  $C_1-C_{10}$ , hidroalquilo  $C_1-C_{10}$ , fenilo, fenilo sustituido, alcohalquilo  $C_1-C_{10}$ , carboxi  $C_1-C_{10}$ , alcocarbonilo  $C_1-C_{10}$ , CO-uronida, CO-monosacárido, CO-oligosacárido, y CO-polisacárido.

17. El método del párrafo 1 en el que el compuesto es del Género VI:



Género VI

en la que

Ar es piridinilo o fenilo;

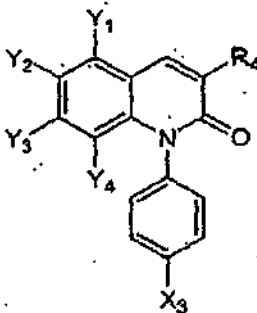
Z es O o S;

$X_3$  es H, F, Cl, OH,  $CH_3$ , o  $OCH_3$ ;

$R_2$  es metilo,  $C(=O)H$ ,  $C(=O)CH_3$ ,  $C(=O)OCH_3$ ,  $C(=O)O$ -glucosilo, fluorometilo, difluorometilo, trifluorometilo, bromo, metilmetoxilo, metilhidroxilo, o fenilo; y  $R_4$  es H o hidroxilo;

con la condición de que cuando  $R_2$  es trifluorometilo, Z es O,  $R_4$  es H y Ar es fenilo, el fenilo no está únicamente sustituido en la posición 4' por H, F, u OH.

18. El método del párrafo 1 en el que el compuesto es del Género VII:



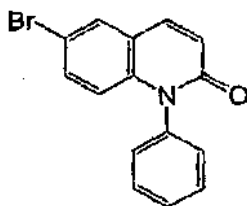
Género VII

en la que

$X_3$  es H, halógeno, alcoxi  $C_1-C_{10}$ , u OH;

$Y_1$ ,  $Y_2$ ,  $Y_3$ , y  $Y_4$  se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en H, alquilo  $C_1-C_{10}$ , alquilo  $C_1-C_{10}$  sustituido, alqueno  $C_1-C_{10}$ , haloalquilo  $C_1-C_{10}$ , nitroalquilo  $C_1-C_{10}$ , tioalquilo  $C_1-C_{10}$ , hidroalquilo  $C_1-C_{10}$ , alcoxi  $C_1-C_{10}$ , fenilo, fenilo sustituido, halógeno, hidroxilo, alcohalquilo  $C_1-C_{10}$ , carboxi  $C_1-C_{10}$ , alcocarbonilo  $C_1-C_{10}$ ; y  $R_4$  es H, halógeno, u OH.

19. El método del párrafo 18 en el que el compuesto es



20. Un método para tratar o prevenir un estado de enfermedad en un sujeto, que comprende identificar a un sujeto en riesgo de o que tenga una afección seleccionada entre una afección inflamatoria y una afección fibrótica; administrar un compuesto al sujeto en una cantidad efectiva para tratar o prevenir la afección; en el que el compuesto muestra un  $CE_{50}$  en el intervalo de aproximadamente  $1 \mu M$  a aproximadamente  $1000 \mu M$  para la inhibición de al menos una MAPK p38; y

en el que la cantidad efectiva produce una concentración en sangre, suero u otro fluido corporal que es menor que la  $CE_{30}$  para la inhibición de la al menos una MAPK p38.

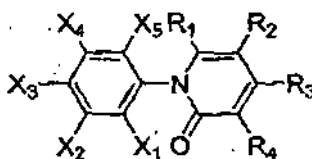
21. El método del Párrafo 20 en el que la afección se selecciona del grupo que consiste en fibrosis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, fibrosis pulmonar inflamatoria, fibrosis pulmonar idiopática, síndrome de bronquiolitis obliterante, fibrosis de aloinjerto crónica, artritis reumatoide; espondilitis reumatoide; artrosis; gota; septicemia; choque séptico; choque endotóxico; septicemia por bacterias gram negativas; síndrome de choque tóxico; síndrome del dolor miofacial (SDM); shigelosis; asma; síndrome de dificultad respiratoria del adulto; enfermedad inflamatoria del intestino; enfermedad de Crohn; psoriasis; eccema; colitis ulcerosa; nefritis glomerular, escleroderma; tiroiditis crónica; enfermedad de Grave; enfermedad de Ormond; gastritis autoinmune; miastenia grave; anemia hemolítica autoinmune; neutropenia autoinmune; trombocitopenia; fibrosis pancreática; hepatitis crónica activa; fibrosis hepática; enfermedad renal; fibrosis renal, síndrome del intestino irritable; piresis; restenosis; malaria cerebral; lesión por infarto e isquémica; traumatismo neurológico; enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington; enfermedad de Parkinson; dolor agudo y crónico; alergias; hipertrofia cardíaca, insuficiencia cardíaca crónica; síndrome coronario agudo; caquexia; malaria; lepra; leishmaniasis; enfermedad de Lyme; síndrome de Reiter; sinovitis aguda; degeneración muscular, bursitis; tendinitis; tenosinovitis; síndrome del disco intervertebral herniado, roto o prolapsado; osteopetrosis; trombosis, silicosis; sarcosis pulmonar; enfermedad de resorción ósea; cáncer; esclerosis múltiple, lupus; fibromialgia; SIDA; Herpes Zoster, Herpes Simplex; virus de la gripe; síndrome respiratorio agudo severo (SRAS); citomegalovirus; y diabetes mellitus.

22. El método del Párrafo 20 en el que la cantidad efectiva es menor del 50 % de una cantidad que causa un efecto secundario no deseado en el sujeto.

23. El método del Párrafo 20 en el que el compuesto inhibe una cinasa en la vía de señalización de SAPK.

24. El método del Párrafo 20 en el que el compuesto es un análogo de pirfenidona.

25. El método del Párrafo 20 en el que el compuesto es de género Ia:



Género Ia;

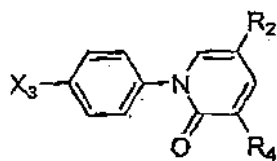
en la que

$R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ , y  $R_4$  se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, alquilo  $C_1$ - $C_{10}$ , alquilo  $C_1$ - $C_{10}$  sustituido, alqueno  $C_1$ - $C_{10}$ , haloalquilo  $C_1$ - $C_{10}$ , nitroalquilo  $C_1$ - $C_{10}$ , tioalquilo  $C_1$ - $C_{10}$ , hidroxialquilo  $C_1$ - $C_{10}$ , alcoxi  $C_1$ - $C_{10}$ , fenilo, fenilo sustituido, halógeno, hidroxilo, alcoxi  $C_1$ - $C_{10}$ , carboxi  $C_1$ - $C_{10}$ , alcocarbonilo  $C_1$ - $C_{10}$ , CO-uronida, CO-monosacárido, CO-oligosacárido, y CO-polisacárido; y

$X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$ ,  $X_4$ , y  $X_5$  se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, halógeno, alcoxi, e hidroxilo.

26. El método del párrafo 25, en el que el compuesto es un metabolito, hidrato, solvato, o profármaco de un compuesto del Género Ia.

27. El método del párrafo 20 en el que el compuesto es del Género Ib:



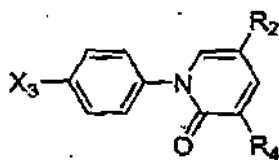
Género Ib;

en la que

- X<sub>3</sub> se selecciona entre el grupo que consiste en H, halógeno, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, y OH;  
 R<sub>2</sub> se selecciona entre el grupo que consiste en H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> sustituido, hidroxialquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>,  
 alcoxialquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, carboxi C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, alcóxycarbonilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, CO-uronida, CO-monosacárido, CO-oligosacárido,  
 y CO-polisacárido; y  
 R<sub>4</sub> se selecciona entre el grupo que consiste en H, halógeno, y OH.

28. El método del párrafo 27, en el que el compuesto es un metabolito, hidrato, solvato, o profármaco de un compuesto del Género Ib.

