



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **315047**

(13) B1

(51) Int Cl<sup>7</sup>

C 07 D 487/04, A 61 K 31/495

## Patentstyret

---

|                   |            |                                      |                            |
|-------------------|------------|--------------------------------------|----------------------------|
| (21) Søknadsnr    | 19992960   | (86) Int. inng. dag og søknadsnummer | 1997.12.17, PCT/US97/23392 |
| (22) Inng. dag    | 1999.06.17 | (85) Videreføringsdag                | 1999.06.17                 |
| (24) Løpedag      | 1997.12.17 | (30) Prioritet                       | 1996.12.18, US, 34288      |
| (41) Alm. tilgj.  | 1999.08.17 |                                      | 1997.03.20, US, 822373     |
| (45) Meddelt dato | 2003.06.30 |                                      | 1997.06.10, US, 862925     |

|                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (71) Patenthaver | Vertex Pharmaceuticals Inc,<br>130 Waverly Street, Cambridge, MA 02139-4242, US                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| (72) Oppfinner   | Guy W Bemis, Arlington, MA 01574, US<br>Francesco Gerald Salituro, Marlborough, MA 01752, US<br>John Patrick Duffy, Westborough, MA 01581, US<br>John E Cochran, Lowell, MA 01851, US<br>Edmund Martin Harrington, Cambridge, MA 02139, US<br>Mark A Murcko, Holliston, MA 01746, US<br>Keith P Wilson, Hopkinton, MA 01748, US<br>Michael Su, Newton, MA 02159, US<br>Vincent P Galullo, Watertown, MA 02172, US |
| (74) Fullmektig  | Oslo Patentkontor AS, 0306 Oslo                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |

---

|                 |                                                                                                              |
|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (54) Benevnelse | <b>Substituerte nitrogen-inneholdende heterocykliske forbindelser som inhibitorer for p38 protein-kinase</b> |
|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

|                            |       |
|----------------------------|-------|
| (56) Anførte publikasjoner | Ingen |
|----------------------------|-------|

(57) Sammendrag

Inhibitorer av p38, et pattedyr-protein kinase som er innblandet i celleproliferasjon, celledød og respons på ekstracellulære stimuli. Også fremgangsmåter ved fremstilling av disse inhibitorer. Også tilveiebringes farmasøytiske sammensetninger som omfatter inhibitorene ifølge oppfinnelsen, og fremgangsmåter ved anvendelse av disse sammensetninger ved behandling og forebygging av forskjellige forstyrrelser.

Foreliggende oppfinnelse vedrører forbindelser som angitt i krav 1, og som kan anvendes som inhibitorer av p38, som er et pattedyr-protein kinase som er innblandet i celleproliferasjon, celledød og respons på ekstracellulære stimuli. Oppfinnelsen vedrører også fremgangsmåter ved fremstilling av disse inhibitorer. Oppfinnelsen tilveiebringer også farmasøytiske sammensetninger som omfatter inhibitorene ifølge oppfinnelsen, disse sammensetninger kan anvendes ved behandling og forebygging av forskjellige forstyrrelser.

10

#### BAKGRUNN FOR OPPFINNELSEN

Protein kinaser er innblandet i forskjellige cellulære responser på ekstracellulære signaler. Nylig er en familie mitogen-aktiverte protein kinaser (MAPK) blitt oppdaget. Medlemmer av denne familie er Ser/Thr-kinaser som aktiverer sine substrater ved fosforylasjon [B. Stein et al., Ann. Rep. Med. Chem., 31, s. 289-298 (1996)]. MAPK'er aktiveres i sin tur av diverse signaler, omfattende vekstfaktorer, cytokiner, UV-bestråling og stressinduserende midler.

Et spesielt interessant MAPK er p38. p38, også kjent som cytokin-suppressivt anti-inflammatorisk legemiddel-bindende protein (CSBP) og RK, ble isolert fra murine pre-B-celler som var blitt transfisert med lipopolysakkarid (LPS)-receptor CD14 og indusert med LPS. p38 er deretter blitt isolert og sekvensiert, liksom også cDNA'et som koder for det i menneske og mus. Aktivisering av p38 er blitt observert i celler som stimuleres av stress, såsom behandling av lipopolysakkarider (LPS), UV, anisomycin eller osmotisk sjokk, og av cytokiner, såsom IL-1 og TNF.

Inhibering av p38-kinase fører til en blokkade av produksjonen av både IL-1 og TNF. IL-1 og TNF stimulerer produksjonen av andre proinflammatoriske cytokiner såsom IL-6 og IL-8, og er blitt implisert i akutte og kroniske inflamma-

toriske sykdommer og i post-menopausal osteoporose [R.B. Kimble et al., Endocrinol., 136, s. 3054-3061 (1995)].

På grunnlag av dette funn tror man at p38 sammen med andre MAPK'er spiller en rolle ved mediering av cellulære respon-  
 5 ser på inflammatoriske stimuli, såsom leukocyttakkumula-  
 sjon, makrofag/monocyt-aktivering, vevresorpsjon, feber,  
 akutfase-responser og neutrofili. I tillegg er MAPK'er  
 såsom p38 blitt implisert i kreft, trombin-indusert blod-  
 plateaggregasjon, immunsviktforstyrrelser, autoimmune syk-  
 10 dommer, celledød, allergier, osteoporose og neurodegenera-  
 tive forstyrrelser. Inhibitorer av p38 er også blitt impli-  
 sert i området smertere regulering ved inhibering av prosta-  
 glandin endoperoksid syntase-2-induksjonen. Andre sykdommer  
 forbundet med IL-1-, IL-6-, IL-8- eller TNF-overproduksjon  
 15 beskrives i WO 96/21654.

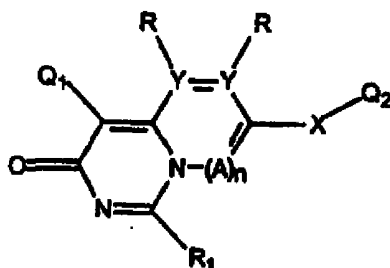
Andre har allerede begynt å prøve å utvikle legemidler som  
 spesifikt inhiberer MAPK'er. F.eks. beskriver PCT-publika-  
 sjonen WO 95/31451 pyrazolforbindelser som inhiberer  
 MAPK'er, og spesielt p38. Imidlertid blir virkningen av  
 20 disse inhibitorer *in vivo* fortsatt undersøkt.

Følgelig finnes det fortsatt et sterkt behov for å utvikle  
 andre sterke, p38-spesifikke inhibitorer som er nyttige ved  
 behandling av forskjellige tilstander forbundet med p38-  
 aktivering.

## 25 SAMMENFATNING AV OPPFINNELSEN

Foreliggende oppfinnelse løser dette problem ved å tilveie-  
 bringe forbindelser som oppviser en sterk og spesifikk  
 inhibering av p38.

Disse forbindelser har den generelle formel:



(Ia)

hvor  $Q_1$  og  $Q_2$  hver uavhengig velges fra karbocykliske eller heterocykliske ringsystemer valgt fra fenyl, naftyl, pyridyl, tienyl, benzofuranyl, benzotienyl, indolyl, imidazolyl eller furanyl, hvor:

- 5  $Q_1$  er substituert med 1 til 4 substituent, som hver uavhengig velges fra halogen;  $C_1$ - $C_3$ -alkyl som valgfritt kan være substituert med  $NR'_2$ ,  $OR'$ ,  $CO_2R'$  eller  $CONR'_2$ ; O-  
( $C_1$ - $C_3$ )alkyl som valgfritt kan være substituert med  $NR'_2$ ,  
10  $OR'$ ,  $CO_2R'$  eller  $CONR'_2$ ;  $NR'_2$ ;  $CF_3$ ;  $NO_2$ ;  $CO_2R'$ ;  $CONR'$ ;  $C_1$ - $C_3$ -  
alkylendioksy;  $CN$ ;  $N=CH-N(R')_2$ ; morfolino- $C_1$ - $C_3$ -alkanoyl-  
amino; halo- $C_1$ - $C_3$ -alkanoylamino;  $C_1$ - $C_3$ -alkanoylamino eller  
OH;

- $Q_2$  er valgfritt substituert med opptil 4 substituent, som  
hver uavhengig velges fra halogen; rettkjedet eller  
15 forgrenet  $C_1$ - $C_3$ -alkyl som valgfritt kan være substituert  
med  $CONR'_2NR'_2$ ,  $OR'$ ,  $CO_2R'$ ,  $NHR^3$ ,  $R^3$  eller  $CONR'_2$ ; O- $(C_1$ -  
 $C_3)$ alkyl som valgfritt kan være substituert med  $NR'_2$ ,  $OR'$   
eller  $CO_2R'$ ,  $NR'_2$ ;  $OCF_3$ ;  $CF_3$ ;  $NO_2$ ;  $CO_2R'$ ;  $CONHR'$ ;  $SR^1$ ;  $CH$ ;  
 $CONR'_2$ ;  $CH=N-OH$ ;  $NHC(O)OR'$ ;  $NH_2C(O)NH_2$ ;  $NHC(=NH)(NH_2)$ ;  
20  $C(O)R'$  eller OH.

$R'$  velges fra hydrogen,  $(C_1$ - $C_3)$ alkyl valgfritt substituert med OH,  $NH_2$  eller karboksy; eller fenyl.

R<sup>3</sup> velges fra piperazinyll; pyrrolidinyl; imidazolyl;  
morfolinyl eller fenyl.

X velges fra -S-, -C(O)- eller -CH(OH);

hvor R velges uavhengig fra hydrogen, -R<sup>2</sup>, -N(R<sup>2</sup>)<sub>2</sub> eller  
5 -OR<sup>2</sup>,

R<sup>2</sup> velges fra hydrogen eller (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)alkyl,

Y betyr N eller C,

når A foreligger, betyr den N eller CR',

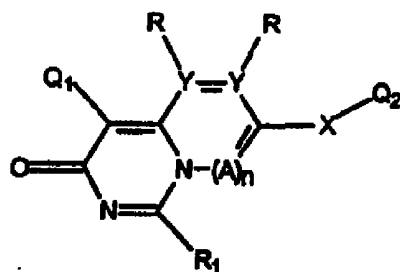
n betyr 0 eller 1.

10 R<sub>1</sub> velges fra hydrogen, (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)alkyl, OH eller O-(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)-  
alkyl.

I en annen utførelse tilveiebringer oppfinnelsen farmasøytiske sammensetninger omfattende p38-inhibitorene ifølge oppfinnelsen. Disse sammensetninger kan benyttes ved behandling eller forebyggelse av forskjellige forstyrrelser, 15 såsom kreft, inflammatoriske sykdommer, autoimmune sykdommer, destruktive benforstyrrelser, proliferative forstyrrelser, infeksjonssykdommer, virale sykdommer og neurodegenerative sykdommer. Disse sammensetninger er også nyttige ved forebyggelse av celledød og hyperplasi, og kan derfor 20 brukes for å behandle eller forebygge reperfusjon/iskemi ved slag, hjerteanfall, organhypoksi. Sammensetningene er også nyttige ved forebyggelse av trombin-indusert blodplateaggregasjon.

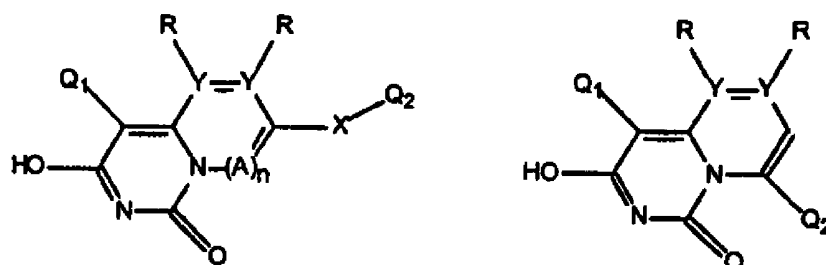
#### 25 DETALJERT BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer inhibitorer av p38 som har den generelle formel:



(Ia)

Hvor de enkelte substituenten har samme betydning som nevnt ovenfor. Det vil være åpenbart for en fagman at hvis  $R_1$  betyr OH, kan den dannede inhibitor tautomerisere og danne en forbindelse med formel:



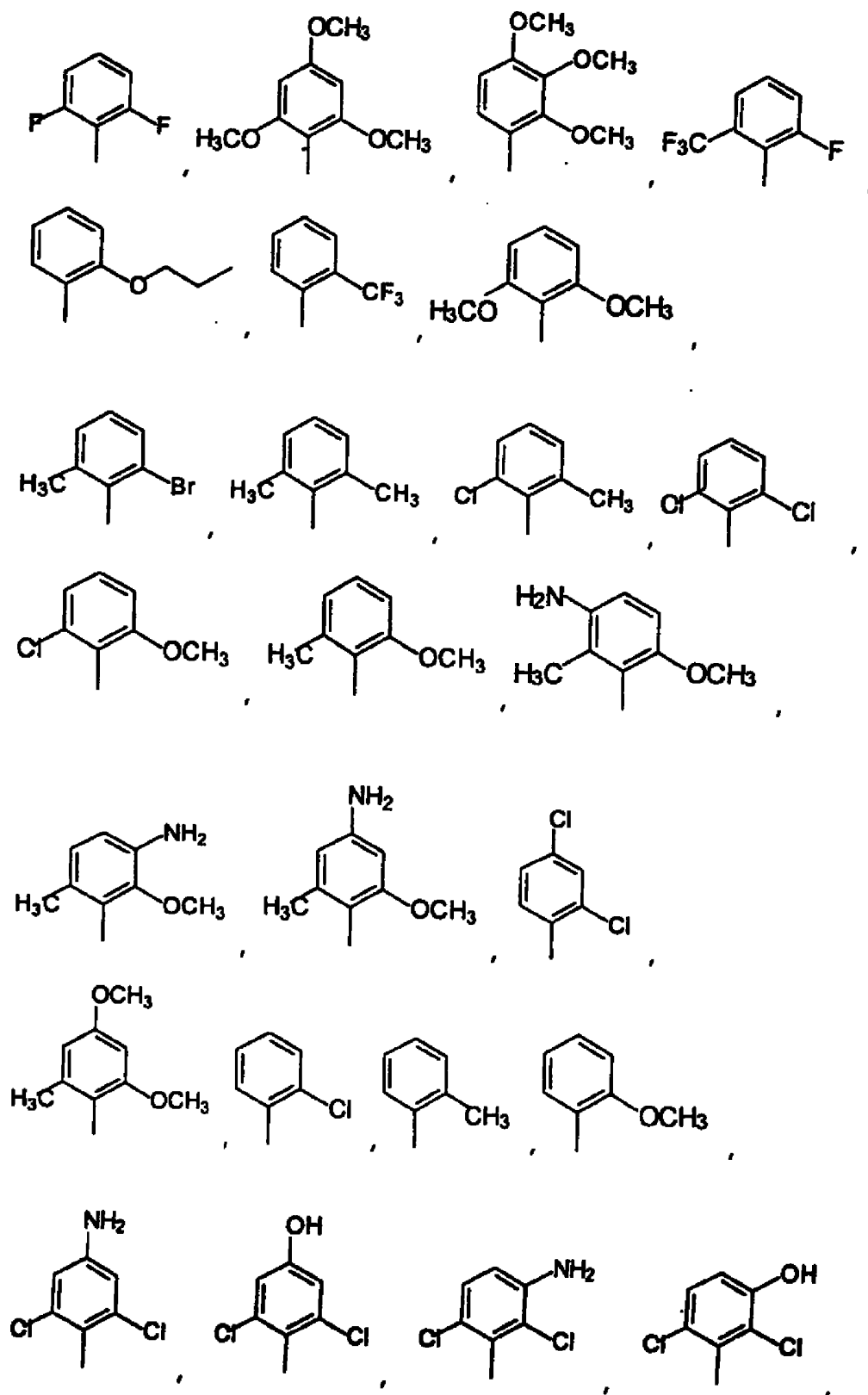
eller

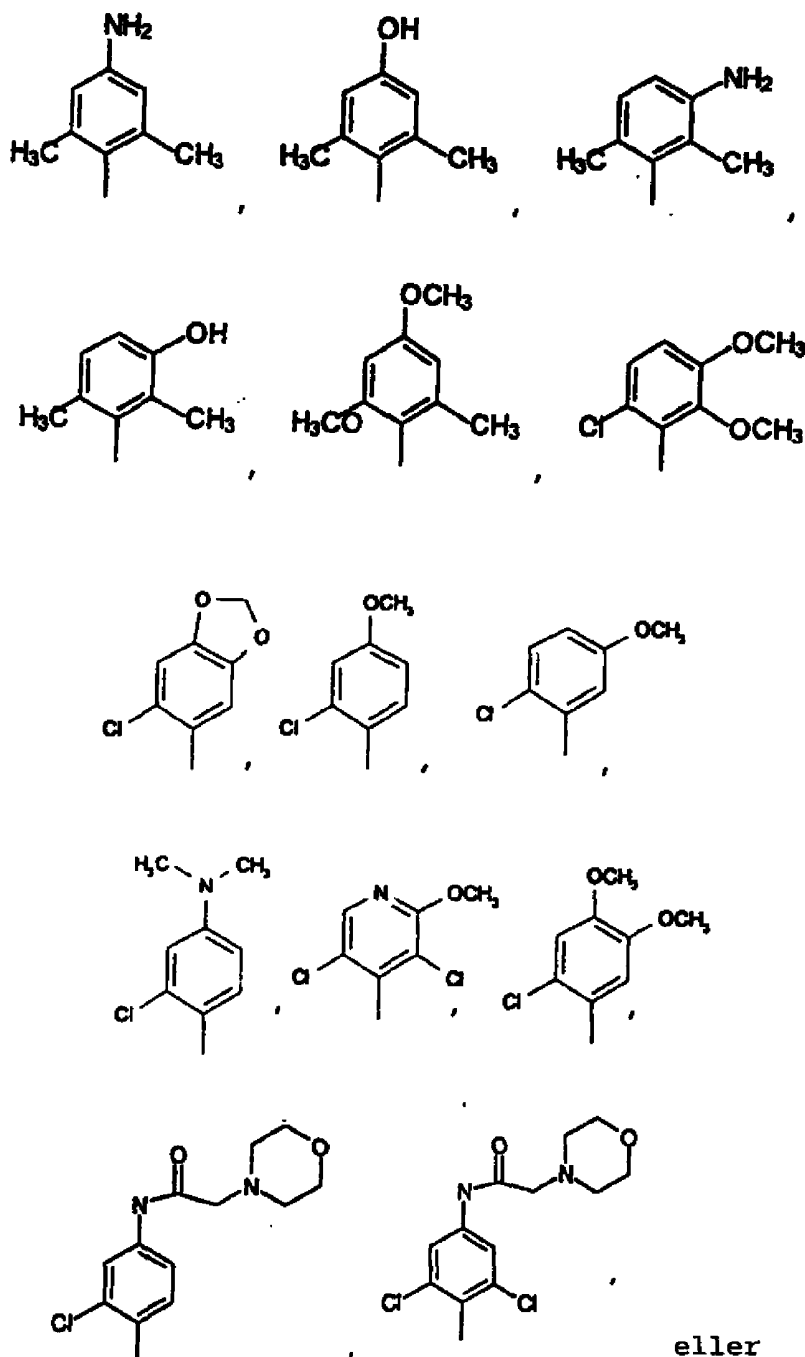
5 som også er p38-inhibitorer ifølge oppfinnelsen.