29. El método del párrafo 20 en el que el compuesto es del Género Ic:



Género Ic;

en la que

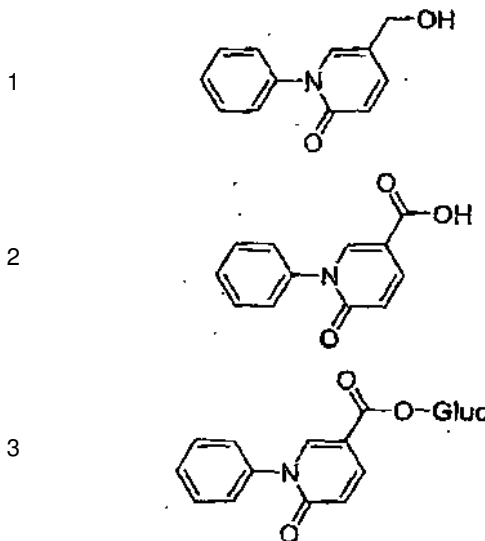
- X<sub>3</sub> se selecciona entre el grupo que consiste en H, F, OH y OCH<sub>3</sub>;  
 R<sub>2</sub> se selecciona entre el grupo que consiste en H, CF<sub>3</sub>, CHF<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>F, CH<sub>2</sub>OH, COOH, CO-Glucouronida, Br, CH<sub>3</sub>, y CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>; y  
 R<sub>4</sub> se selecciona entre el grupo que consiste en H y OH; con la condición de que cuando R<sub>4</sub> y X<sub>3</sub> son H, R<sub>2</sub> no es CH<sub>3</sub>.

30. El método del párrafo 29, en el que el compuesto es un metabolito, hidrato, solvato, o profármaco de un compuesto del Género Ic.

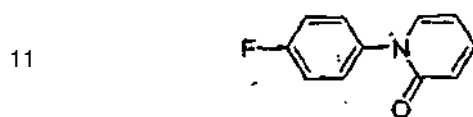
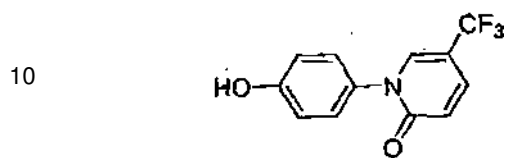
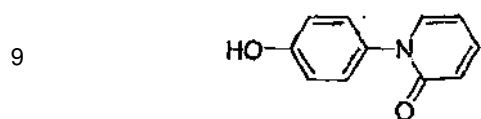
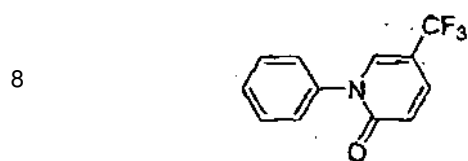
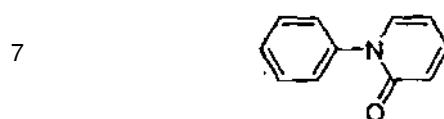
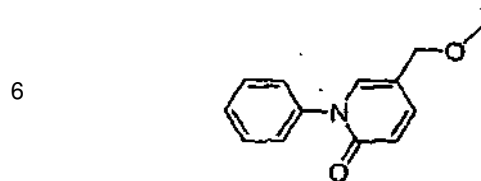
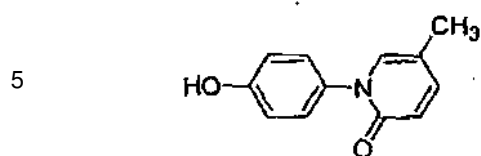
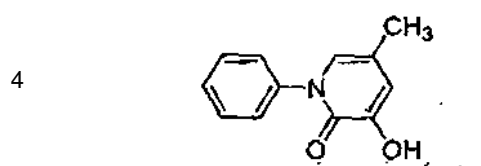
31. El método del párrafo 29 en el que el compuesto se selecciona entre los Compuestos 1 a 12 y 14 de la siguiente forma:

Número de compuesto

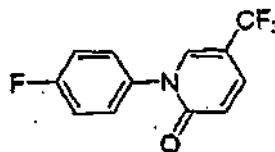
Compuesto



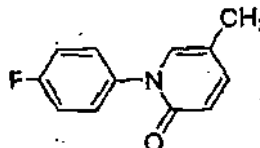




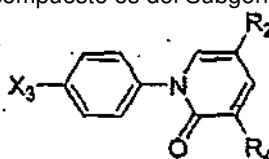
12



14



32. El método del párrafo 20 en el que el compuesto es del Subgénero II:



**Subgénero II;**

5

en la que

X<sub>3</sub> se selecciona entre el grupo que consiste en H, OH y OCH<sub>3</sub>;

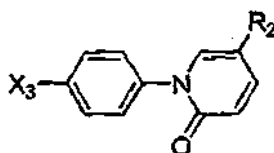
10

R<sub>2</sub> se selecciona entre el grupo que consiste en H, CH<sub>2</sub>OH, COOH, CO-Glucouronida, CH<sub>3</sub>, y CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>; y R<sub>4</sub> se selecciona entre el grupo que consiste en H and OH, con la condición de que cuando X<sub>3</sub> es OH, entonces R<sub>2</sub> no es CH<sub>3</sub>.

33. El método del párrafo 32, en el que el compuesto es un metabolito, hidrato, solvato, o profármaco de un compuesto del Subgénero II.

15

34. El método del párrafo 20 en el que el compuesto es del Subgénero III:



**Subgénero III;**

20

en la que

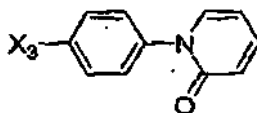
X<sub>3</sub> se selecciona entre el grupo que consiste en H, F, y OH; y

R<sub>2</sub> se selecciona entre el grupo que consiste en H, Br, CH<sub>2</sub>F, CHF<sub>2</sub>, y CF<sub>3</sub>.

25

35. El método del párrafo 34, en el que el compuesto es un metabolito, hidrato, solvato, o profármaco de un compuesto del Subgénero III

36. El método del párrafo 20 en el que el compuesto es del Subgénero IV:



**Subgénero IV**

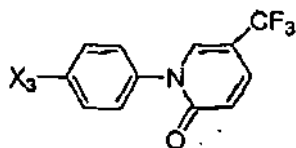
30

en el que X<sub>3</sub> se selecciona entre el grupo que consiste en H, halógeno, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, OH, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> sustituido, alquenoilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, nitroalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, tioalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, hidroxialquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, fenilo, fenilo sustituido, alcoxialquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, carboxi C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, alcocarbonilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, CO-uronida, CO-monosacárido, CO-oligosacárido, y CO-polisacárido.

35

37. El método del párrafo 36, en el que el compuesto es un metabolito, hidrato, solvato, o profármaco de un compuesto del Subgénero IV.

38. El método del párrafo 20 en el que el compuesto es del Subgénero V:

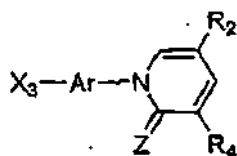


Subgénero V

en el que  $X_3$  se selecciona entre el grupo que consiste en H, halógeno, alcoxi  $C_1-C_{10}$ , alquilo  $C_1-C_{10}$ , alquilo  $C_1-C_{10}$  sustituido, alqueno  $C_1-C_{10}$ , haloalquilo  $C_1-C_{10}$ , nitroalquilo  $C_1-C_{10}$ , tioalquilo  $C_1-C_{10}$ , hidroxialquilo  $C_1-C_{10}$ , fenilo, fenilo sustituido, alcoxialquilo  $C_1-C_{10}$ , carboxi  $C_1-C_{10}$ , alcocarbonilo  $C_1-C_{10}$ , CO-uronida, CO-monosacárido, CO-oligosacárido, y CO-polisacárido.

39. El método del párrafo 38, en el que el compuesto es un metabolito, hidrato, solvato, o profármaco de un compuesto del Subgénero V.

40. El método del párrafo 20 en el que el compuesto es del Género VI:



Género VI;

en la que

Ar es piridinilo o fenilo;

Z es O o S;

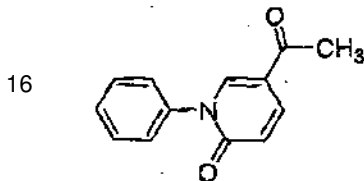
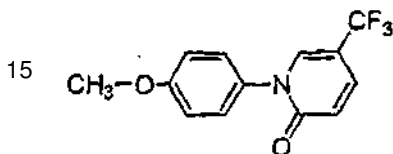
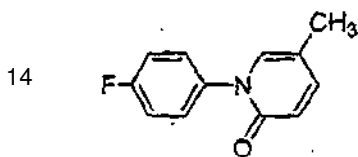
$X_3$  es H, F, Cl, OH,  $CH_3$ , o  $OCH_3$ ;

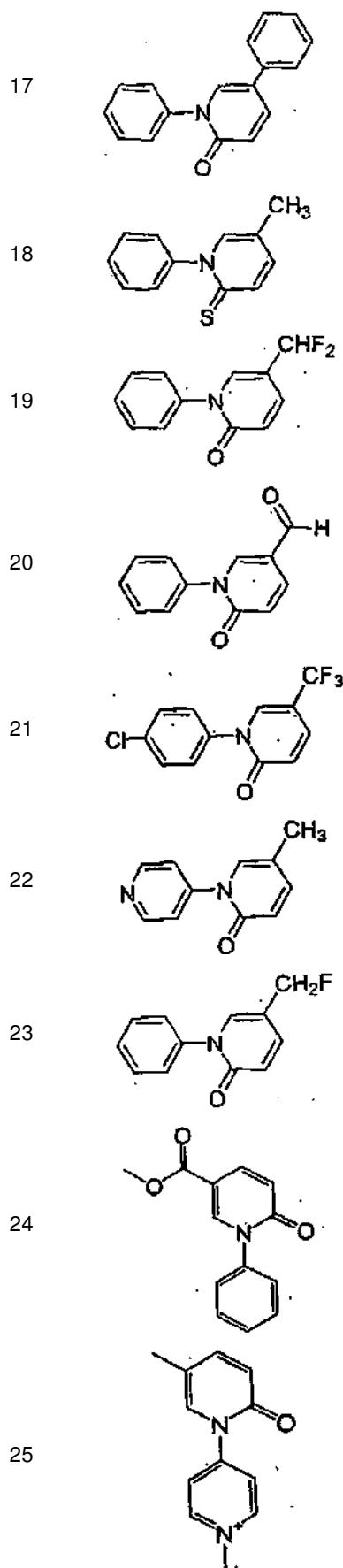
$R_2$  es metilo,  $C(=O)H$ ,  $C(=O)CH_3$ ,  $C(=O)OCH_3$ ,  $C(=O)O$ -glucosilo, fluorometilo, difluorometilo, trifluorometilo, bromo, metilmetoxilo, metilhidroxilo, o fenilo; y  $R_4$  es H o hidroxilo;

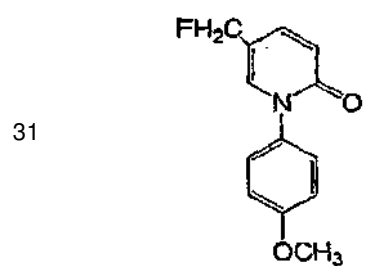
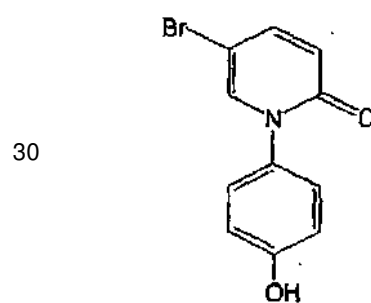
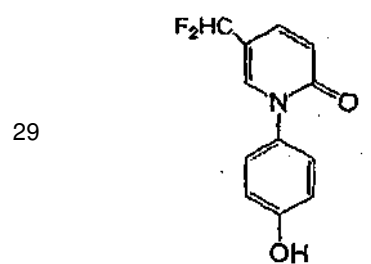
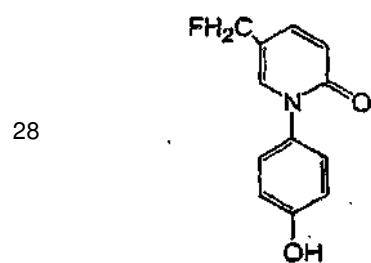
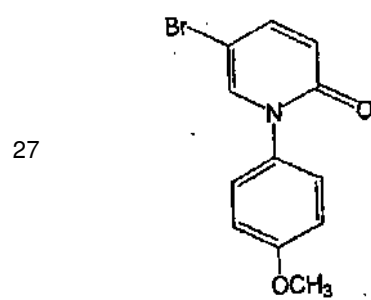
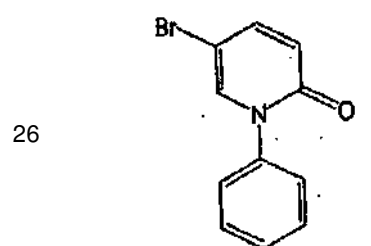
con la condición de que cuando  $R_2$  es trifluorometilo, Z es O,  $R_4$  es H y Ar es fenilo, el fenilo no está únicamente sustituido en la posición 4' por H, F, u OH.

41. El método del párrafo 40, en el que el compuesto es un metabolito, hidrato, solvato, o profármaco de un compuesto del Subgénero VI.

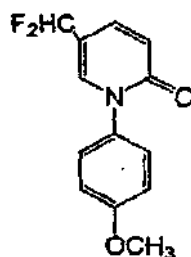
42. El método del párrafo 40, en el que el compuesto se selecciona entre los Compuestos 14 a 32 de la siguiente forma:



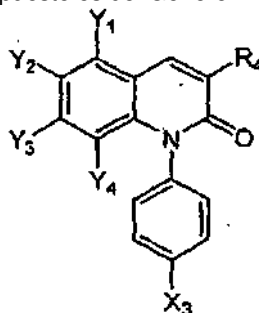




32



43. El método del párrafo 20 en el que el compuesto es del Genero VII:



Género VII

5

en la que

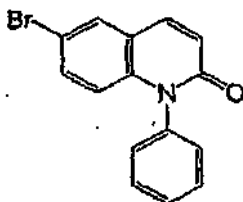
X<sub>3</sub> es H, halógeno, alcoxi, u OH;

10 <sub>1</sub>Y, <sub>2</sub>Y, <sub>3</sub>Y, e R<sub>4</sub> se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> sustituido, alqueno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, nitroalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, tioalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, hidroxialquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, fenilo, fenilo sustituido, halógeno, hidroxilo, alcoxialquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, carboxi C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, alcoxycarbonilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, y R<sub>4</sub> es H, halógeno, u OH.

15

44. El método del párrafo 43, en el que el compuesto es un metabolito, hidrato, solvato, o profármaco de un compuesto del Genero VII.

45. El método del párrafo 44, en el que el compuesto es:



20

46. Un aspecto adicional de la presente invención proporciona un método para identificar un compuesto farmacéuticamente activo, que comprende:

proporcionar una biblioteca de compuestos;

ensayar una pluralidad de compuestos a partir de la biblioteca para la inhibición de al menos una MAPK p38; y

25

seleccionar al menos un compuesto a partir de la pluralidad de compuestos, en el que el compuesto seleccionado muestra una CE<sub>50</sub>

en el intervalo de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 1000 μM para la inhibición de la al menos una MAPK p38.

30

47. Un aspecto adicional más de la presente invención proporciona un método para identificar un compuesto farmacéuticamente activo, que comprende:

proporcionar una biblioteca de compuestos;

ensayar una pluralidad de compuestos a partir de la biblioteca para la inhibición de la secreción de TNFα en un

35

fluido corporal in vivo; y seleccionar al menos un compuesto a partir de la pluralidad de compuestos, en el que el compuesto seleccionado muestra una CE<sub>50</sub> en el intervalo de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 1000 μM para la inhibición de la secreción de TNFα en un fluido corporal *in vivo*.

48. Un aspecto adicional más de la presente invención proporciona un método para identificar un compuesto farmacéuticamente activo, que comprende:

proporcionar una biblioteca de compuestos;

ensayar una pluralidad de compuestos a partir de la biblioteca para la inhibición de la secreción de TNF $\alpha$  por células cultivadas *in vitro*; y seleccionar al menos un compuesto a partir de la pluralidad de compuestos, en el que el compuesto seleccionado muestra una CE<sub>50</sub>

en el intervalo de aproximadamente 1  $\mu$ M a aproximadamente 1000  $\mu$ M para la inhibición de la secreción de TNF $\alpha$  por células cultivadas *in vitro*.

49. Un aspecto adicional más de la presente invención proporciona un método para identificar un compuesto farmacéuticamente activo, que comprende:

proporcionar una biblioteca de compuestos;

ensayar una pluralidad de compuestos a partir de la biblioteca para la inhibición de la secreción de TNF $\alpha$  en un fluido corporal *in vivo*; y seleccionar al menos un compuesto a partir de la pluralidad de compuestos, en el que el compuesto seleccionado muestra una CE<sub>50</sub> en el intervalo de aproximadamente 1  $\mu$ M a aproximadamente 1000  $\mu$ M para la inhibición de la secreción de TNF $\alpha$  por células cultivadas *in vitro*.