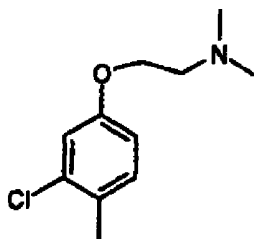
I henhold til en annen foretrukken utførelse velges  $Q_1$  fra fenyl eller pyridyl som inneholder 1-3 substituenten, hvor minst én av substituentene er i orto-posisjon og substituentene hver uavhengig velges fra klor, fluor, brom,  $-CH_3$ ,  
 10  $-OCH_3$ ,  $-OH$ ,  $-CF_3$ ,  $-OCF_3$ ,  $-O(CH_2)_2CH_3$ ,  $NH_2$ , 3,4-metylendioksy,  $-N(CH_3)_2$ ,  $-NH-C(O)CH_2$ -morfolin eller  $-O-(CH_2)_2-N(CH_3)_2$ .

Enda mer foretrukne er fenyl eller pyridyl som inneholder minst 2 av de ovennevnte substituenten, hvorav begge foreligger i orto-posisjon

15 Noen bestemte eksempler på  $Q_1$  er:



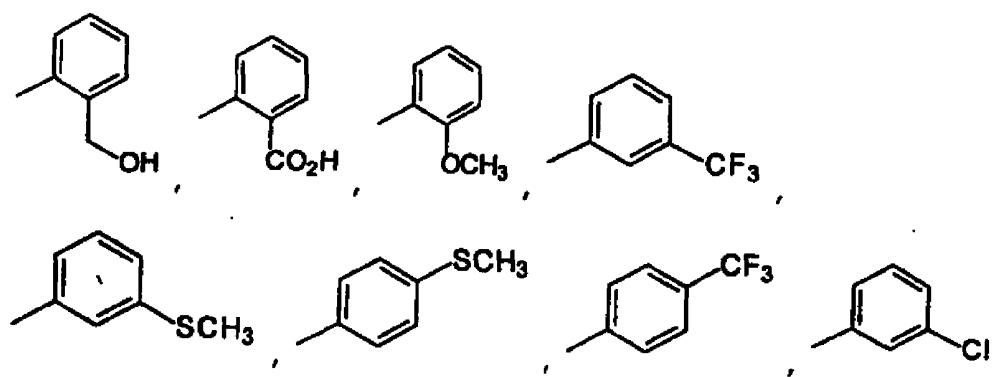


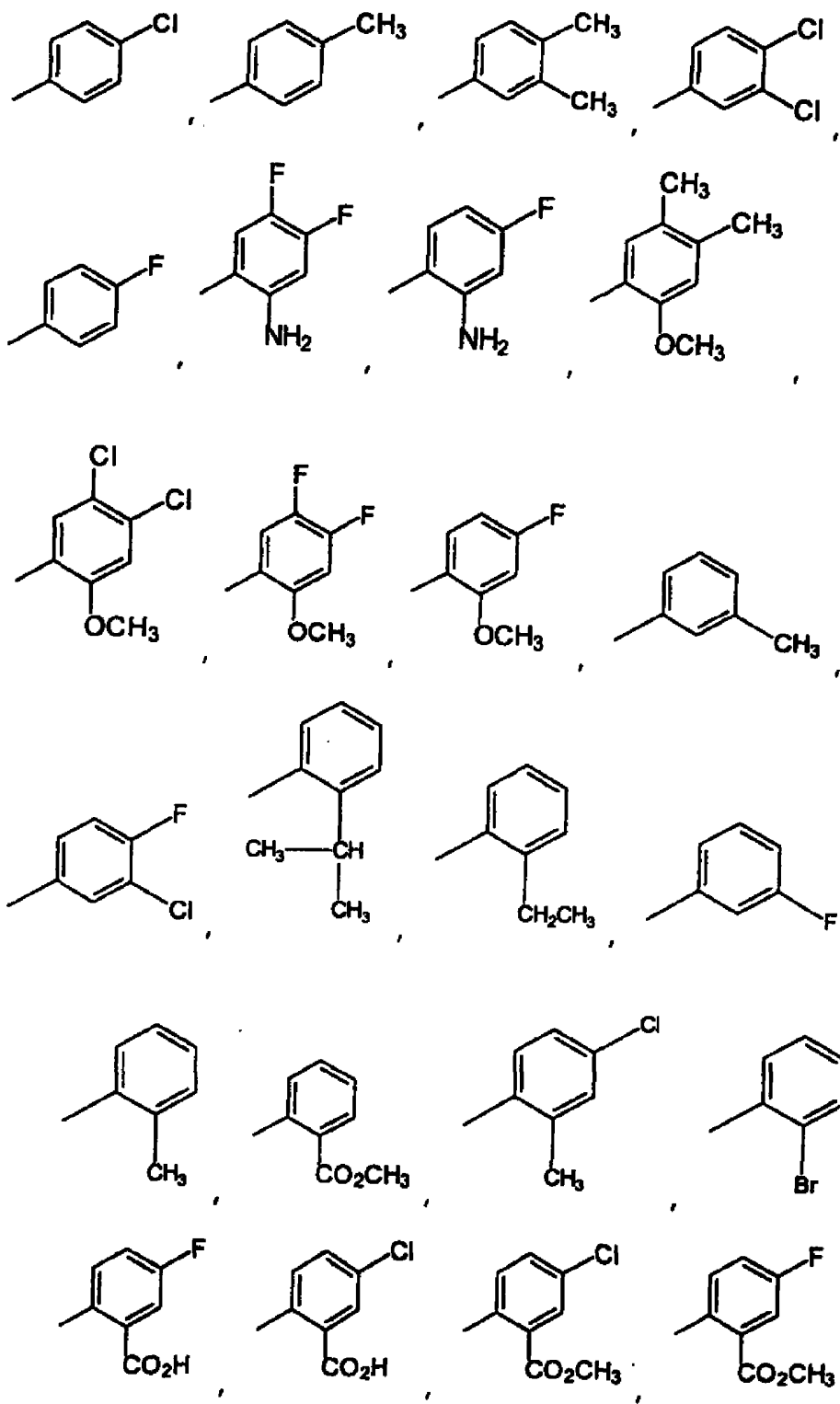


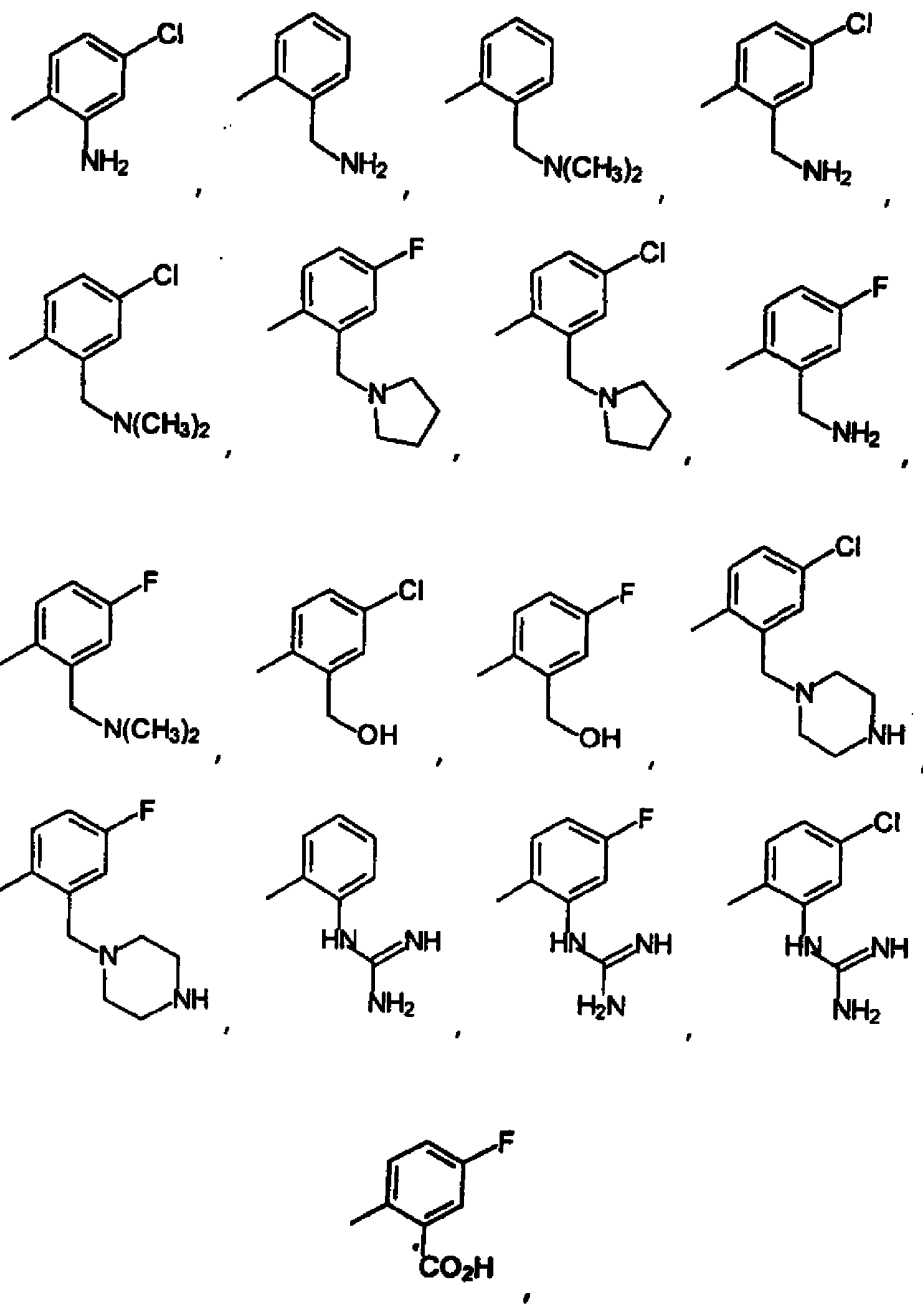
Mest foretrukket velges  $Q_1$  fra 2-fluor-6-trifluormetyl-  
 fenyl, 2,6-difluorfenyl, 2,6-diklorfenyl, 2-klor-4-hydrok-  
 syfenyl, 2-klor-4-aminofenyl, 2,6-diklor-4-aminofenyl, 2,6-  
 diklor-3-aminofenyl, 2,6-dimetyl-4-hydroksyfenyl, 2-met-  
 5 oksy-3,5-diklor-4-pyridyl, 2-klor-4,5-metylendioksyfenyl  
 eller 2-klor-4-(N-2-morfolinoacetamido)fenyl.

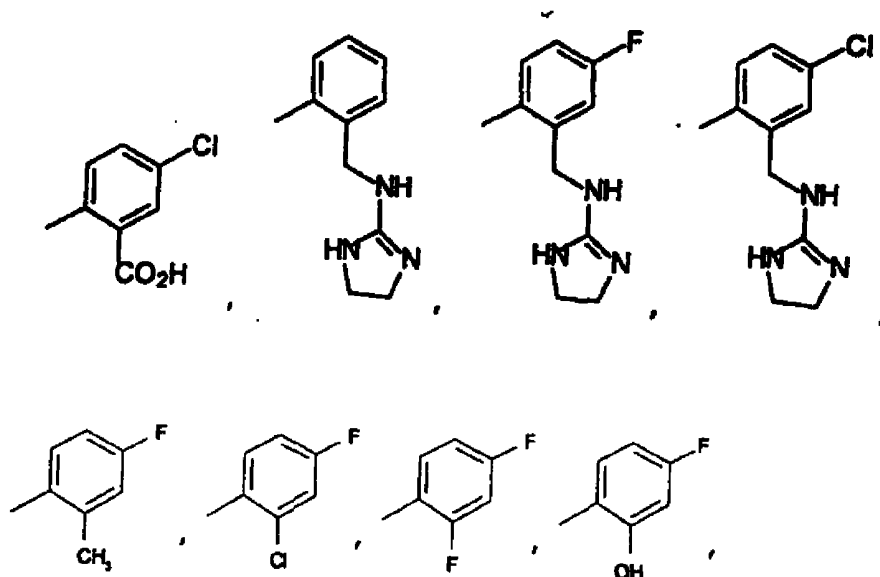
I henhold til en foretrukken utførelse betyr  $Q_2$  fenyl eller  
 pyridyl som inneholder 0-3 substituenten, hvor hver substi-  
 tuent uavhengig velges fra klor, fluor, brom, metyl, etyl,  
 10 isopropyl,  $-OCH_3$ ,  $-OH$ ,  $-NH_2$ ,  $-CF_3$ ,  $-OCF_3$ ,  $-SCH_3$ ,  $-OCH_3$ ,  
 $-C(O)OH$ ,  $-C(O)OCH_3$ ,  $-CH_2NH_2$ ,  $-N(CH_3)_2$ ,  $-CH_2$ -pyrrolidin og  
 $-CH_2OH$ .

Noen bestemte eksempler på foretrukne  $Q_2$  er:









usubstituert 2-pyridyl eller usubstituert fenyl.

Mest foretrukne er forbindelser hvor  $Q_2$  velges fra fenyl, 2-isopropylfenyl, 3,4-dimethylfenyl, 2-ethylfenyl, 3-fluorfenyl, 2-methylfenyl, 3-klor-4-fluorfenyl, 3-klorfenyl, 2-karbometoksyfenyl, 2-karboksyfenyl, 2-metyl-4-klorfenyl, 2-bromfenyl, 2-pyridyl, 2-metylenhydroksyfenyl, 4-fluorfenyl, 2-metyl-4-fluorfenyl, 2-klor-4-fluorfenyl, 2,4-difluorfenyl, 2-hydroksy-4-fluorfenyl eller 2-metylenhydroksy-4-fluorfenyl.

10 I henhold til enda en annen foretrukken utførelse betyr X -S- eller -C(O)-. X betyr mest foretrukket S.

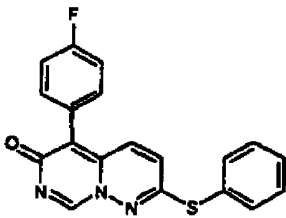
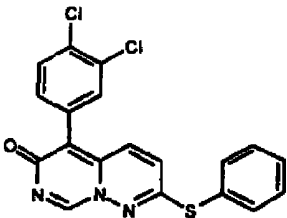
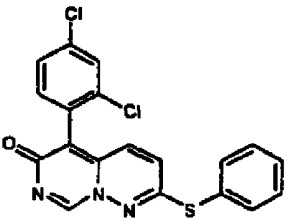
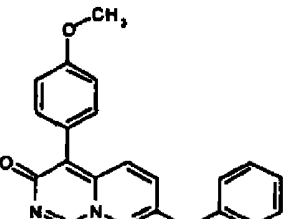
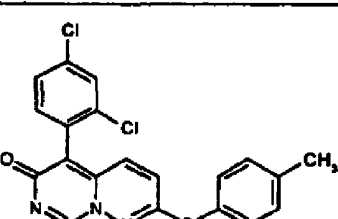
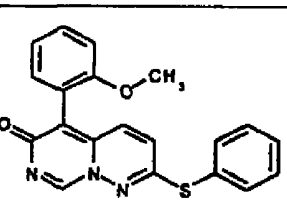
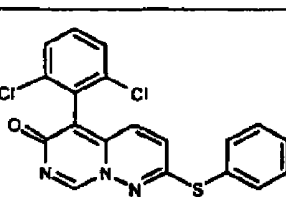
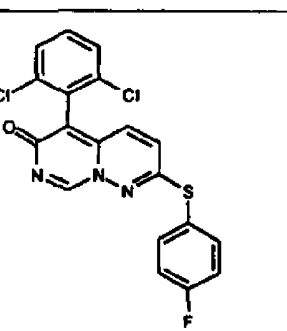
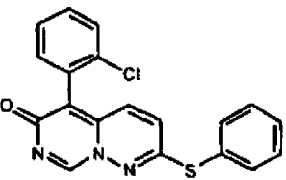
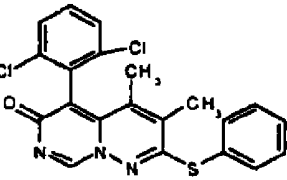
I henhold til en annen foretrukken utførelse betyr n 1, og A betyr N.