50. Un aspecto adicional más de la presente invención proporciona un método para identificar un compuesto farmacéuticamente activo, que comprende:

proporcionar una biblioteca de compuestos;

ensayar una pluralidad de compuestos a partir de la biblioteca para la inhibición de la secreción de TNF $\alpha$  por células cultivadas *in vitro*; y seleccionar al menos un compuesto a partir de la pluralidad de compuestos, en el que el compuesto seleccionado muestra una CE<sub>50</sub> en el intervalo de aproximadamente 1  $\mu$ M a aproximadamente 1000  $\mu$ M para la inhibición de la secreción de TNF $\alpha$  en un fluido corporal *in vivo*.

51. El método de uno cualquiera de los Párrafos 47-50 que comprende además determinar una toxicidad en mamífero del compuesto seleccionado.

52. El método de uno cualquiera de los Párrafos 47-50 que además comprende administrar el compuesto seleccionado a un sujeto de prueba.

53. El método del Párrafo 52 en el que el sujeto de prueba tiene o está en riesgo de tener una afección inflamatoria.

54. El método de uno cualquiera de los Párrafos 47-50 en el que la MAPK p38 se selecciona del grupo que consiste en p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\gamma$ , y p38 $\delta$ .

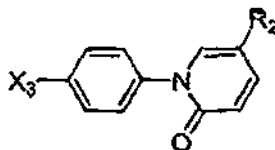
55. El método del Párrafo 46 en el que la CE<sub>50</sub> se obtiene a partir de una curva de respuesta a dosis.

56. El método del párrafo 46 en el que la CE<sub>50</sub> está en el intervalo de aproximadamente 50  $\mu$ M a aproximadamente 650  $\mu$ M.

57. El método del Párrafo 47 en el que la CE<sub>50</sub> se obtiene a partir de una curva de respuesta a dosis.

58. El método del párrafo 47 en el que la CE<sub>50</sub> está en el intervalo de aproximadamente 50  $\mu$ M a aproximadamente 650  $\mu$ M.

59. En un aspecto adicional, la invención proporciona un compuesto que tiene la fórmula del Subgénero III: en el que



**Subgénero III;**

X<sub>3</sub> se selecciona entre el grupo que consiste en H, F, y OH;

R<sub>2</sub> se selecciona entre el grupo que consiste en H y CF<sub>3</sub>; y

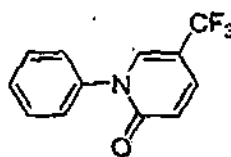
en el que el compuesto presenta un valor de CE<sub>50</sub> en el intervalo de aproximadamente 1  $\mu$ M a aproximadamente 1000  $\mu$ M para la inhibición de MAPK de p38; o una sal farmacéuticamente aceptable, éster, solvato o profármaco del compuesto.

60. El compuesto del párrafo 59 en el que el compuesto se selecciona entre los Compuestos 8 a 12 de la siguiente forma:

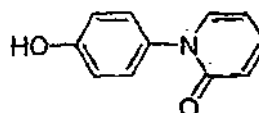
## Número de compuesto

## Compuesto

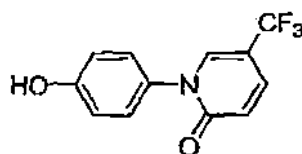
8



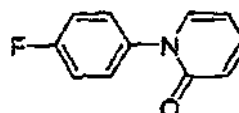
9



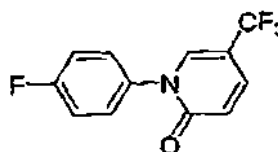
10



11



12



61. El compuesto del Párrafo 59 que tiene una  $CE_{50}$  en el intervalo de aproximadamente 1  $\mu$ M a aproximadamente 1000  $\mu$ M para la inhibición de MAPK p38.

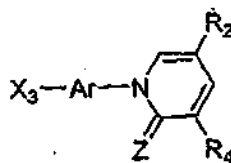
5 62. El compuesto del Párrafo 61 en el que la  $CE_{50}$  está en el intervalo de aproximadamente 50  $\mu$ M a aproximadamente 650  $\mu$ M.

63. El compuesto del Párrafo 61 que tiene una  $CE_{50}$  en el intervalo de aproximadamente 1  $\mu$ M a aproximadamente 1000  $\mu$ M para la inhibición de la secreción de  $TNF\alpha$  en un fluido corporal *in vivo*.

10 64. El compuesto del Párrafo 61 que tiene una  $CE_{50}$  en el intervalo de aproximadamente 1  $\mu$ M a aproximadamente 1000  $\mu$ M para la inhibición de la secreción de  $TNF\alpha$  por células cultivadas *in vitro*.

65. Un compuesto que tiene la fórmula del Género VI:

en la que



Género VI

15

Ar es piridinilo o fenilo;

Z es O o S;

X<sub>3</sub> es H, F, Cl, OH, o OCH<sub>3</sub>;

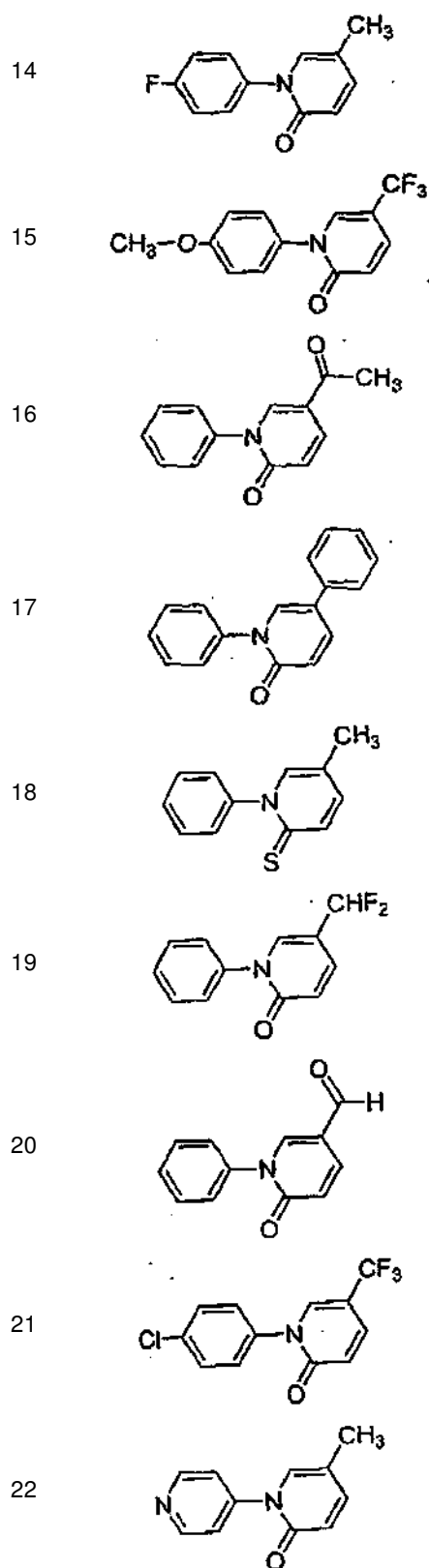
20 R<sub>2</sub> es metilo, C(=O)H, C(=O)CH<sub>3</sub>, C(=O)O-glucosilo, fluorometilo, difluorometilo, trifluorometilo, metilmetoxilo, metilhidroxilo, o fenilo; y R<sub>4</sub> es H o hidroxilo;