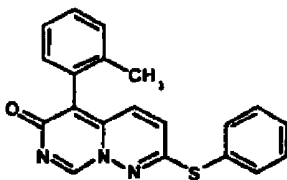
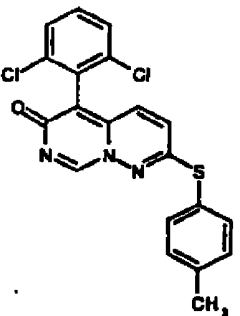
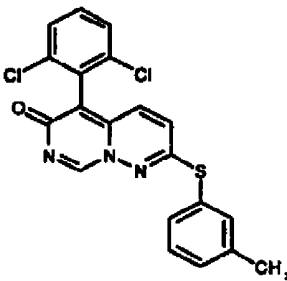
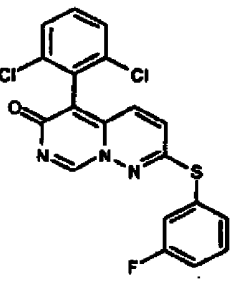
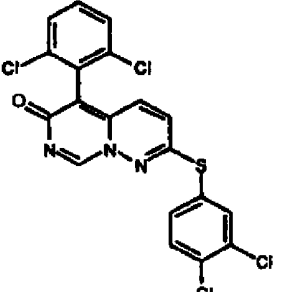
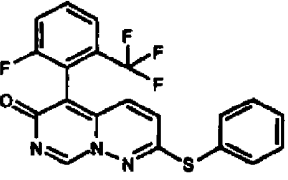
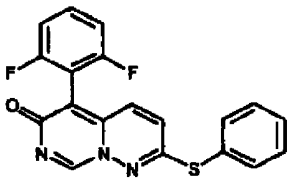
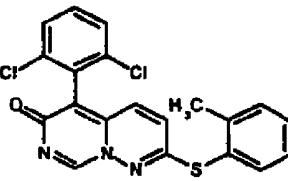
15 I henhold til en annen foretrukken utførelse betyr hver Y C.

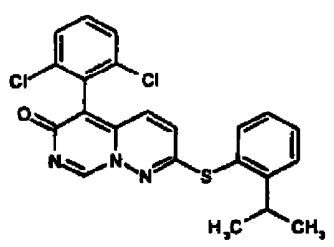
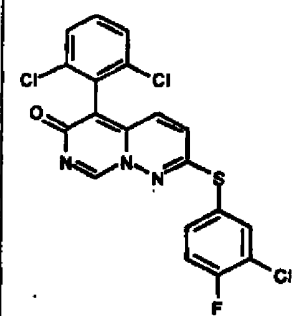
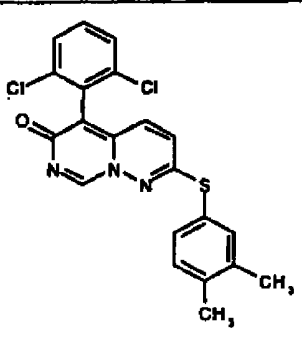
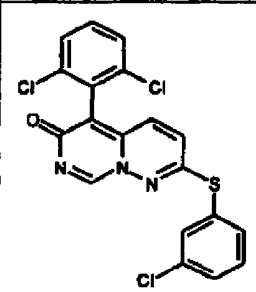
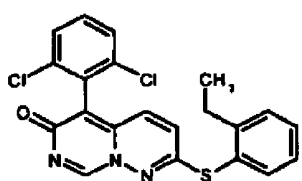
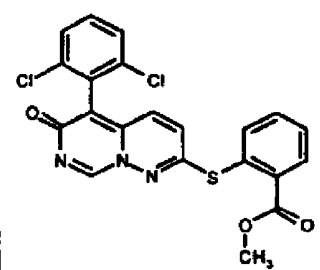
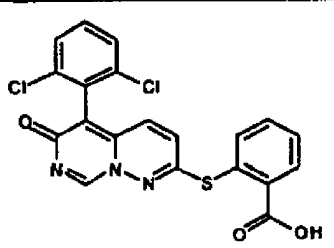
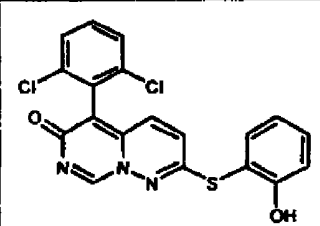
I henhold til en enda mer foretrukken utførelse betyr hver Y C, og R'ene forbundet med disse Y-komponenter, velges fra hydrogen eller metyl.

Noen bestemte inhibitorer ifølge foreliggende oppfinnelse  
vises i den følgende tabell.

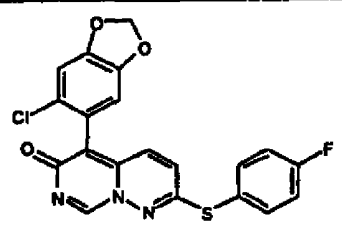
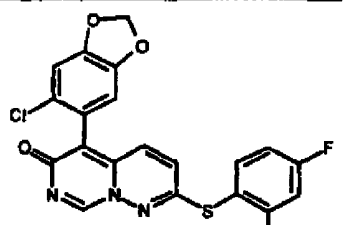
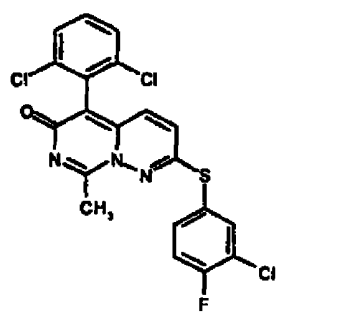
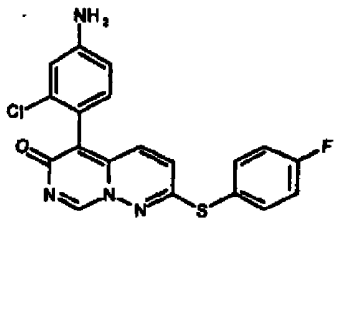
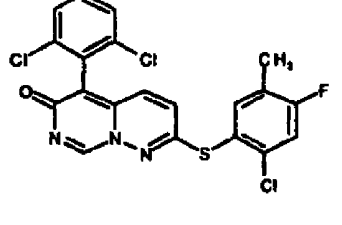
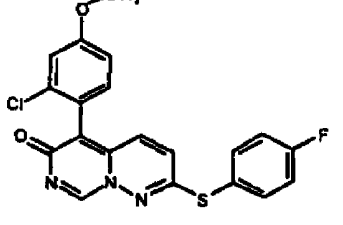
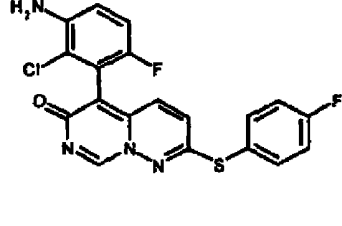
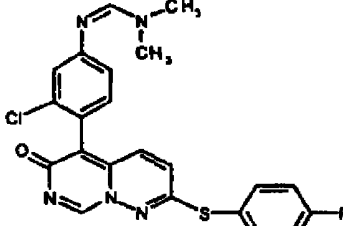
Tabell 1: Forbindelser med formel Ia

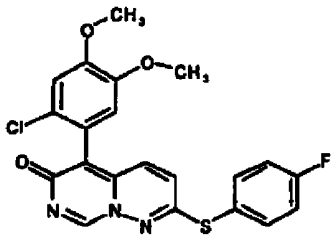
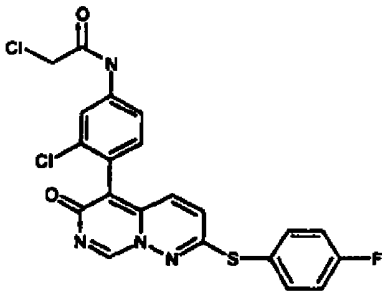
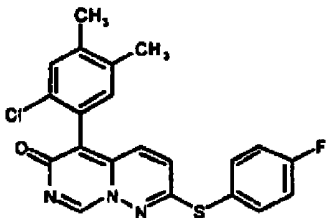
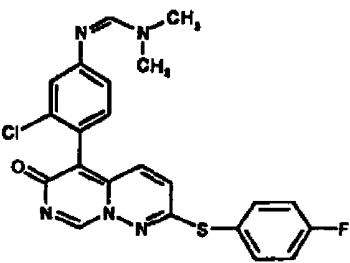
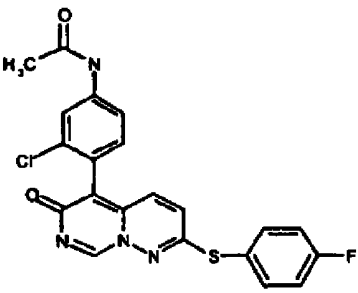
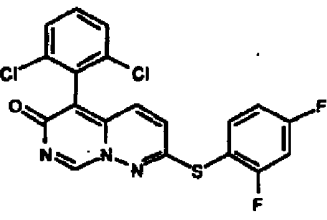
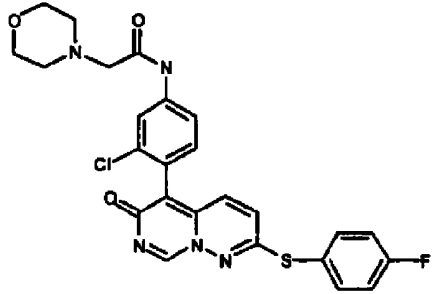
| forb. nr. | struktur                                                                            | forb. nr. | struktur                                                                             |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 2         |    | 9         |    |
| 3         |    | 10        |    |
| 5         |  | 11        |  |
| 6         |  | 12        |  |
| 7         |  | 13        |  |

| forb.<br>nr. | struktur                                                                            | forb.<br>nr. | struktur                                                                             |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 8            |    | 14           |    |
| 15           |   | 21           |   |
| 16           |  | 22           |  |
| 17           |  | 23           |  |

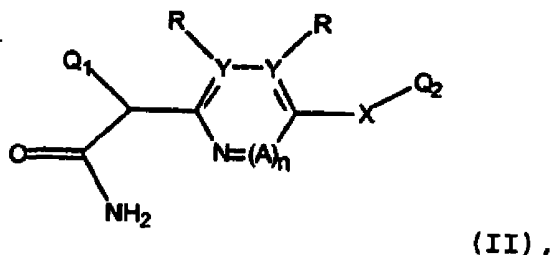
| forb.<br>nr. | struktur                                                                            | forb.<br>nr. | struktur                                                                             |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 18           |    | 24           |    |
| 19           |   | 25           |   |
| 20           |  | 26           |  |
| 27           |  | 33           |  |

| forb.<br>nr. | struktur | forb.<br>nr. | struktur |
|--------------|----------|--------------|----------|
| 28           |          | 34           |          |
| 29           |          | 35           |          |
| 30           |          | 36           |          |
| 31           |          | 37           |          |
| 32           |          | 38           |          |

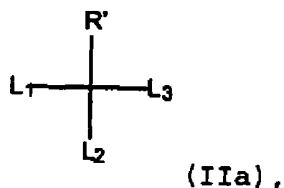
| forb.<br>nr. | struktur                                                                            | forb.<br>nr. | struktur                                                                             |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 39           |    | 45           |    |
| 40           |   | 46           |   |
| 41           |  | 47           |  |
| 42           |  | 48           |  |

| forb.<br>nr. | struktur                                                                            | forb.<br>nr. | struktur                                                                             |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 43           |    | 49           |    |
| 44           |   | 50           |   |
| 51           |  | 53           |  |
| 52           |  |              |                                                                                      |

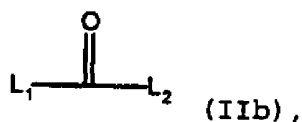
Inhibitorer av p38 med formel (Ia) som ble avbildet ovenfor kan fremstilles ved fremgangsmåter som omfatter å omsette en forbindelse med formel II:



hvor hver av variablene i formelen ovenfor er de samme som ble definert ovenfor for inhibitorene ifølge foreliggende oppfinnelse, med en utgående gruppe-reagens med formel IIa:



hvor R' har den ovennevnte betydning, eller en utgående gruppe-reagens med formel IIb:



hvor L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub> og L<sub>3</sub> hver uavhengig betyr en utgående gruppe.

- 10 Den utgående gruppe-reagens som brukes i denne omsetning, settes til i et overskudd, enten i ren form eller med et ko-løsemiddel, såsom toluen. Omsetningen utføres ved en temperatur fra 25-150°C.

15 Utgående gruppe-reagenser med formel IIa som er nyttige ved fremstilling av p38-inhibitorer ifølge foreliggende oppfin-

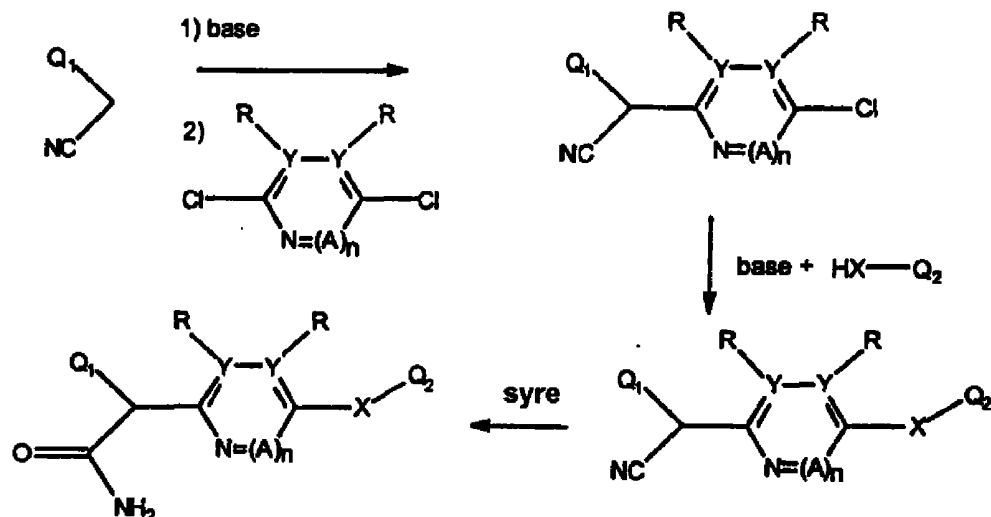
nelse, omfatter dimetylformamiddimetylacetal, dimetylacet-  
amiddimetylacetal, trimetylortoformat, dimetylformamiddi-  
etylacetal og andre beslektede reagenser. Den utgående  
gruppe-reagens med formel IIa som brukes for å fremstille  
5 inhibitorene ifølge foreliggende oppfinnelse, er fortrinns-  
vis dimetylformamiddimetylacetal.

Utgående gruppe-reagenser med formel IIb som er nyttige ved  
fremstilling av p38-inhibitorene ifølge foreliggende opp-  
finnelse, omfatter fosgen, karbonyldiimidazol, dietylkarmo-  
10 nat og trifosfgen.

Mer foretrukne fremgangsmåter ved fremstilling av forbin-  
delsene ifølge oppfinnelsen, benytter seg av forbindelser  
med formel II hvor hver av variablene er definert i henhold  
til de mer foretrukne og mest foretrukne valg som ble  
15 beskrevet ovenfor for forbindelsene ifølge foreliggende  
oppfinnelse.

På grunn av at kilden for  $R_1$  er det utgående gruppe-reagens  
(C-R' eller C=O), er dens identitet naturligvis avhengig av  
strukturen av dette reagens. I forbindelser hvor  $R_1$  betyr  
20 OH, må reagenset som brukes, derfor være IIb. På lignende  
måte, når  $R_1$  betyr H eller (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)alkyl, må reagenset som  
brukes, være IIa. For å generere inhibitorer hvor  $R_1$  betyr  
O-(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)alkyl, genereres først en forbindelse hvor  $R_1$  betyr  
OH, etterfulgt av alkylering av dette hydroksy ved stan-  
25 dardteknikker, såsom behandling med Na-hydrid i DMF, metyl-  
jodid og etyljodid.

De umiddelbare forløpere av inhibitorene ifølge forelig-  
gende oppfinnelse med formel (Ia) (dvs. forbindelser med  
formel II) kan i sin tur syntetiseres ved enten av syntese-  
30 skjemaene som avbildes i det følgende:

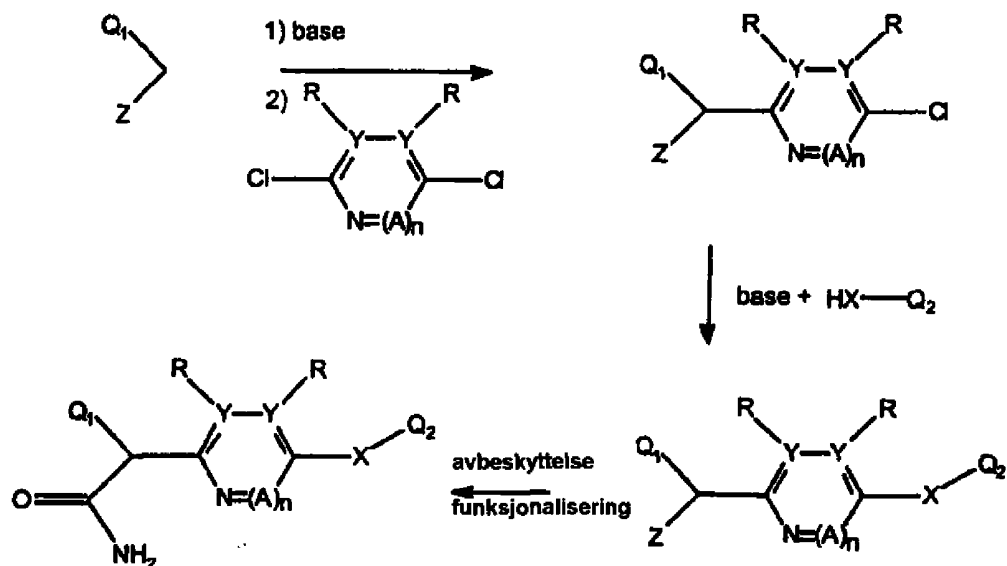
SKJEMA 1

I skjema 1 kan rekkefølgen av trinnene 1) og 2) byttes om. Dessuten kan utgangsnitrilet erstattes med en tilsvarende syre eller med en ester. Alternativt kan andre velkjente latente karboksyl- eller karboksamid-enheter brukes istedenfor nitrilet (jfr. skjema 2). Variasjoner såsom karboksylsyre, karboksylsyreestere, oksazolinere eller oksizolidinoner kan innlemmes i dette skjema ved å benytte påfølgende avbeskyttelses- og funksjonaliseringsmetoder som er velkjent innen faget.

Basen som brukes i det første trinn av skjema 1 (og i det følgende skjema 2), velges fra natriumhydrid, natriumamid, LDA, litiumheksametyldisilazid, natriumheksametyldisilazid eller hvilke som helst andre ikke-nukleofile baser som vil deprotonere stillingen i alfa-posisjon i forhold til nitrilet.

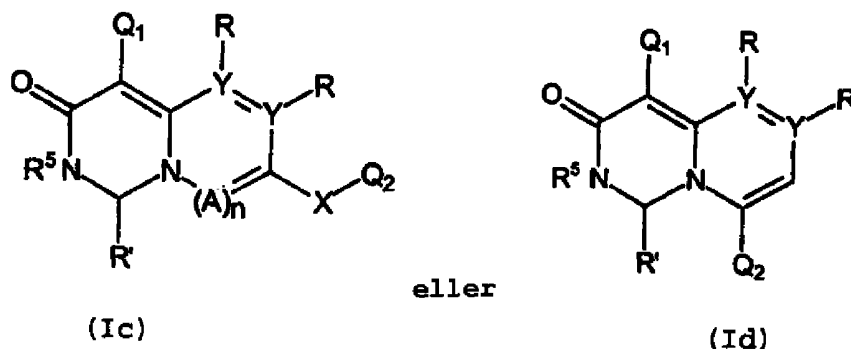
Dessuten kan tilsetningen av HX-Q<sub>2</sub> i ett trinn slik det vises ovenfor, erstattes med to trinn: tilsetning av et beskyttet eller ubeskyttet X-derivat etterfulgt av tilsetningen av et Q<sub>2</sub>-derivat i et påfølgende trinn.

## SKJEMA 2



I skjema 2 velges Z fra  $\text{COOH}$ ,  $\text{COOR}'$ ,  $\text{CON}(\text{R}')_2$ , oksazolin, oksazolidinon og  $\text{CN}$ .  $\text{R}'$  har den ovennevnte betydning.

I henhold til en annen utførelse tilveiebringer oppfinnelsen inhibitorer av p38 som ligner de ovennevnte som har formel Ia, men hvor  $\text{C}=\text{N}$  i ringen som bærer  $\text{Q}_1$ -substituenten, er redusert. Disse inhibitorer har formel:



eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, hvor A,  $\text{Q}_1$ ,  $\text{Q}_2$ , R,  $\text{R}'$ , X, Y og n er definert på samme måte som ble beskrevet for forbindelser med formel Ia. Disse definisjoner gjelder for alle utførelser av hver av disse vari-

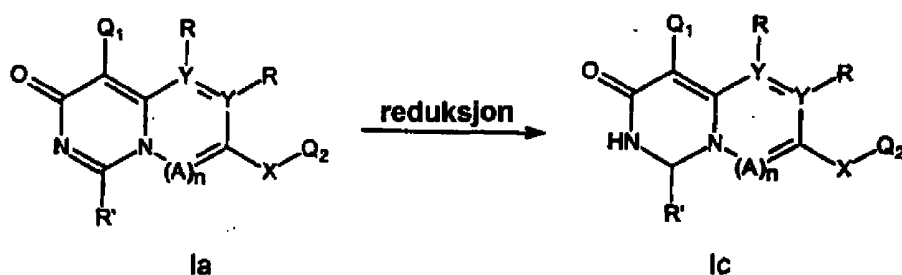
abler (dvs. grunnleggende, foretrukket, mer foretrukket og mest foretrukket).  $R^5$  velges fra hydrogen eller  $-CR'_2OH$ .

Når  $R^5$  ikke betyr hydrogen, forventer man at de dannede forbindelser vil være prodrogeformer, som bør spaltes *in vivo* for å gi en forbindelse hvor  $R^5$  betyr hydrogen.

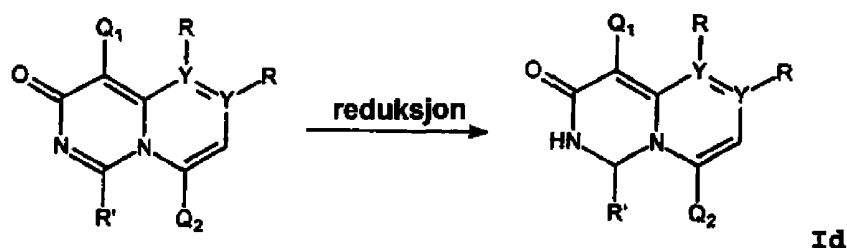
Ifølge andre foretrukne utførelser betyr A i forbindelser med formel Ic fortrinnsvis nitrogen, n betyr fortrinnsvis 1 og X betyr fortrinnsvis svovel. I forbindelser med formel Ic eller Id er  $Q_1$  og  $Q_2$  fortrinnsvis de samme grupper som ble nevnt ovenfor for disse variabler i forbindelser med formel Ia.

Forbindelser med formel Ic og Id kan fremstilles direkte fra forbindelser med formel Ia som inneholder et hydrogen,  $C_1$ - $C_3$ -alkyl eller  $C_2$ - $C_3$ -alkenyl eller alkynyl i  $R_1$ -posisjon (f.eks. hvor  $R_1 = R'$ ). Synteseskjemaene for disse forbindelser avbildes i de følgende skjemaer 5 og 6.

#### SKJEMA 5



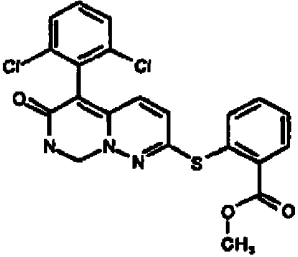
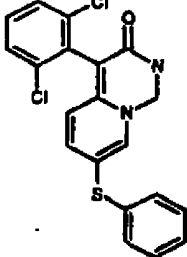
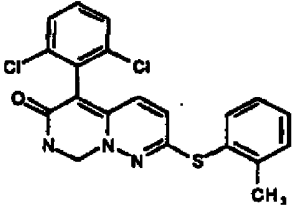
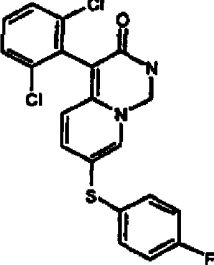
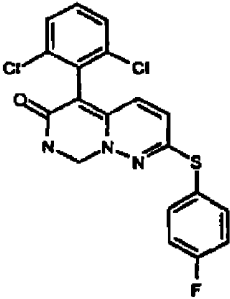
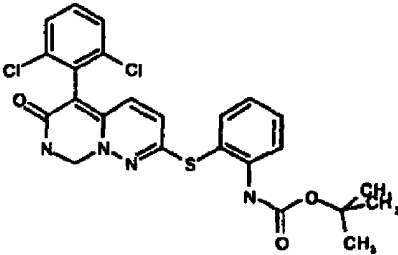
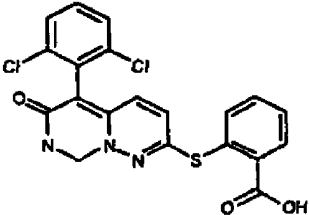
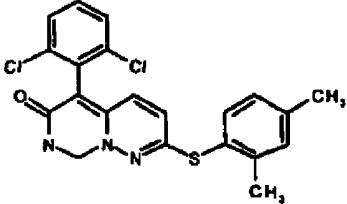
#### SKJEMA 6

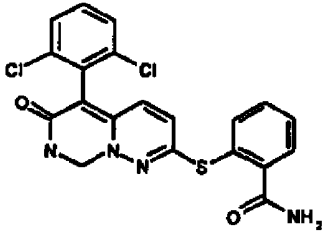
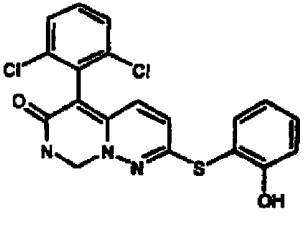
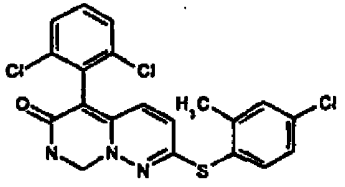
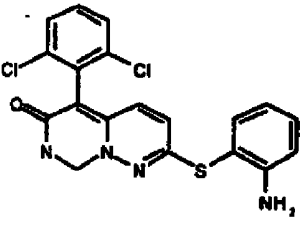
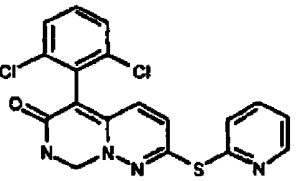
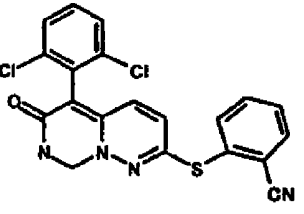
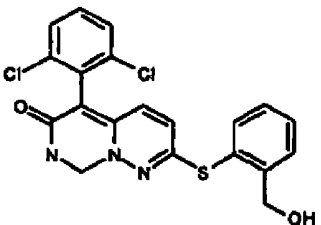
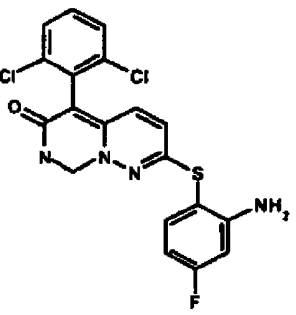
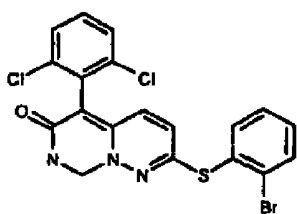
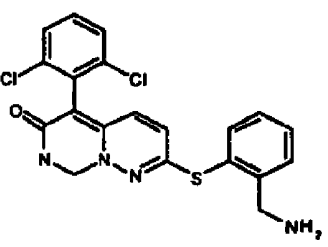


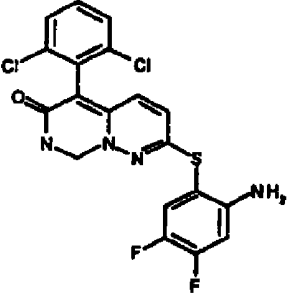
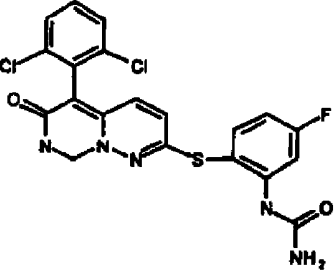
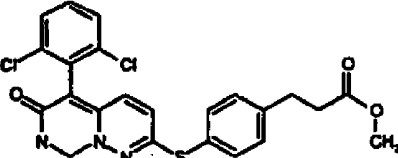
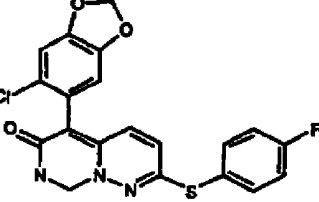
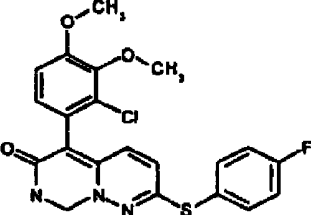
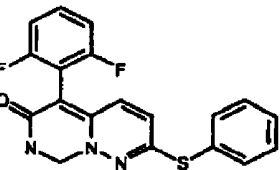
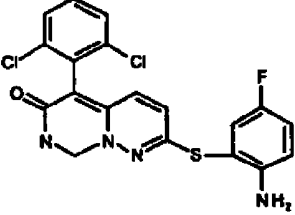
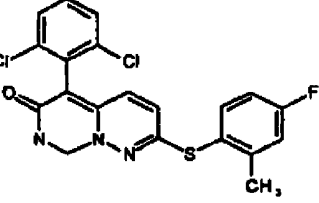
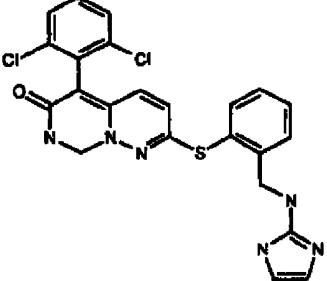
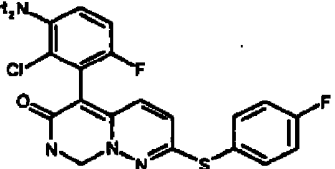
I disse skjemaer reduseres forbindelser med formel Ia ved omsetning med et overskudd diisobutylaluminiumhydrid eller en likeverdig reagens for å gi de ringreduserte forbindelser med formel Ic hhv. Id.

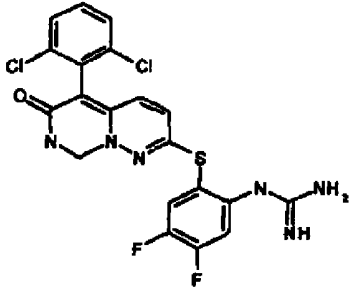
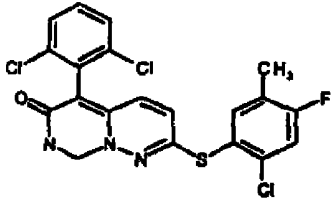
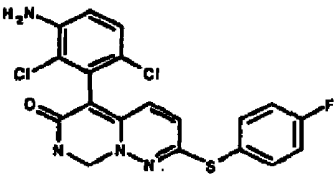
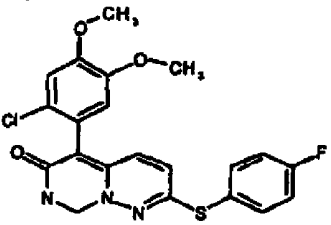
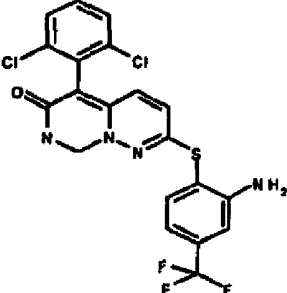
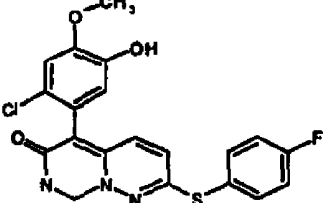
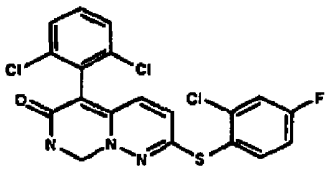
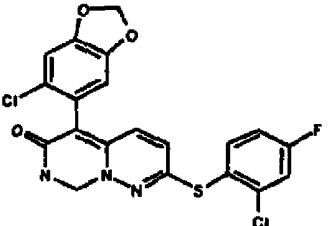
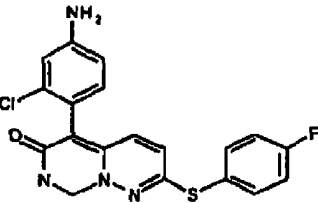
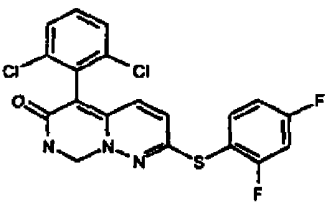
- 5 Tilsetningen av en annen R<sup>5</sup>-komponent enn hydrogen i ring-nitrogenet, oppnås ved å omsette de ovenfor viste forbindelser med formel Ic eller Id med et eller flere egnede reagensmidler. Eksempler på slike modifikasjoner vises i det følgende avsnitt "Eksempler".
- 10 Noen bestemte inhibitorer ifølge foreliggende oppfinnelse med formel Ic vises i den følgende tabell.