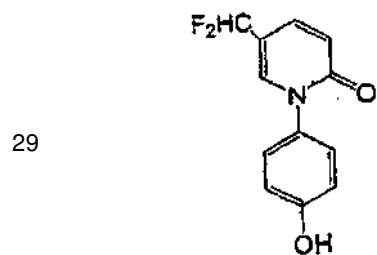
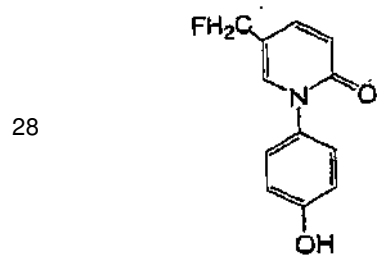
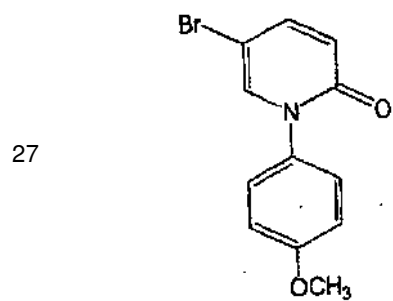
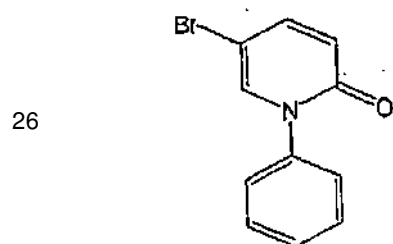
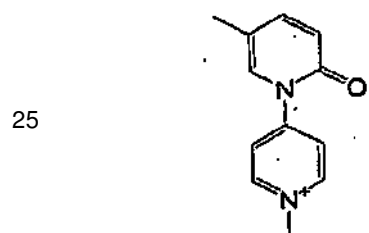
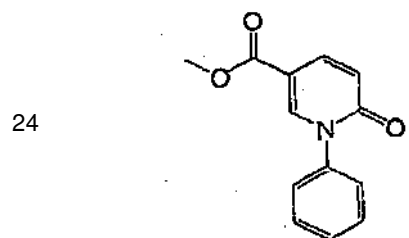
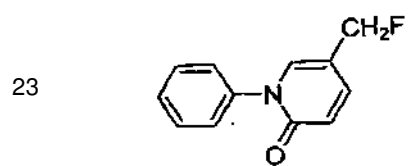
con la condición de que cuando R<sub>2</sub> es trifluorometilo, Z es O, R<sub>4</sub> es H y Ar es fenilo, el fenilo no está únicamente sustituido en la posición 4' por H, F; u OH;

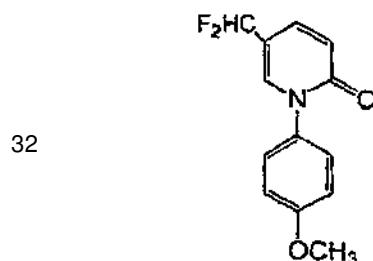
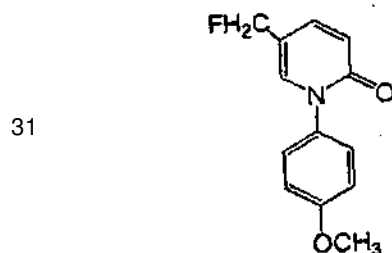
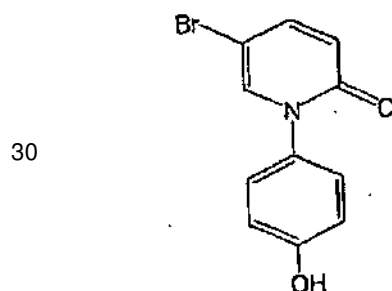
25 en el que el compuesto presenta un valor de  $CE_{50}$  en el intervalo de aproximadamente 1  $\mu$ M a aproximadamente 1000  $\mu$ M para la inhibición de MAPK de p38; o una sal farmacéuticamente aceptable, éster, solvato o profármaco del compuesto.



66. El compuesto del párrafo 65, en el que el compuesto se selecciona entre los Compuestos 14 a 32 de la siguiente forma:







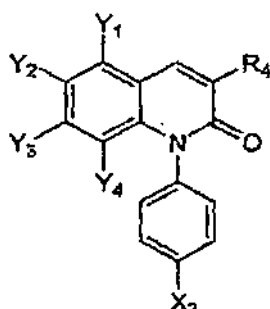
67. El compuesto del Párrafo 68 que tiene una  $CE_{50}$  en el intervalo de aproximadamente 1  $\mu M$  a aproximadamente 1000  $\mu M$  para la inhibición de MAPK p38.

68. El compuesto del Párrafo 67 en el que la  $CE_{50}$  está en el intervalo de aproximadamente 50  $\mu M$  a aproximadamente 650  $\mu M$ .

69. El compuesto del Párrafo 67 que tiene una  $CE_{50}$  en el intervalo de aproximadamente 1  $\mu M$  a aproximadamente 1000  $\mu M$  para la inhibición de la secreción de TNF $\alpha$  en un fluido corporal *in vivo*.

70. El compuesto del Párrafo 67 que tiene una  $CE_{50}$  en el intervalo de aproximadamente 1  $\mu M$  a aproximadamente 1000  $\mu M$  para la inhibición de la secreción de TNF $\alpha$  por células cultivadas *in vitro*.

71. Un aspecto adicional más de la presente invención proporciona un compuesto que tiene la fórmula del Género VII:



Género VII

en la que

$X_3$  es H, halógeno, alcoxi, u OH;

$Y_1$ ,  $Y_2$ ,  $Y_3$ , e  $R_4$  se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> sustituido, alqueno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, nitroalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, tioalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, hidroxialquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, fenilo, fenilo sustituido, halógeno hidroxilo, alcoxialquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, carboxi C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, alcoxycarbonilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>,

$R_4$  es H, halógeno, u OH; y

en la que el compuesto presenta un valor de  $CE_{50}$  en el intervalo de aproximadamente 1  $\mu M$  a aproximadamente 1000  $\mu M$  para la inhibición de MAPK de p38; o una sal farmacéuticamente aceptable, éster,

solvato o profármaco del compuesto.

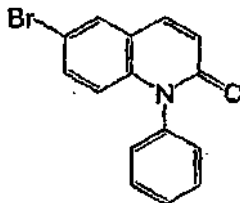
72. El compuesto del Párrafo 71 que tiene una  $CE_{50}$  en el intervalo de aproximadamente 1  $\mu M$  a aproximadamente 1000  $\mu M$  para la inhibición de MAPK p38.

73. El compuesto del Párrafo 71 en el que la  $CE_{50}$  está en el intervalo de aproximadamente 50  $\mu M$  a aproximadamente 650  $\mu M$ .

74. El compuesto del Párrafo 71 que tiene una  $CE_{50}$  en el intervalo de aproximadamente 1  $\mu M$  a aproximadamente 1000  $\mu M$  para la inhibición de la secreción de TNF $\alpha$  en un fluido corporal *in vivo*.

75. El compuesto del Párrafo 71 que tiene una  $CE_{50}$  en el intervalo de aproximadamente 1  $\mu M$  a aproximadamente 1000  $\mu M$  para la inhibición de la secreción de TNF $\alpha$  por células cultivadas *in vitro*.

76. El compuesto del párrafo 71, que tiene la fórmula:



77. El compuesto del Párrafo 71 que tiene una  $CE_{50}$  en el intervalo de aproximadamente 1  $\mu M$  a aproximadamente 1000  $\mu M$  para la inhibición de MAPK p38.

78. El compuesto del Párrafo 71 en el que la  $CE_{50}$  está en el intervalo de aproximadamente 50  $\mu M$  a aproximadamente 650  $\mu M$ .

79. El compuesto del Párrafo 71 que tiene una  $CE_{50}$  en el intervalo de aproximadamente 1  $\mu M$  a aproximadamente 1000  $\mu M$  para la inhibición de la secreción de TNF $\alpha$  en un fluido corporal *in vivo*.

80. El compuesto del Párrafo 71 que tiene una  $CE_{50}$  en el intervalo de aproximadamente 1  $\mu M$  a aproximadamente 1000  $\mu M$  para la inhibición de la secreción de TNF $\alpha$  por células cultivadas *in vitro*.

81. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto del Párrafo 59 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

82. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto del Párrafo 65 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

83. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto del Párrafo 71 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

84. La composición farmacéutica del Párrafo 81, en la que la composición contiene una cantidad de dicho compuesto que se selecciona para la administración a un paciente en una pauta seleccionada entre: dos veces al día, una vez al día, una vez cada dos días, tres veces a la semana, dos veces a la semana, y una vez a la semana.

85. La composición farmacéutica del Párrafo 82, en la que la composición contiene una cantidad de dicho compuesto que se selecciona para la administración a un paciente en una pauta seleccionada entre: dos veces al día, una vez al día, una vez cada dos días, tres veces a la semana, dos veces a la semana, y una vez a la semana.

86. La composición farmacéutica del Párrafo 83, en la que la composición contiene una cantidad de dicho compuesto que se selecciona para la administración a un paciente en una pauta seleccionada entre: dos veces al día, una vez al día, una vez cada dos días, tres veces a la semana, dos veces a la semana, y una vez a la semana.

87. El método del párrafo 20, en el que dicho compuesto se administra a dicho sujeto en una pauta seleccionada entre: dos veces al día, una vez al día, una vez cada dos días, tres veces a la semana, dos veces a la semana, y una vez a la semana.

88. El método del párrafo 21, en el que dicho compuesto se administra a dicho sujeto en una pauta seleccionada entre: dos veces al día, una vez al día, una vez cada dos días, tres veces a la semana, dos veces a la semana, y una vez a la semana.