Tabell 2: Forbindelser med formel Ic

| forb. nr. | struktur                                                                            | forb. nr. | struktur                                                                             |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 101       |    | 110       |    |
| 102       |   | 111       |   |
| 103       |  | 112       |  |
| 104       |  | 113       |  |

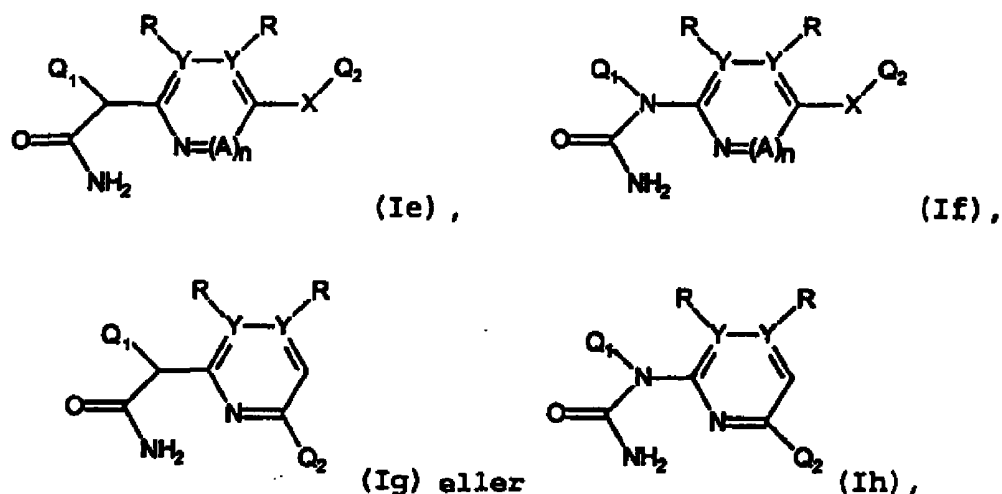
| forb.<br>nr. | struktur                                                                            | forb.<br>nr. | struktur                                                                             |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 105          |    | 114          |    |
| 106          |    | 115          |    |
| 107          |  | 116          |  |
| 108          |  | 117          |  |
| 109          |  | 118          |  |

| forb.<br>nr. | struktur                                                                            | forb.<br>nr. | struktur                                                                             |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 119          |    | 128          |    |
| 120          |    | 129          |   |
| 121          |  | 130          |  |
| 122          |  | 131          |  |
| 123          |  | 132          |  |

| forb.<br>nr. | struktur                                                                            | forb.<br>nr. | struktur                                                                             |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 124          |    | 133          |    |
| 125          |    | 134          |   |
| 126          |  | 135          |  |
| 127          |  | 136          |  |
| 137          |  | 142          |  |

| forb.<br>nr. | struktur | forb.<br>nr. | struktur |
|--------------|----------|--------------|----------|
| 138          |          | 143          |          |
| 139          |          | 144          |          |
| 140          |          | 145          |          |
| 141          |          |              |          |

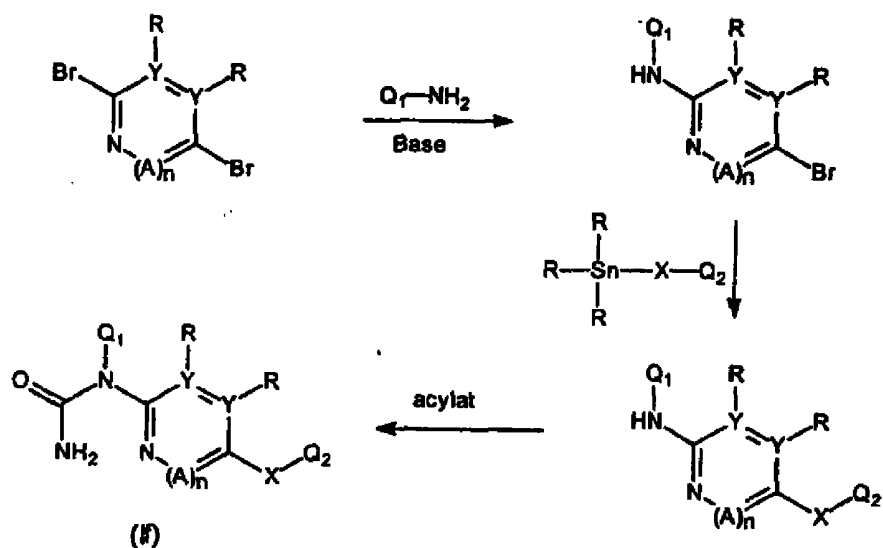
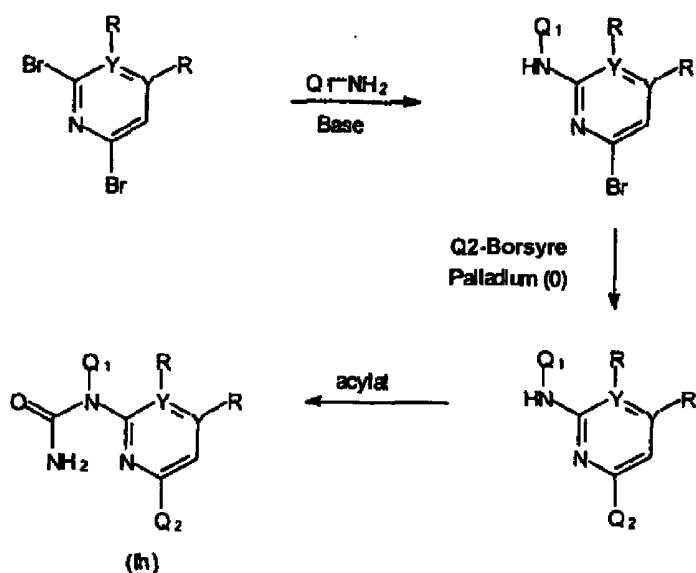
I henhold til enda en annen utførelse tilveiebringer oppfinnelsen p38-inhibitorer med formlene:



hvor A, Q<sub>1</sub>, Q<sub>2</sub>, R, X, Y og n er definert på samme måte som ble beskrevet for forbindelser med formel Ia. Disse definisjoner gjelder for alle utførelser av hver av variablene (dvs. grunnleggende, foretrukket, mer foretrukket og mest foretrukket). I forbindelsene med formel Ie er Q<sub>2</sub> mer foretrukket usubstituert fenyl.

En person med kunnskaper innen faget vil se at forbindelsene med formel Ie er direkte forløpere for visse av p38-inhibitorene med formel Ia og formel Ic ifølge foreliggende oppfinnelse. En fagperson vil også se at forbindelsene med formel Ig er forløpere for visse av p38-inhibitorene med formel Id ifølge foreliggende oppfinnelse. Følgelig avbildes syntesen av inhibitorer med formel Ie ovenfor i skjemaene 1 og 2. På lignende måte avbildes syntesen av inhibitorer med formel Ig ovenfor i skjemaene 3 og 4.

Syntesen av inhibitorer med formel If og formel Ih vises i de følgende skjemaer 7 og 8.

SKJEMA 7SKJEMA 8

Skjema 8 viser syntesen av forbindelser av typen Ih. F.eks. gir behandling av et opprinnelig dibromderivat, såsom 2,6-dibrompyridin, med et amin i nærvær av en base såsom natriumhydrid, 2-amino-6-bromderivatet. Behandling av dette mellomprodukt med en fenylboronsyreanalog (en Q2-boronsyre)

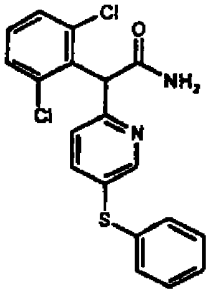
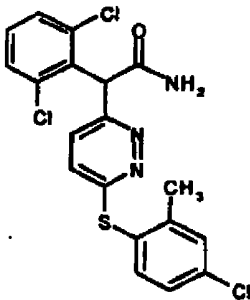
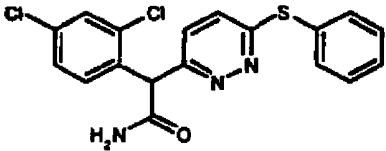
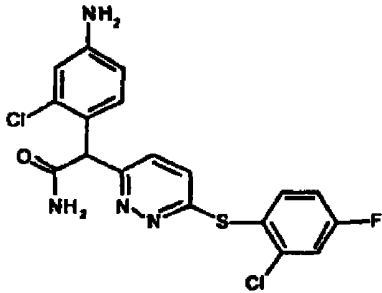
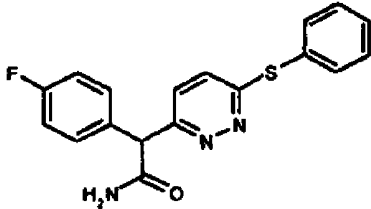
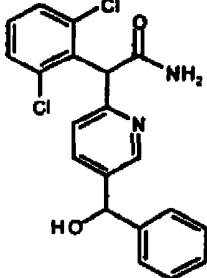
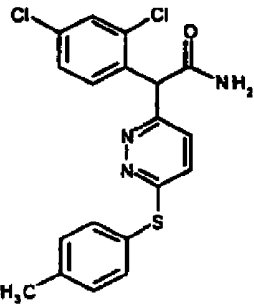
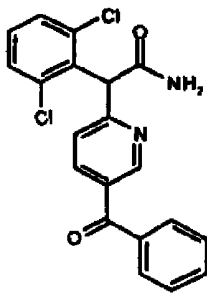
såsom fenylboronsyre, i nærvær av en palladiumkatalysator gir det disubstituerte derivat som deretter kan acyleres til sluttproduktet. Rekkefølgen av de første to trinn av denne syntese kan byttes om.

- 5 En foretrukken inhibitor med formel Ie ifølge foreliggende oppfinnelse er én hvor A betyr karbon, n betyr 1, X betyr svovel, hver Y betyr karbon, hver R betyr hydrogen, Q<sub>1</sub> betyr 2,6-diklorfenyl og Q<sub>2</sub> betyr fenyl, og denne forbindelse benevnes forbindelse 201. En foretrukken inhibitor  
10 med formel Ig ifølge foreliggende oppfinnelse er én hvor Q<sub>1</sub> betyr 2,6-diklorfenyl, Q<sub>2</sub> betyr fenyl, hver Y betyr karbon og hver R betyr hydrogen. Denne forbindelse benevnes heri forbindelse 202. Andre foretrukne forbindelser med formel Ig ifølge foreliggende oppfinnelse er de som er oppført i  
15 den følgende tabell 4.

Foretrukne forbindelser med formel Ih ifølge foreliggende oppfinnelse er de som vises i den følgende tabell 5. Andre foretrukne forbindelser med formel Ih er slike hvor Q<sub>1</sub> betyr fenyl som uavhengig er substituert i 2- og 6-posisjo-  
20 nene med klor eller fluor; hver Y betyr karbon; hver R betyr hydrogen; og Q<sub>2</sub> betyr 2-metylphenyl, 4-fluorfenyl, 2,4-difluorfenyl, 2-metylenhydroksy-4-fluorfenyl eller 2-metyl-4-fluorfenyl.

Noen bestemte inhibitorer med formel Ie, Ig og Ih er avbildet i de følgende tabeller.  
25

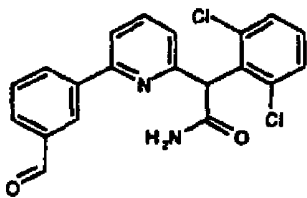
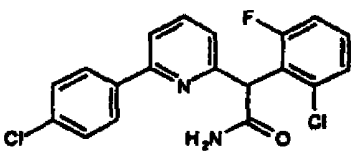
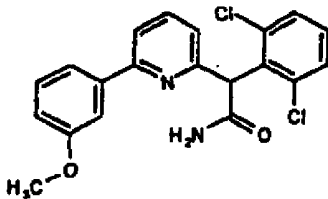
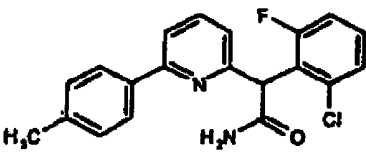
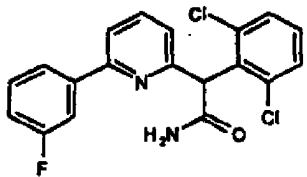
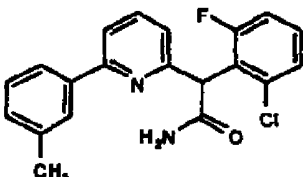
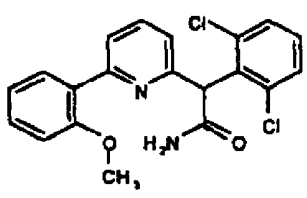
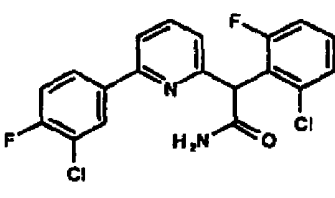
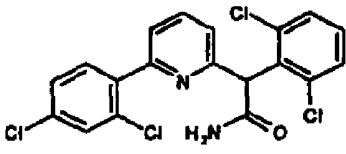
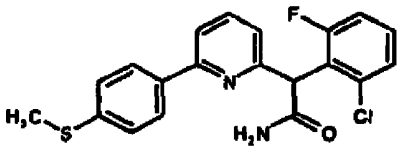
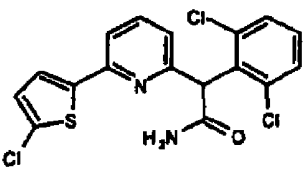
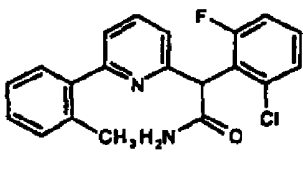
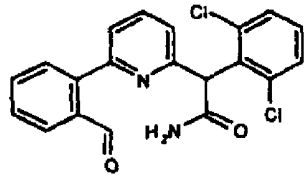
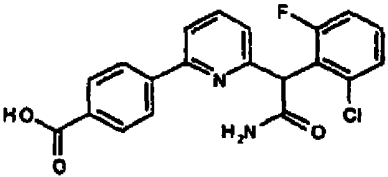
Tabell 3: Inhibitorer med formel Ie

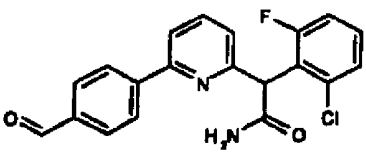
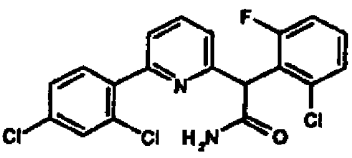
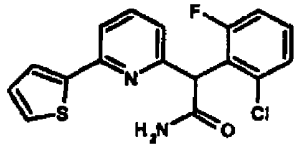
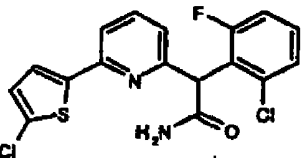
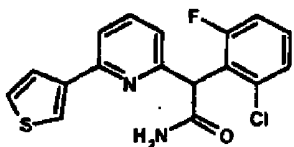
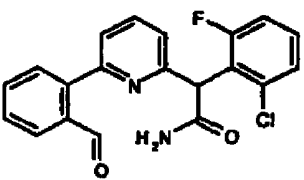
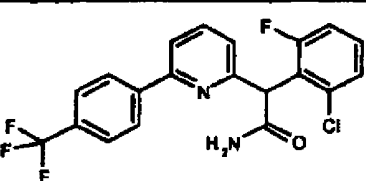
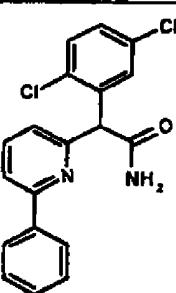
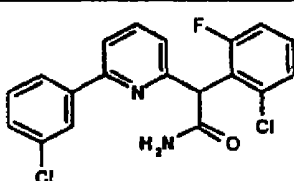
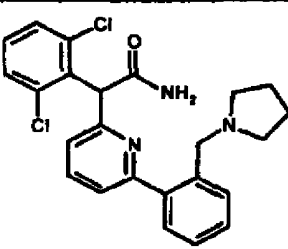
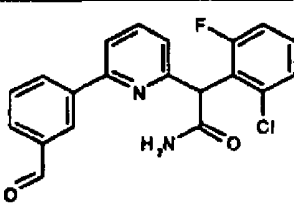
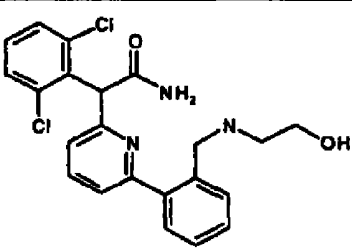
| forb. nr. | struktur                                                                            | forb. nr. | struktur                                                                             |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 201       |    | 206       |    |
| 203       |   | 207       |   |
| 204       |  | 208       |  |
| 205       |  | 209       |  |

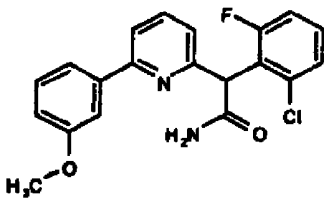
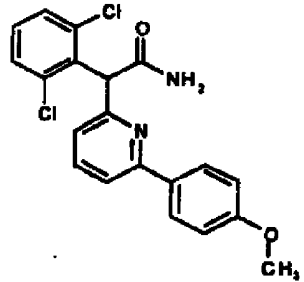
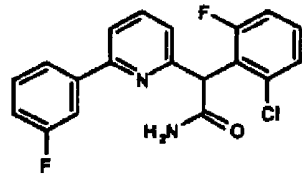
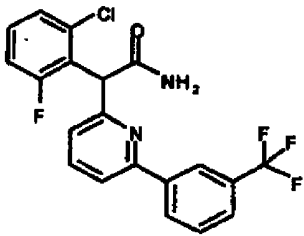
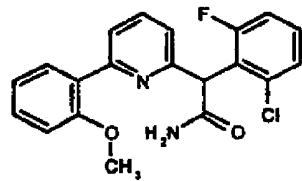
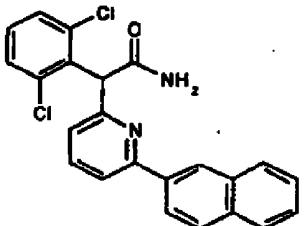
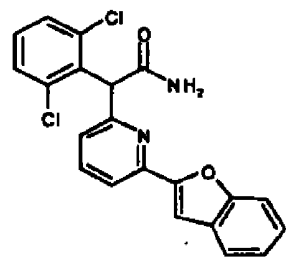
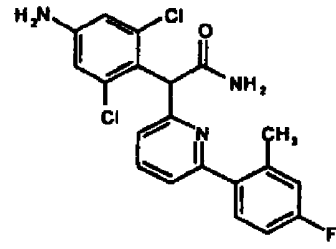
Tabell 4: Inhibitorer med formel Ig