89. El método del Párrafo 21, en el que la afección es síndrome de bronquiolitis obliterante.

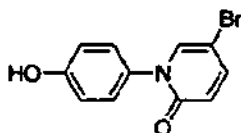
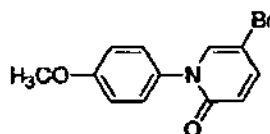
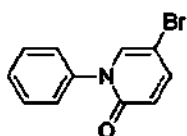
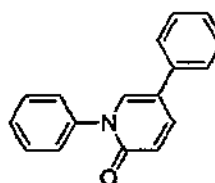
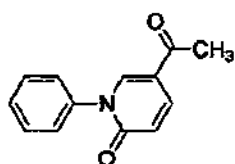
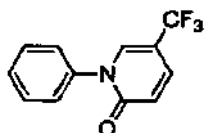
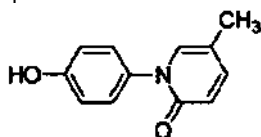
90. El método del Párrafo 21, en el que la afección es fibrosis crónica del aloinjerto.

91. El método del Párrafo 21, en el que la afección es fibrosis pulmonar idiopática.

92. El método del párrafo 21, en el que la afección es enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

# REIVINDICACIONES

1. Un compuesto seleccionado entre grupo que consiste en:



5

2. Un compuesto de la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de una afección fibrótica en un sujeto.

3. Un compuesto para el uso de la reivindicación 2, en donde la afección se selecciona entre el grupo que consiste en fibrosis pulmonar, fibrosis hepática y fibrosis renal.

4. Un compuesto para el uso de la reivindicación 3, en donde la afección es fibrosis pulmonar idiopática.

5. Un compuesto para el uso de la reivindicación 2, en donde la afección es fibrosis musculoesquelética.

6. Un compuesto para el uso de la reivindicación 2, en donde la afección es fibrosis cardíaca.

7. Un compuesto para el uso de la reivindicación 2, en donde la afección es bronquiolitis obliterante.

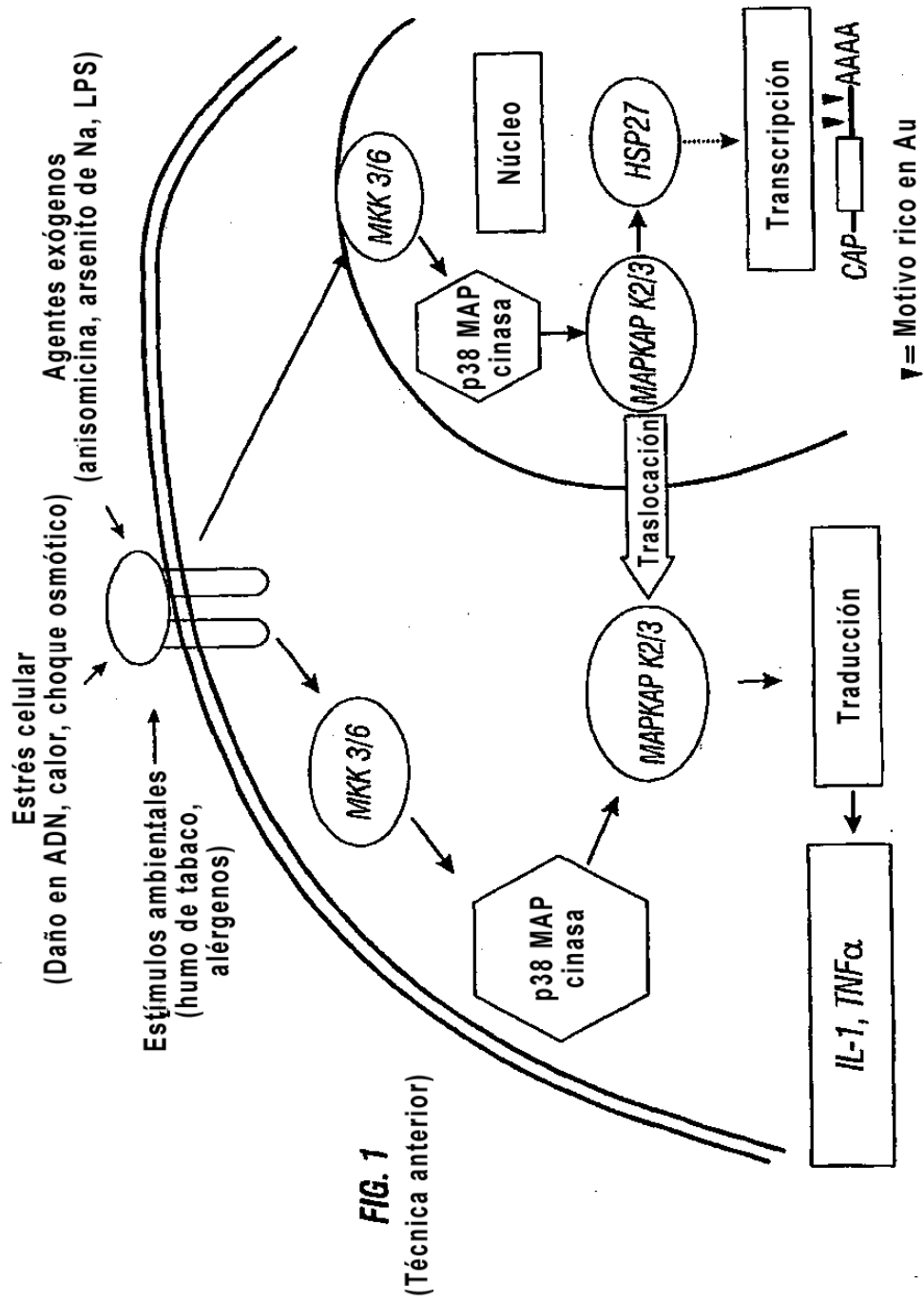
8. Un compuesto para el uso de la reivindicación 2, en donde la afección es fibrosis crónica del aloinjerto.

9. Un compuesto para el uso de la reivindicación 2, en donde la afección es leiomioma.

10. Un compuesto para el uso de la reivindicación 2, en donde la afección es fibrosis endomiocárdica.

11. Un compuesto para el uso de la reivindicación 2, en donde el compuesto inhibe una cinasa en la vía de señalización de SAPK.

12. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la reivindicación 1 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.



*Pir*  $CE_{50} = 503 \mu M$   
 5 OH  $CE_{50} = 684 \mu M$   
 COOH  $CE_{50} = 1053 \mu M$   
 5 éter de metilo  $CE_{50} = 1107 \mu M$   
 3 OH  $CE_{50} = 1454 \mu M$   
 4 OH  $CE_{50} = 174 \mu M$

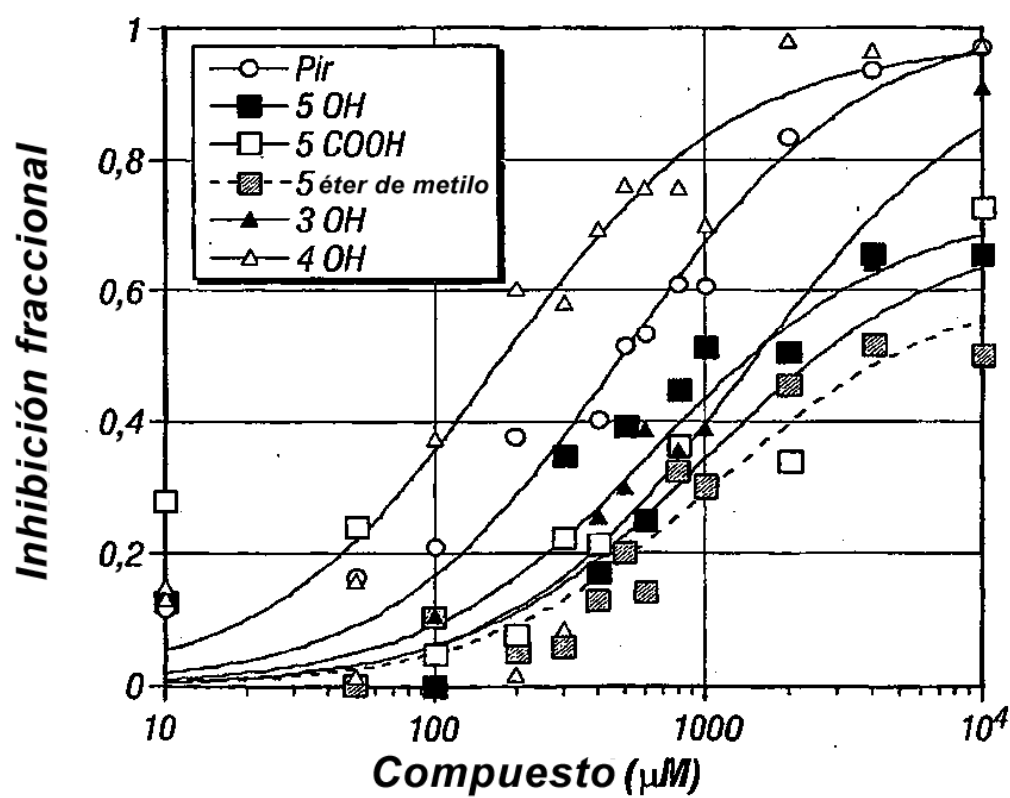


FIG. 2

*Pir*  $CE_{50} = 462 \mu M$   
 5 OH  $CE_{50} = 1059 \mu M$   
 COOH  $CE_{50} = 986 \mu M$   
 5 éter de metilo = 1743  $\mu M$   
 3 OH  $CE_{50} = 1496 \mu M$   
 4 OH  $CE_{50} = 288 \mu M$