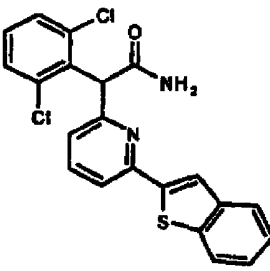
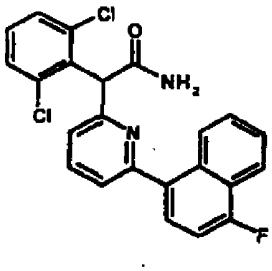
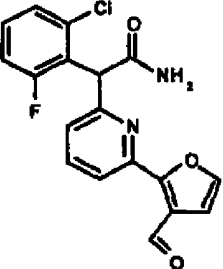
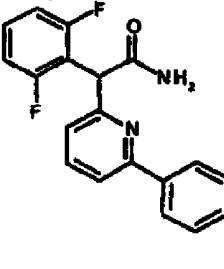
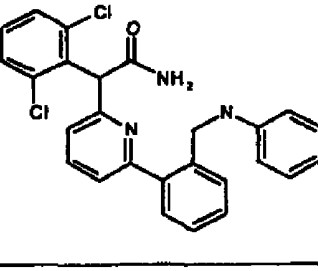
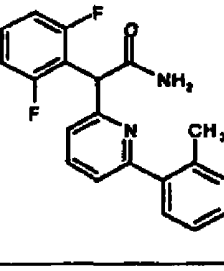
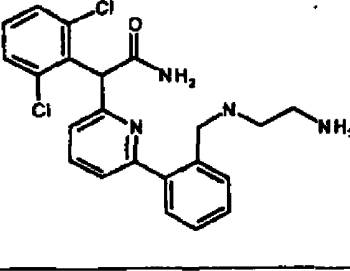
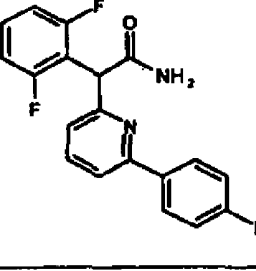
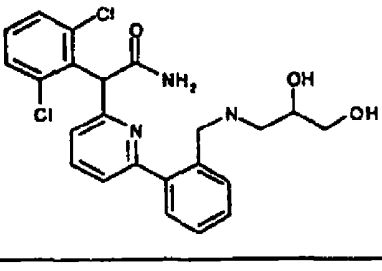
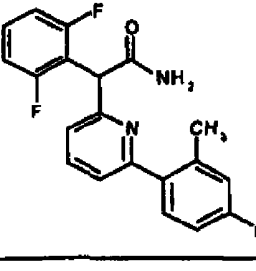
| forb. nr.   | struktur | forb. nr. | struktur |
|-------------|----------|-----------|----------|
| 202/<br>301 |          | 310       |          |
| 302         |          | 311       |          |
| 303         |          | 312       |          |
| 304         |          | 313       |          |
| 305         |          | 314       |          |

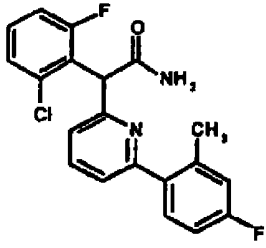
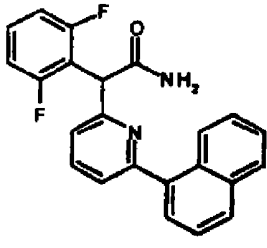
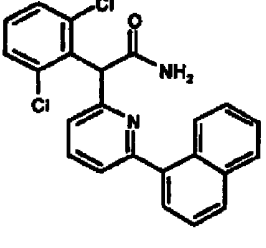
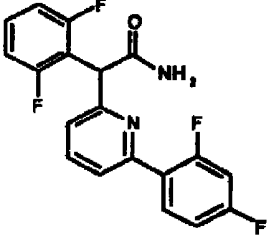
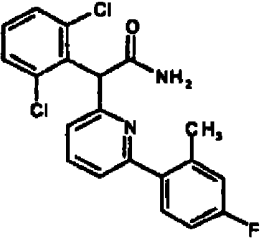
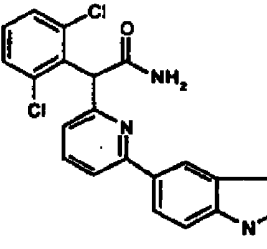
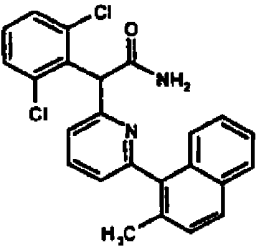
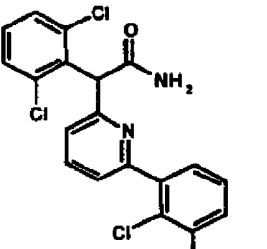
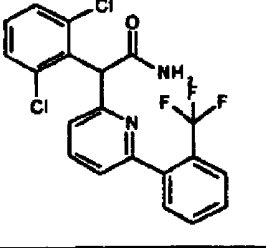
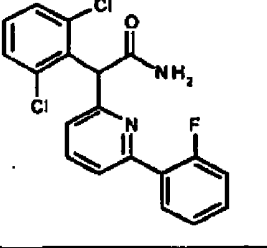
| forb.<br>nr. | struktur | forb.<br>nr. | struktur |
|--------------|----------|--------------|----------|
| 306          |          | 315          |          |
| 307          |          | 316          |          |
| 308          |          | 317          |          |
| 309          |          | 318          |          |
| 319          |          | 328          |          |
| 320          |          | 329          |          |

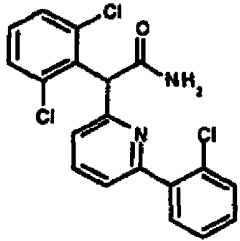
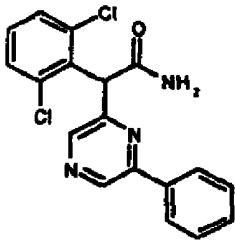
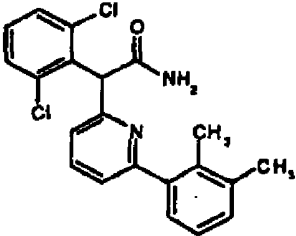
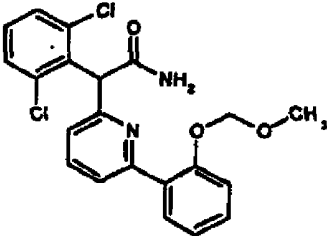
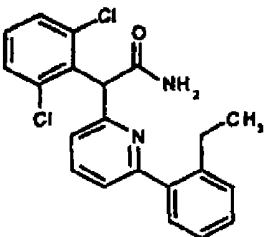
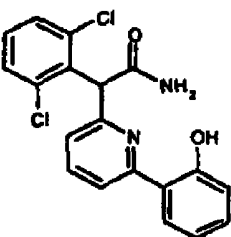
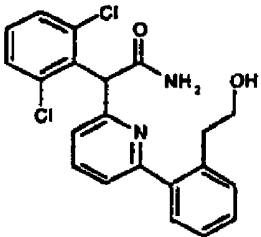
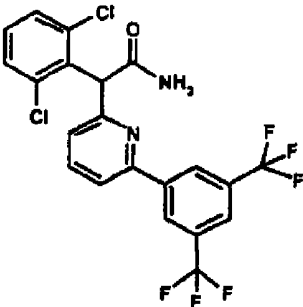
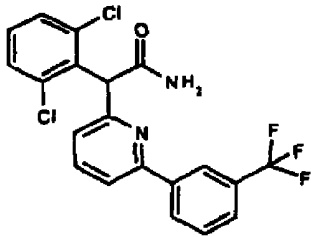
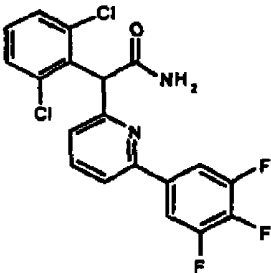
| forb.<br>nr. | struktur                                                                            | forb.<br>nr. | struktur                                                                             |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 321          |    | 330          |    |
| 322          |    | 331          |    |
| 323          |   | 332          |   |
| 324          |  | 333          |  |
| 325          |  | 334          |  |
| 326          |  | 335          |  |
| 327          |  | 336          |  |

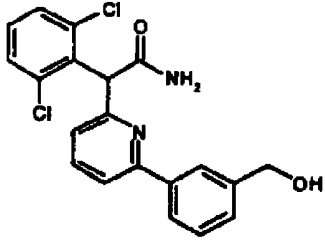
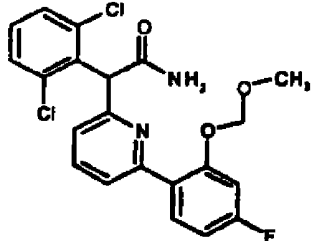
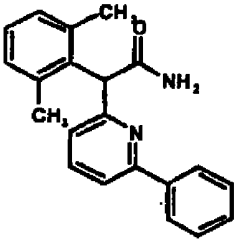
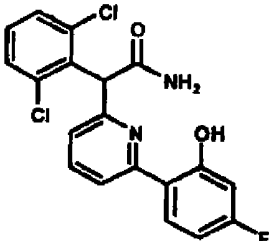
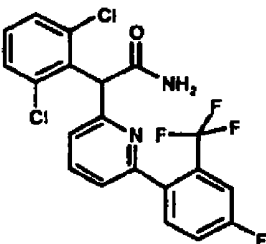
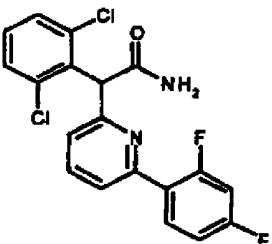
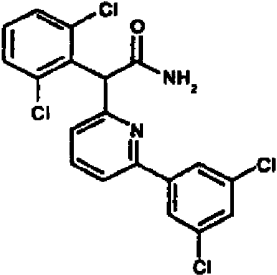
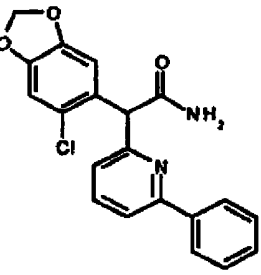
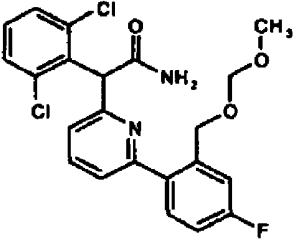
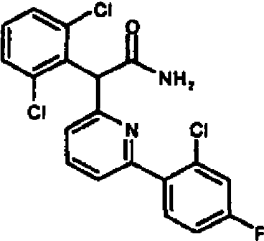
| forb.<br>nr. | struktur                                                                            | forb.<br>nr. | struktur                                                                             |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 337          |    | 346          |    |
| 338          |    | 347          |    |
| 339          |   | 348          |   |
| 340          |  | 349          |  |
| 341          |  | 350          |  |
| 342          |  | 351          |  |

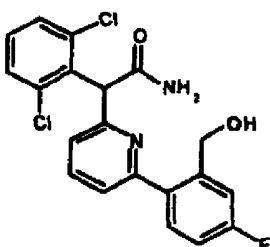
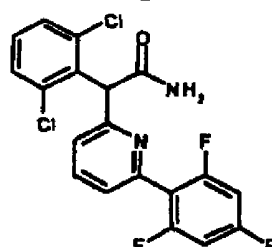
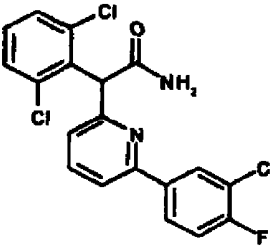
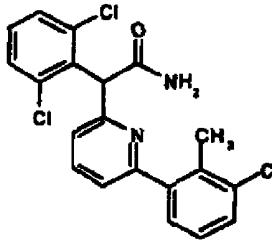
| forb.<br>nr. | struktur                                                                            | forb.<br>nr. | struktur                                                                             |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 343          |    | 352          |    |
| 344          |    | 353          |   |
| 345          |  | 354          |  |
| 355          |  | 364          |  |

| forb.<br>nr. | struktur                                                                            | forb.<br>nr. | struktur                                                                             |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 365          |    | 365          |    |
| 367          |   | 366          |   |
| 368          |  | 367          |  |
| 369          |  | 368          |  |
| 360          |  | 369          |  |

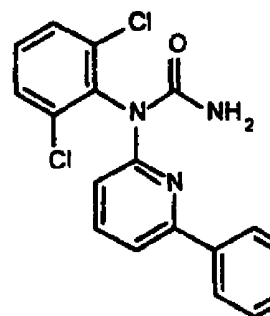
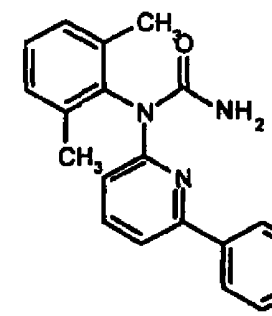
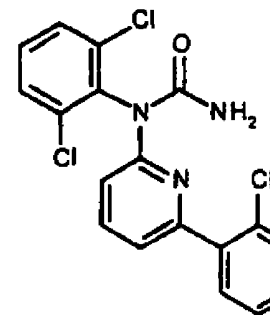
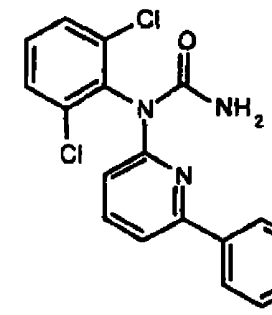
| forb.<br>nr. | struktur                                                                            | forb.<br>nr. | struktur                                                                             |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 361          |    | 370          |    |
| 362          |   | 371          |   |
| 363          |  | 372          |  |
| 373          |  | 382          |  |
| 374          |  | 383          |  |

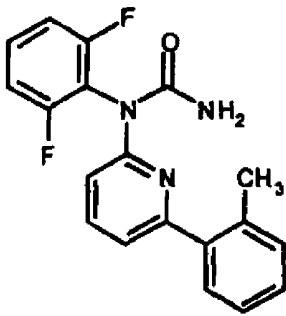
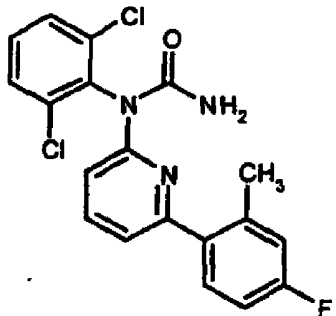
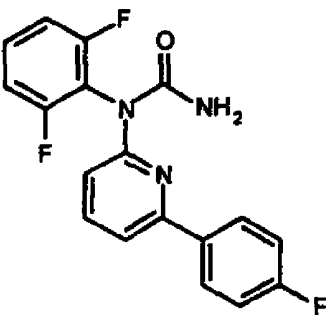
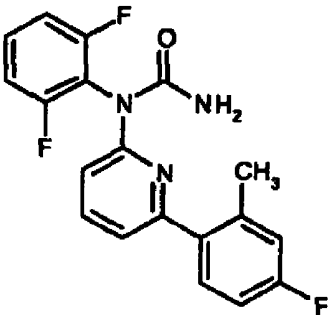
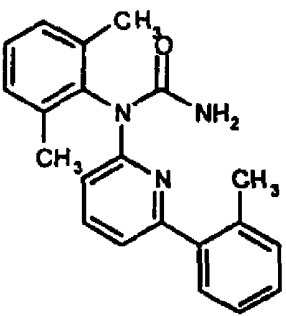
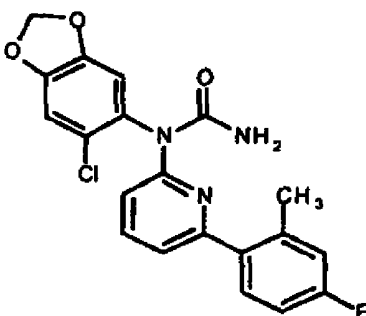
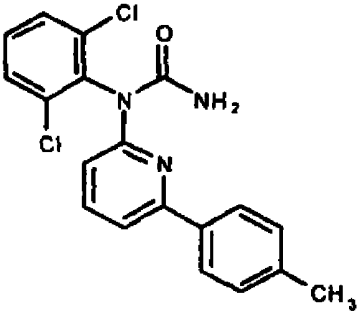
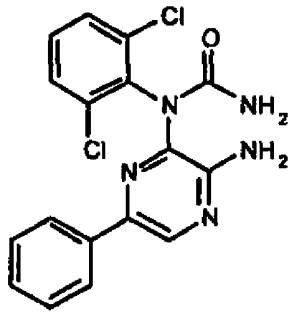
| forb.<br>nr. | struktur                                                                            | forb.<br>nr. | struktur                                                                             |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 375          |    | 384          |    |
| 376          |    | 385          |    |
| 377          |  | 386          |  |
| 378          |  | 387          |  |
| 379          |  | 388          |  |

| forb.<br>nr. | struktur                                                                            | forb.<br>nr. | struktur                                                                             |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 380          |    | 389          |    |
| 381          |   | 390          |   |
| 391          |  | 396          |  |
| 392          |  | 397          |  |
| 393          |  | 398          |  |

| forb. nr. | struktur                                                                           | forb. nr. | struktur                                                                            |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| 394       |   | 399       |   |
| 395       |  | 1301      |  |

Tabell 5: Inhibitorer med formel Ih

| forb. nr. | struktur                                                                            | forb. nr. | struktur                                                                             |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 401       |  | 407       |  |
| 402       |  | 408       |  |

| forb.<br>nr. | struktur                                                                            | forb.<br>nr. | struktur                                                                             |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 403          |    | 409          |    |
| 404          |   | 410          |   |
| 405          |  | 411          |  |
| 406          |  | 412          |  |

Aktiviteten av p38-inhibitorene ifølge foreliggende oppfinnelse kan testes *in vitro*, *in vivo* eller i en cellelinje. *In vitro*-assayer omfatter assayer som bestemmer inhiberingen av enten kinase-aktiviteten eller ATPase-aktiviteten av aktivert p38. Alternativt kvantifiserer *in vitro*-assayer evnen av inhibitoren til å binde p38, og kan måles enten ved å radiomerke inhibitoren før bindingen, isolere inhibitor/p38-komplekset og bestemme mengden radio-merking som er bundet, eller ved å kjøre et kompetisjons-eksperiment hvor nye inhibitorer inkuberes med p38 som er bundet til kjente radioligander.

Cellekulturassayer av den inhibitoriske virkning av forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse kan bestemme mengden TNF, IL-1, IL-6 eller IL-8 som dannes i fullblod eller cellefraksjoner derav i celler som er blitt behandlet med inhibitor, sammenlignet med celler som er blitt behandlet med negativkontroller. Mengden av disse cytokiner kan bestemmes ved bruk av handelstilgjengelige ELISA'er.

Et *in vivo*-assay som er nyttig for å bestemme den inhibitoriske aktivitet av p38-inhibitorene ifølge foreliggende oppfinnelse, er suppresjonen av bakpoteødemer i rotter med *Mycobacterium butyricum*-indusert adjuvansartritt. Dette beskrives i J.C. Boehm et al., J. Med. Chem., 39, s. 3929-3937 (1996), hvis innhold innlemmes heri ifølge henvisning. p38-inhibitorene ifølge foreliggende oppfinnelse kan også testes i dyremodeller av artritt, benresorpsjon, endotoksinsjokk og immunfunksjon, slik det beskrives i A.M. Badger et al., J. Pharmacol. Experimental Therapeutics, 279, s. 1453-1461 (1996), hvis innhold innlemmes heri ifølge henvisning.

p38-inhibitorene eller farmasøytiske salter derav kan formuleres i farmasøytiske sammensetninger for administrasjon til dyr eller mennesker. Disse farmasøytiske sammensetninger, som omfatter en mengde av p38-inhibitor som er virksom

for behandling eller forebygging av en p38-mediert tilstand, og en farmasøytisk akseptabel bærer, er en annen utførelse av foreliggende oppfinnelse.

Begrepet "p38-mediert tilstand", slik det brukes her, betyr  
 5 hvilken som helst sykdom eller annen svekkende tilstand  
 hvor p38 er kjent for å spille en rolle. Dette omfatter  
 tilstander som er kjent for å forårsakes av en IL-1-, TNF-,  
 IL-6- eller IL-8-overproduksjon. Slike tilstander omfatter,  
 uten begrensning, inflammatoriske sykdommer, autoimmune  
 10 sykdommer, destruktive benforstyrrelser, proliferative for-  
 styrrelser, infeksjonssykdommer, neurodegenerative sykdom-  
 mer, allergier, reperfusjon/iskemi ved slag, hjerteanfall,  
 angiogene forstyrrelser, organhypoksi, vaskulær hyperplasi,  
 hjertehypertrofi, trombin-indusert blodplateaggregasjon og  
 15 tilstander forbundet med prostaglandin endoperoksidase syn-  
 tase-2.

Inflammatoriske sykdommer som kan behandles eller forebyg-  
 ges, omfatter, men er ikke begrenset til, akutt pankrea-  
 titt, kronisk pankreatitt, asthma, allergier og åndenøds-  
 20 syndrom hos voksne. Autoimmune sykdommer som kan behandles  
 eller forebygges, omfatter, men er ikke begrenset til, glo-  
 meruloneftritt, rheumatoid artritt, systemisk lupus erythe-  
 matose, skleroderma, kronisk thyroiditt, Graves' sykdom,  
 autoimmun gastritt, diabetes, autoimmun hemolytisk anemi,  
 25 autoimmun neutropeni, trombocytopenia, atopisk dermatitt,  
 kronisk aktiv hepatitt, myasthenia gravis, multippel skle-  
 rose, inflammatorisk tarmsykdom, ulcerativ kolitt, Crohn's  
 sykdom, psoriasis eller "graft-vs.-host-disease".

Destruktive benforstyrrelser som kan behandles eller fore-  
 30 bygges, omfatter, men er ikke begrenset til, osteoporose,  
 osteoartritt og multippel myeloma-relatert benforstyrrelse.

Proliferative sykdommer som kan behandles eller forebygges,  
 omfatter, men er ikke begrenset til, akutt myelogen leu-

kemi, kronisk myelogen leukemi, metastatisk melanom, Kaposi's sarkoma og multippel myeloma.

Angiogene forstyrrelser som kan behandles eller forebygges, omfatter faste svulster, okulær neovaskularisering, heman-  
5 giomaer i barn.

Infeksjonssykdommer som kan behandles eller forebygges, omfatter, men er ikke begrenset til, sepsis, septisk sjokk og Shigellose.

Virale sykdommer som kan behandles eller forebygges,  
10 omfatter, men er ikke begrenset til, akutt hepatittin-  
feksjon (omfattende hepatitt A, hepatitt B og hepatitt C),  
HIV-infeksjon og CMV-retinitt.

Neurodegenerative sykdommer som kan behandles eller fore-  
bygges med forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse,  
15 omfatter, men er ikke begrenset til, Alzheimers sykdom,  
Parkinsons sykdom, cerebral iskemi eller neurodegenerative  
sykdommer forårsaket av traumatisk skade.

"p38-medierte tilstander" omfatter også iskemi/reperfusjon  
i slag, hjerteanfall, myokardial iskemi, organhypoksia,  
20 vaskulær hyperplasia, hjertehypertrofi og trombinindusert  
blodplateaggregasjon.

I tillegg har p38-inhibitorene ifølge foreliggende oppfin-  
nelse også evnen til å inhibere ekspresjonen av induserbare  
pro-inflammatoriske proteiner såsom prostaglandin endo-  
25 peroksidase syntase-2 (PGHS-2), også benevnt cyklooksyge-  
nase-2 (COX-2). Derfor er andre "p38-medierte tilstander"  
ødem, analgesia, feber og smerter, såsom neuromuskulær  
smerte, hodepine, kreftsmerte, tannpine og artrittsmerter.

Sykdommene som kan behandles eller forebygges med p38-in-  
30 hibitorene ifølge foreliggende oppfinnelse, kan også med

fordel grupperes i henhold til cytokinet (IL-1, TNF, IL-6, IL-8) som man tror at er ansvarlig for sykdommen.

Slik omfatter en IL-1-mediert sykdom eller tilstand reumatoid artritt, osteoartritt, slag, endotoksemia og/eller toksisk sjokksyndrom, inflammatorisk reaksjon induisert av endotoksin, inflammatorisk tarmsykdom, tuberkulose, aterosklerose, muskeldegenerasjon, kakeksi, psoriatisk artritt, Reiter's syndrom, gikt, traumatisk artritt, rubellaartritt, akutt synovitt, diabetes, pankreatisk  $\beta$ -celle-sykdom og Alzheimers sykdom.

TNF-mediert sykdom eller tilstand omfatter reumatoid artritt, reumatoid spondylitt, osteoartritt, giktartritt og andre artrittiske tilstander, sepsis, septisk sjokk, endotoksisk sjokk, gramnegativ sepsis, toksisk sjokksyndrom, åndenødssyndrom hos voksne, cerebral malaria, kronisk pulmonær inflammatorisk sykdom, silikose, pulmonær sarkoidose, benresorpsjonssykdommer, reperfusjonsskade, "graft-vs.-host-reaction", transplantatutstøtninger, feber og myalgier som skyldes infeksjon, kakeksi etter infeksjon, AIDS, ARC eller ondartethet, keloiddannelse, arrvevdannelse, Crohns sykdom, ulcerativ kolitt eller pyrese. TNF-medierte sykdommer omfatter også virale infeksjoner såsom HIV, CMV, influensa og herpes; og veterinærmedisinske virale infeksjoner såsom lentivirusinfeksjoner, omfattende, men ikke begrenset til, ekvint smittelig anemivirus, kaprint artrittvirus, visnavirus eller mædivirus; eller retrovirusinfeksjoner, omfattende felint immunsviktvirus, bovint immunsviktvirus eller canint immunsviktvirus.

IL-8-mediert sykdom eller tilstand omfatter sykdommer som kjennetegnes ved massiv neutrofil infiltrasjon, såsom psoriasis, inflammatorisk tarmsykdom, asthma, hjerte- og renal reperfusjonsskade, åndenødssyndrom hos voksne, trombose og glomerulonefritt.

I tillegg kan forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse brukes topisk for å behandle eller forebygge tilstander som forårsakes eller forverres av IL-1 eller TNF. Slike tilstander omfatter betente ledd, eksem, psoriasis, in-  
 5 flammatoriske hudtilstander såsom solbrann, inflammatoriske øyetilstander såsom konjunktivitt, pyrese, smerter og andre tilstander forbundet med betennelse.

I tillegg til forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse, kan farmasøytisk akseptable salter av forbindelsene  
 10 ifølge oppfinnelsen også brukes i sammensetninger for å behandle eller forebygge de ovennevnte forstyrrelser.

Farmasøytisk akseptable salter av forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter dem som avledes fra farmasøytisk akseptable uorganiske og organiske syrer og  
 15 baser. Eksempler på egnede syresalter omfatter acetat, adipat, alginat, aspartat, benzoat, benzensulfonat, bisulfat, butyrat, citrat, kamferat, kamfersulfonat, cyklopentanpropionat, diglukonat, dodekylsulfat, etansulfonat, format, fumarat, glukohexanoat, glycerofosfat, glykolat, hemi-  
 20 sulfat, heptanoat, heksanoat, hydroklorid, hydrobromid, hydrojodid, 2-hydroksyetansulfonat, laktat, maleat, malonat, metansulfonat, 2-naftalensulfonat, nikotinat, nitrat, oksalat, palmoat, pektinat, persulfat, 3-fenylpropionat, fosfat, pikrat, pivalat, propionat, salicylat, suksinat,  
 25 sulfat, tartrat, tiocyanat, tosylat og undekanoat. Andre syrer, såsom oksalsyre, kan, selv om de i og for seg ikke er farmasøytisk akseptable, brukes ved fremstilling av salter som er nyttige som mellomprodukter ved dannelsen av forbindelsene ifølge oppfinnelsen og deres farmasøytisk akseptable syreaddisjonssalter. Salter avledet fra egnede baser  
 30 omfatter alkalimetallsalter (f.eks. natrium- og kalium-), alkalijordmetallsalter (f.eks. magnesium-), ammonium- og N-(C<sub>1-4</sub>-alkyl)<sup>4+</sup>-salter. Oppfinnelsen tilveiebringer også kvaternisering av eventuelle basiske nitrogen-holdige grupper  
 35 i forbindelsene som beskrives heri. Vann- eller olje-løse-

lige eller dispergerbare produkter kan erholdes ved en slik kvaternisering.

Farmasøytisk akseptable bærere som kan brukes i disse farmasøytiske sammensetninger, omfatter, men er ikke begrenset  
5 til, ionutbyttere, alumina, aluminiumstearat, lecitin, serumproteiner såsom humant serumalbumin, buffersubstanser såsom fosfater, glycin, sorbinsyre, kaliumsorbat, partsielle glyceridblandinger av mettede vegetabiliske fettsyrer, vann, salter eller elektrolytter, såsom protaminsulfat,  
10 dinatriumhydrogenfosfat, kaliumhydrogenfosfat, natriumklorid, sinksalter, kolloidalt silika, magnesiumtrisilikat, polyvinylpyrrolidon, cellulosebaserte substanser, polyetylenglykol, natriumkarboksymetylcellulose, polyakrylater, vokser, polyetylen/polyoksypropylen-blokkpolymerer, polyetylenglykol og ullfett.  
15

Sammensetningene ifølge foreliggende oppfinnelse kan administreres oralt, parenteralt, ved inhalasjonsspray, topisk, rektalt, nasalt, bukkalt, vaginalt eller via en implantert beholder. Begrepet "parenteralt" slik det brukes her,  
20 omfatter subkutane, intravenøse, intramuskulære, intraartikulære, intrasynoviale, intrasternale, intratekale, intrahepatiske, intralesjonale og intrakraniale injeksjons- eller infusjonsteknikker. Fortrinnsvis administreres sammensetningene oralt, intraperitonealt eller intravenøst.

25 Sterile injiserbare former av sammensetningene ifølge oppfinnelsen kan være vandige eller oljeholdige suspensjoner. Disse suspensjoner kan formuleres i henhold til teknikker som er kjent innen faget, ved bruk av egnede dispergerings- eller fuktemidler og suspensjonsmidler. Det sterile injiserbare preparat kan også være en steril injiserbar oppløsning eller suspensjon i et ikke-toksisk parenteralt akseptabelt tynningsmiddel eller løsemiddel, f.eks. i form av en  
30 oppløsning i 1,3-butandiol. Blant de akseptable vehikler og løsemidler som kan brukes, er vann, Ringers oppløsning og

- isotonisk natriumkloridoppløsning. I tillegg anvendes sterile fete oljer konvensjonelt som løsemiddel eller suspensjonsmedium. Med denne hensikt kan hvilken som helst milde fete olje brukes, også syntetiske mono- eller diglycerider.
- 5 Fettsyrer, såsom oleinsyre og dets glyceridderivater, er nyttige ved fremstilling av injiserbare væsker, liksom også naturlige farmasøytisk akseptable oljer, såsom olivenolje eller ricinusolje, spesielt i deres polyoksyetylerter versjoner. Disse oljeoppløsninger eller -suspensjoner kan også
- 10 inneholde et langkjedet alkohol-tynningsmiddel eller dispergeringsmiddel såsom karboksymetylcellulose, eller lignende dispergeringsmidler som er vanlige å bruke ved formulering av farmasøytisk akseptable doseringsformer omfattende emulsjoner og suspensjoner. Andre vanlig brukte surfaktanter, såsom "Tweens", "Spans" og andre emulgeringsmidler eller biotilgjengelighetsforsterkere som er vanlige i
- 15 bruk ved fremstilling av farmasøytisk akseptable faste, flytende eller andre doseringsformer, kan også brukes for formuleringen.
- 20 De farmasøytiske sammensetninger ifølge oppfinnelsen kan administreres oralt i hvilke som helst oralt akseptable doseringsformer, omfattende, men ikke begrenset til, kapsler, tabletter, vandige suspensjoner eller oppløsninger. I tilfellet av tabletter for oral bruk, omfatter bærere som
- 25 er vanlige å bruke, laktose og maisstivelse. Smøremidler, såsom magnesiumstearat, settes vanligvis også til. For oral administrasjon i kapselform omfatter nyttige tynningsmidler laktose og tørket maisstivelse. Når vandige suspensjoner er ønsket for oral bruk, kombineres den aktive ingrediens med
- 30 emulgerings- og suspensjonsmidler. Om ønsket kan visse søtstoffer, smakstoffer eller fargestoffer også settes til.

Alternativt kan de farmasøytiske sammensetninger ifølge foreliggende oppfinnelse administreres i form av suppositorier for rektal administrasjon. Disse kan fremstilles ved å

35 blande midlet med en egnet ikke-irriterende eksipiens som

er fast ved romtemperatur men flytende ved rektal temperatur, og derfor vil smelte i rektum for å frigi legemidlet. Slike materialer omfatter kakaosmør, bivoks og polyetylen-glykoler.

- 5 De farmasøytiske sammensetninger ifølge foreliggende oppfinnelse kan også administreres topisk, spesielt når målet for behandlingen omfatter områder eller organer som er lett tilgjengelige ved topisk påføring, omfattende sykdommer i øyet, på huden eller den lavere tarmtrakt. Egnede topiske  
10 formuleringer kan lett fremstilles for hvert av disse områder eller organer.

Topisk påføring for den lavere tarmtrakt kan utføres i en rektal suppositorieformulering (jfr. ovenfor) eller i en egnet klysterlavementformulering. Topisk/transdermale plas-  
15 tere kan også brukes.

For topisk påføring kan de farmasøytiske sammensetninger formuleres i en egnet salve som inneholder den aktive komponent suspendert eller løst opp i én eller flere bærere. Bærere for topisk administrasjon av forbindelsene ifølge  
20 foreliggende oppfinnelse omfatter, men er ikke begrenset til, mineralolje, flytende petrolatum, hvit petrolatum, propylenglykol, polyoksyetylen, polyoksypropylenforbindelse, emulgeringsvoks og vann. Alternativt kan de farmasøytiske sammensetninger formuleres i en egnet losjon eller  
25 krem som inneholder de aktive komponenter suspendert eller løst opp i én eller flere farmasøytisk akseptable bærere. Egnede bærere omfatter, men er ikke begrenset til, mineralolje, sorbitanmonostearat, polysorbat 60, cetylestervoks, cetearylalkohol, 2-oktyldodekanol, benzylalkohol og vann.

- 30 For oftalmisk bruk kan de farmasøytiske sammensetninger formuleres som mikroniserte suspensjoner i isotonisk pH-justert sterilt saltvann eller fortrinnsvis i form av oppløsninger i isotonisk, pH-justert sterilt saltvann, enten

med eller uten et konserveringsmiddel såsom benzylalkoniumklorid. Alternativt, for oftalmisk bruk, kan de farmasøytiske sammensetninger formuleres i en salve såsom petrolatum.

- 5 De farmasøytiske sammensetninger ifølge oppfinnelsen kan også administreres ved nasal aerosol eller inhalasjon. Slike sammensetninger fremstilles ved teknikker som er velkjent innen faget farmasøytisk formulering, og kan fremstilles som oppløsninger i saltvann, ved bruk av benzyl-
- 10 alkohol eller andre egnede konserveringsmidler, absorpsjonspromotere for å forsterke biotilgjengeligheten, fluorkarboner og/eller andre konvensjonelle solubiliserende eller dispergerende midler.

- Mengden av p38-inhibitor som kan kombineres med bærerematerialene for å gi en enkelt doseringsform, vil variere
- 15 avhengig av verten som skal behandles, den bestemte administrasjonsmodus. Fortrinnsvis bør sammensetningene formuleres slik at en dosering av 0,01-100 mg/kg kroppsvekt/dag av inhibatoren kan administreres til en pasient som mottar
- 20 disse sammensetninger.

- Det bør også forstås at en bestemt dosering og behandlingsskur for en bestemt pasient vil være avhengig av forskjellige faktorer, bl.a. aktiviteten av den bestemte forbindelse som brukes, alderen, kroppsvekten, den
- 25 generelle helsetilstand, kjønn, kostholdet, administrasjonstidspunktet, utsondringshastigheten, legemiddelkombinasjonen og vurderingen av den behandlende lege, og alvoret av den bestemte sykdom som skal behandles. Mengden av inhibitor vil også avhenge av den bestemte forbindelse i
- 30 sammensetningen.

I henhold til en annen utførelse brukes inhibatorene ifølge foreliggende oppfinnelse til å behandle eller forebygge en

IL-1-, IL-6-, IL-8- eller TNF-mediert sykdom eller tilstand. Slike tilstander ble beskrevet ovenfor.