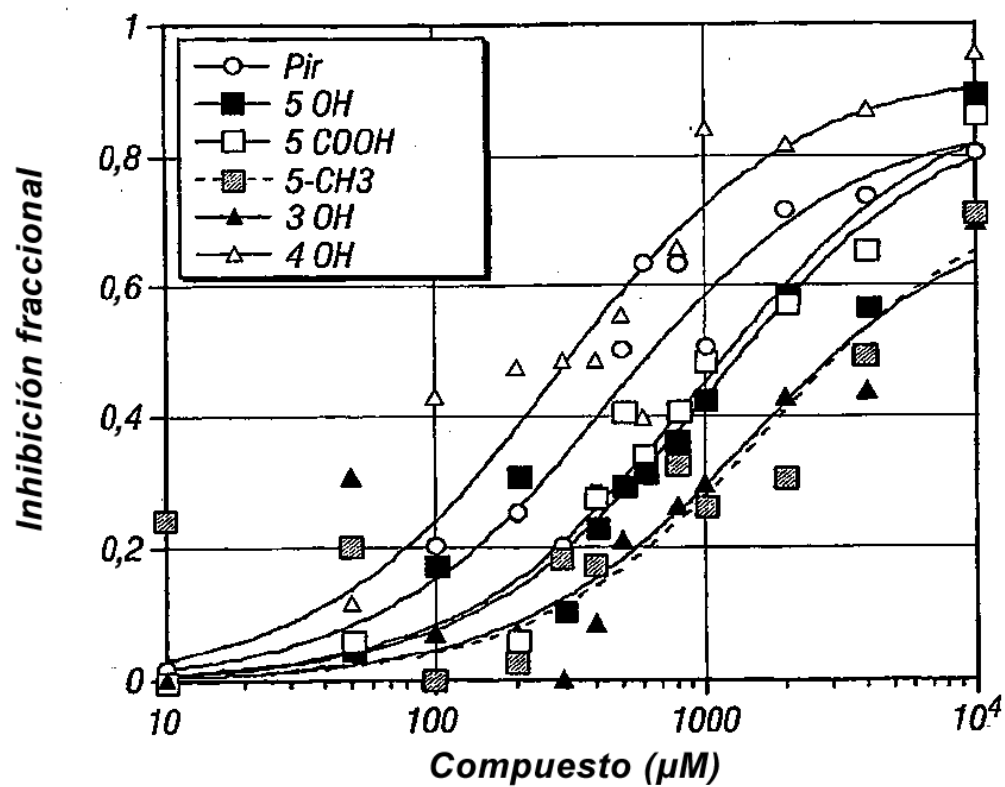
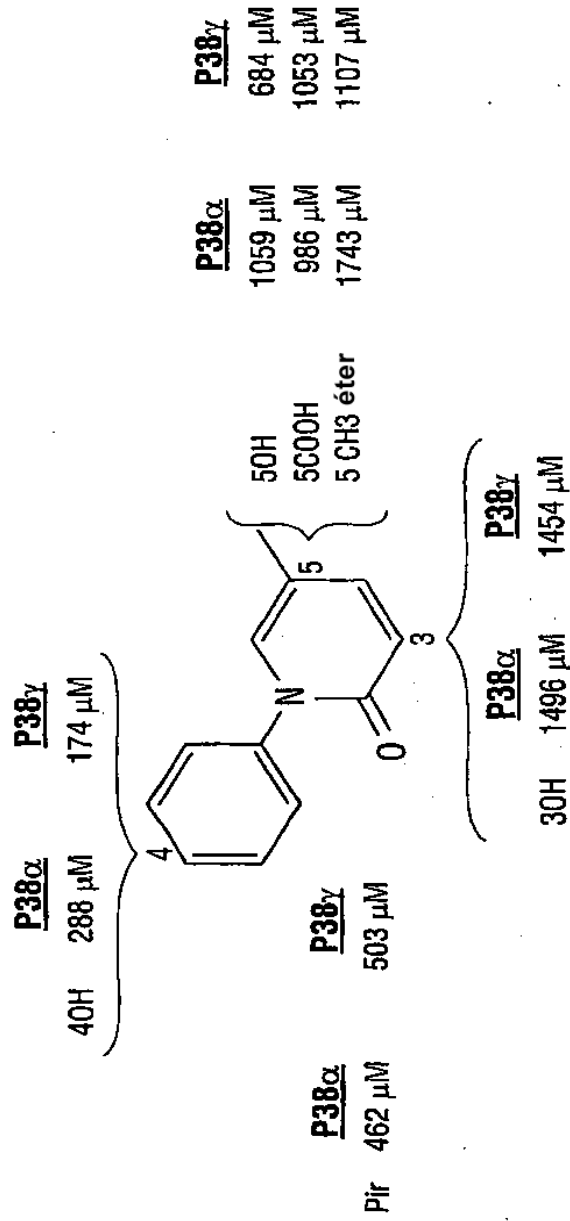


FIG. 3





Concentración de inhibidor [ $\mu$ M]



FIG. 4

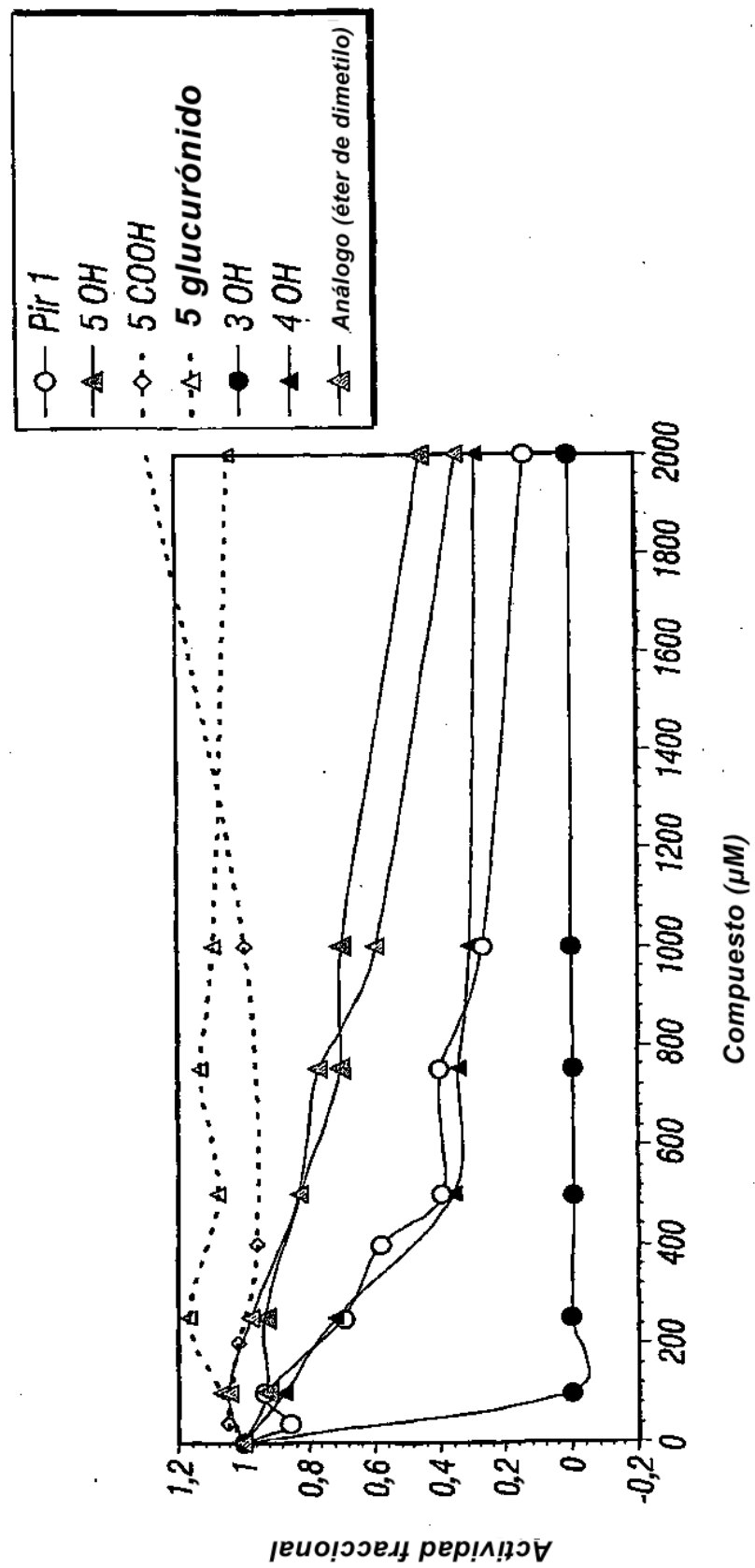


FIG. 5

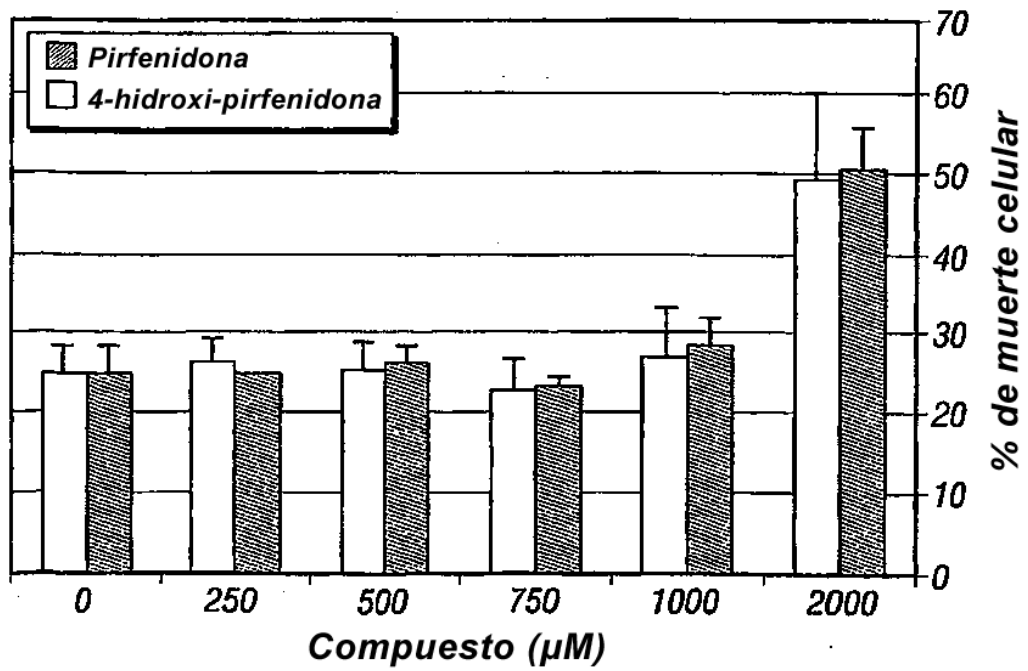
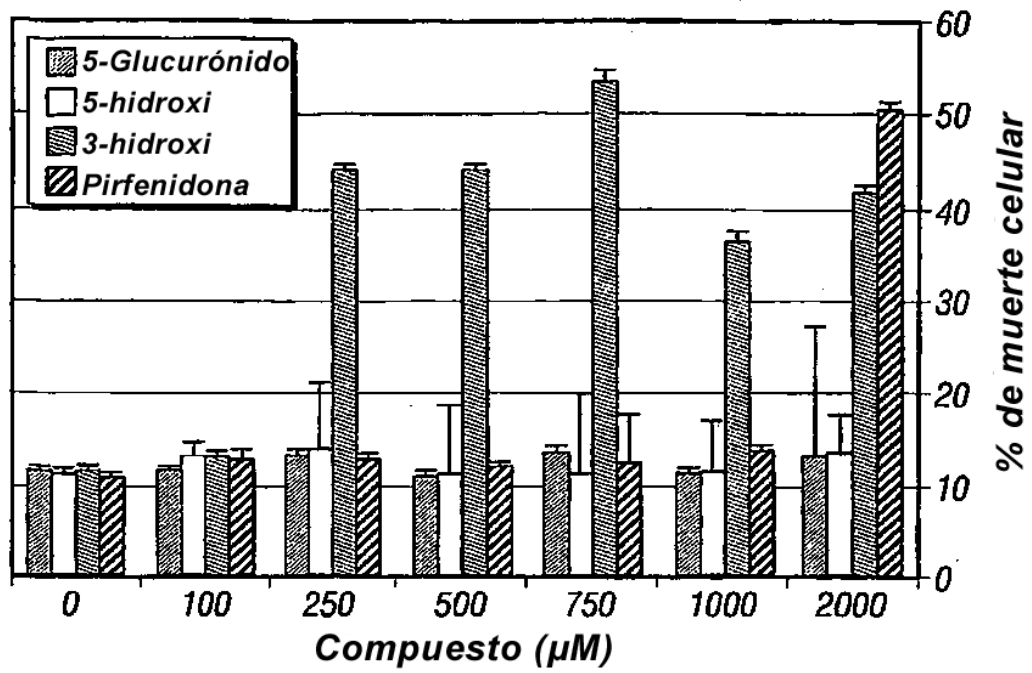
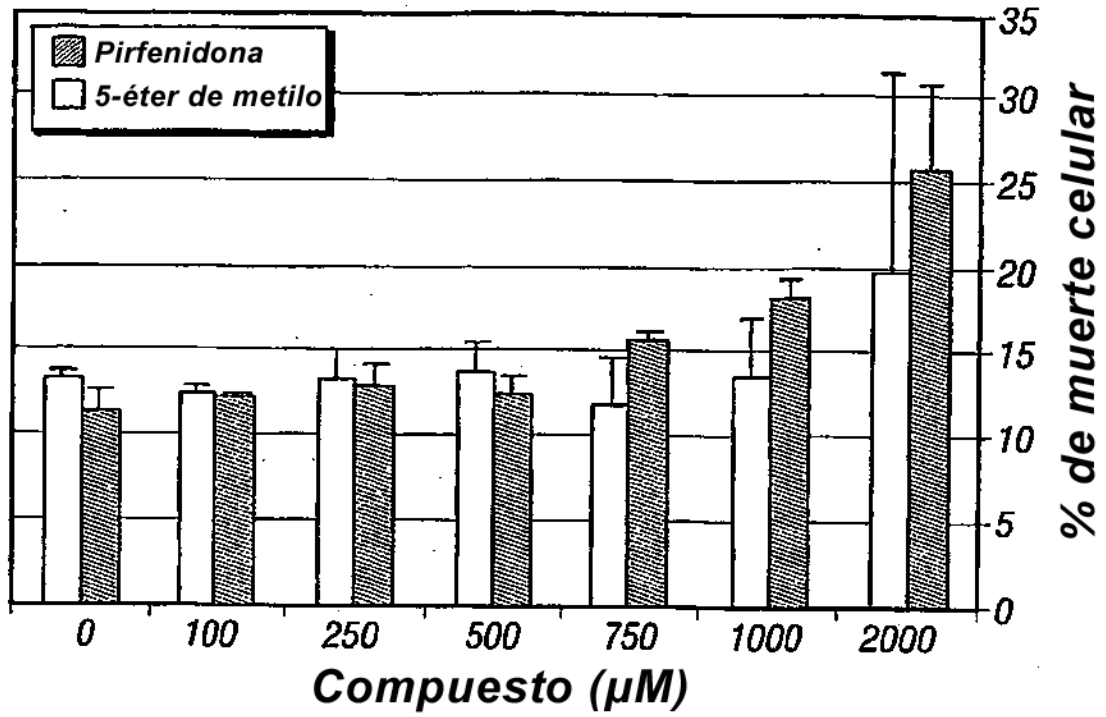


FIG. 6



**FIG. 6**  
(Continuación)