Avhengig av den bestemte p38-medierte tilstand som skal behandles eller forebygges, kan ytterligere legemidler som normalt administreres for å behandle eller forebygge denne tilstand, administreres sammen med inhibitorene ifølge foreliggende oppfinnelse. F.eks. kan kjemoterapeutiske midler eller andre antiproliferative midler kombineres med p38-inhibitorene ifølge foreliggende oppfinnelse for å behandle proliferative sykdommer.

Disse ytterligere midler kan administreres adskilt, i form av en flerdoseringskur, fra den p38-inhibitor-holdige sammensetning. Alternativt kan disse stoffer være en del av en enkeltdoseringsform, blandet sammen med p38-inhibitoren i en enkelt sammensetning.

For at oppfinnelsen som beskrives her, skal kunne forstås bedre, bringes de følgende eksempler. Det bør forstås at disse eksempler kun har illustrerende hensikt, og ikke skal anses å begrense oppfinnelsen på noen måte.

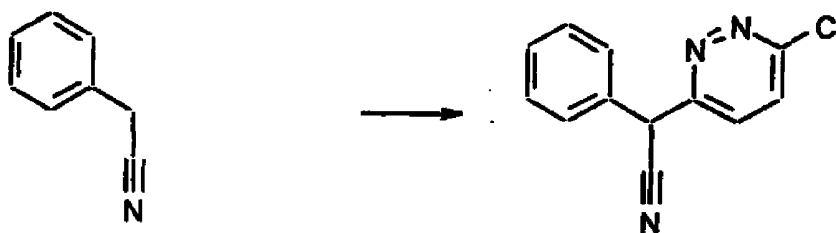
20

#### EKSEMPEL 1

##### Syntese av p38-inhibitorforbindelse 1

Eksempler på syntesen av flere forbindelser med formel Ia vises i de følgende 4 eksempler.

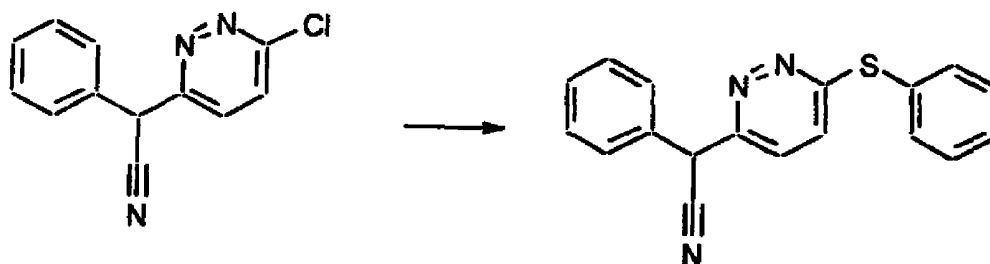
A.



Til en oppslemming av natriumamid, 90% (1,17 g; 30 mmol) i tørt tetrahydrofuran (20 ml), satte vi en oppløsning av benzylnitril (2,92 g; 25,0 mmol) i tørt tetrahydrofuran (10 ml) ved romtemperatur. Blandingen ble omrørt ved romtemperatur i 30 minutter. Til reaksjonsblandingen satte vi en oppløsning av 3,6-diklorpyridazin (3,70 g; 25,0 mmol) i tørt tetrahydrofuran (10 ml). Etter omrøring i 30 minutter ble reaksjonsblandingen fortynnet med en vandig mettet natriumbikarbonatoppløsning. Reaksjonsblandingen ble deretter ekstrahert med etylacetat. Sjiktene ble separert, og det organiske sjikt ble vasket med vann og saltvann, tørket over magnesiumsulfat, filtrert og inndampet under vakuum.

Residuet ble renset ved kromatografi på kiselgel (elueringsmiddel: 30% etylacetat i n-heksan) for å gi 3,71 g (16,20 mmol; ca. 54%) produkt i form av et hvitt fast stoff.

B.

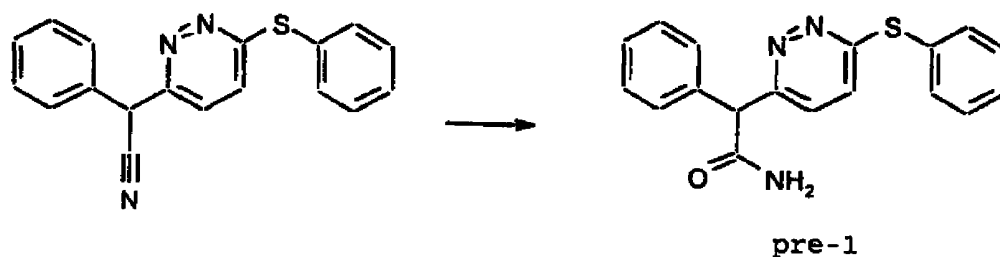


Til en oppslemming av natriumhydrid, 95% (0,14 g; 6,0 mmol) i tørt tetrahydrofuran (10 ml), satte vi tiofenol (0,66 g; 6,0 mmol) ved romtemperatur. Reaksjonsblandingen ble deretter omrørt i 10 minutter. Til reaksjonsblandingen satte vi en oppløsning av produktet fra trinn A ovenfor (1,31 g; 5,72 mmol) i avslutt etanol (20 ml). Reaksjonsblandingen ble deretter oppvarmet til tilbakeløpstemperaturen og omrørt ved denne i én time. Den avkjølte reaksjonsblanding ble inndampet under vakuum. Residuet ble fortynnet med en 1N natriumhydroksidoppløsning (10 ml) og deretter ekstrahert

med metylenklorid. Den organiske fase ble vasket med vann og saltvann, tørket over magnesiumsulfat og inndampet under vakuum.

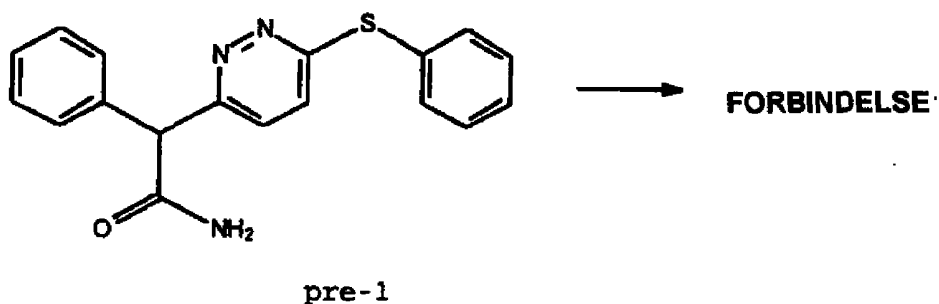
Residuet ble renset ved kromatografi på kiselgel (elueringsmiddel: 20% etylacetat i n-heksan) for å gi 0,66 g (2,19 mmol; ca. 40%) produkt i form av et hvitt fast stoff.

C.



En blanding av produktet fra trinn B (0,17 g; 0,69 mmol) og konsentrert svovelsyre (5 ml) ble oppvarmet til 100°C i én time. Oppløsningen ble avkjølt og justert til pH 8 med en mettet natriumbikarbonatoppløsning. Reaksjonsblandingen ble ekstrahert med metylenklorid. Det organiske sjikt ble vasket med vann og saltvann, tørket over magnesiumsulfat og inndampet under vakuum for å gi 0,22 g (0,69 mmol; ca. 100%) av forbindelsen pre-1 i form av en orange olje. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7,7 (d), 7,5 (d), 7,4 (m), 7,3-7,2 (m).

D.



En oppløsning av pre-1 fra trinn C (0,22 g; 0,69 mmol) og N,N-dimetylformamiddimetylacetal (0,18 g; 1,5 mmol) i toluen (5 ml) ble oppvarmet til 100°C i én time. Etter avkjøling ble det dannede faste stoff filtrert og løst opp i varm etylacetat. Produktet ble felt ved en dråpevis tilsetning av dietyleter. Produktet ble deretter filtrert og vasket med dietyleter for å gi 0,038 g av forbindelse 1 (som er avbildet i tabell 1) i form av et gult fast stoff.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,63 (s), 7,63-7,21 (m), 6,44 (d).

#### EKSEMPEL 2

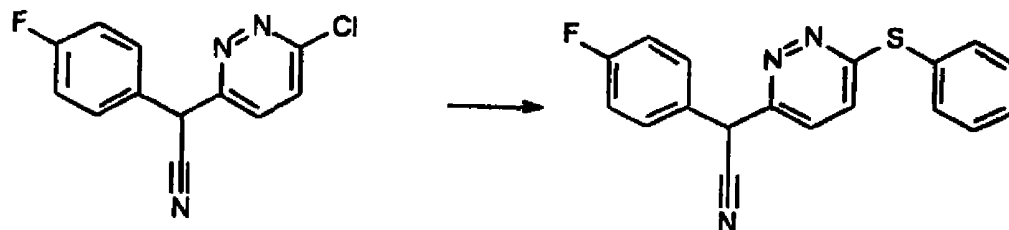
##### Syntese av p38-inhibitorforbindelse 2

A.



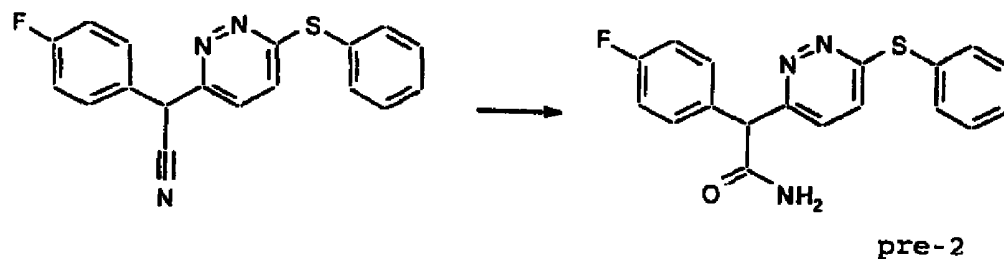
Det første mellomprodukt, som avbildes ovenfor, ble fremstilt på lignende måte som beskrevet i eksempel 1A, ved bruk av 4-fluorfenylacetonitril, for å gi 1,4 g (5,7 mmol; ca. 15%) produkt.

B.



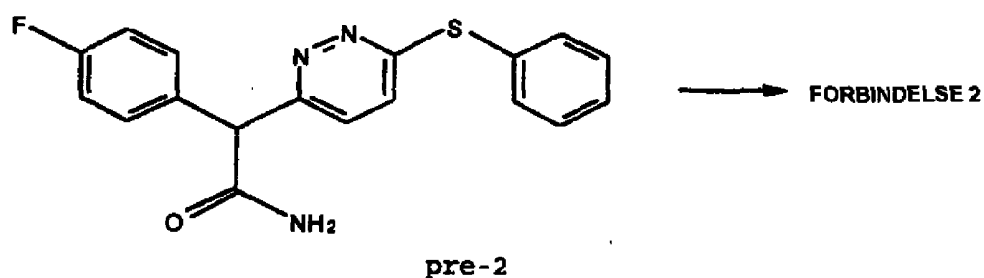
Det ovenfor avbildede mellomprodukt ble fremstilt på lignende måte som beskrevet i eksempel 1B. Dette gav 0,49 g (1,5 mmol; 56%) produkt.

C.



Det ovenfor viste mellomprodukt ble fremstilt på lignende måte som beskrevet i eksempel 1C. Dette gav 0,10 g (0,29 mmol; 45%) av forbindelsen pre-2.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) d 7,65-7,48 (m), 7,47-7,30 (m), 7,29-7,11 (m), 7,06-6,91 (m), 5,85 (s, br).

D.

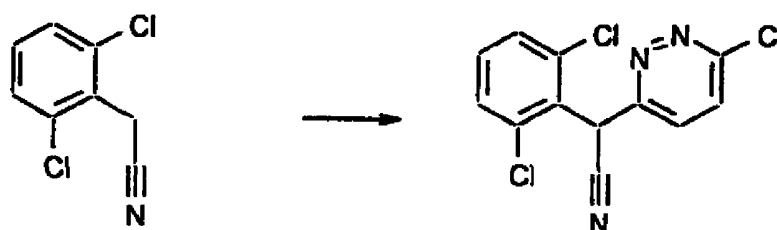


Forbindelse 2 (som er avbildet i tabell 1) ble fremstilt fra pre-2 på lignende måte som beskrevet i eksempel 1D. Dette gav 0,066 g produkt.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) d 8,60 (s), 7,62-7,03 (m), 6,44 (d).

### EKSEMPEL 3

#### Syntese av p38-inhibitorforbindelse 6

A.



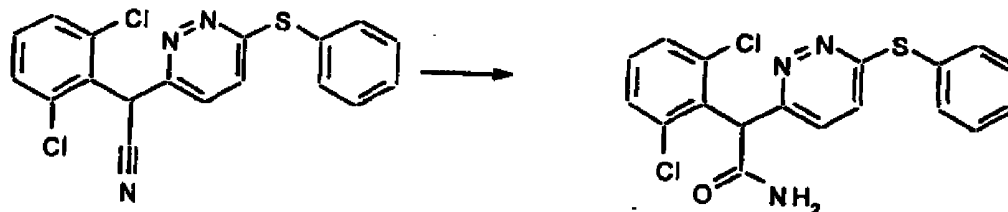
Det første mellomprodukt ved fremstilling av forbindelse 6 ble fremstilt på lignende måte som hva som ble beskrevet i eksempel 1A, ved bruk av 2,6-diklorfenylacetonitril, for å gi 2,49 g (8,38; 28%) produkt.

5 B.



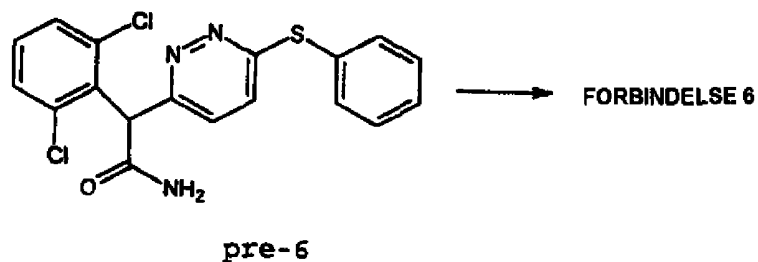
Det følgende trinn ved syntesen av forbindelse 6 ble utført på lignende måte som hva som ble beskrevet i eksempel 1B. Dette gav 2,82 g (7,6 mmol; 91%) produkt.

C.



- 10 Det endelige mellomprodukt, pre-6, ble fremstilt på lignende måte som beskrevet i eksempel 1C. Dette gav 0,89 g (2,3 mmol; 85%) produkt.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7,5-7,4 (dd), 7,4 (m), 7,3 (d), 7,2 (m), 7,05 (d).

D.

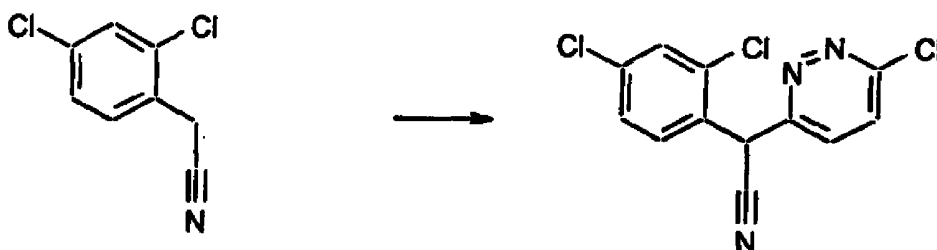


Det endelige trinn i syntesen av forbindelse 6 (som er  
 avbildet i tabell 1) ble utført slik det ble beskrevet i  
 eksempel 1D. Dette gav 0,06 g produkt.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  
 $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,69 (s), 7,65-7,59 (d), 7,58-7,36 (m), 7,32-7,22  
 5 (m), 6,79 (d), 6,53 (d).

#### EKSEMPEL 4

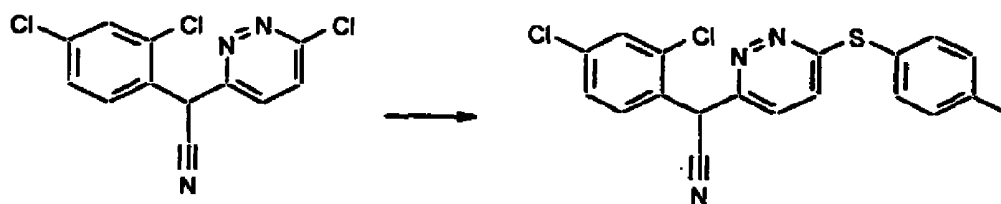
##### Fremstilling av p38-inhibitorforbindelse 5

A.

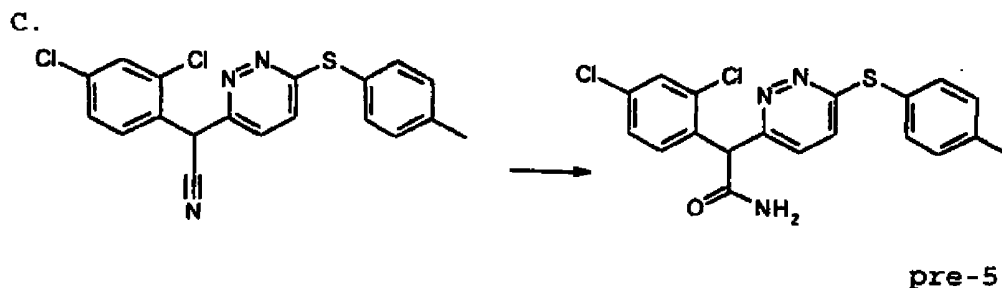


Det første mellomprodukt i syntesen av forbindelse 5 ble  
 10 fremstilt på lignende måte som beskrevet i eksempel 1A, ved  
 bruk av 2,4-diklorfenylacetonitril, for å gi 3,67 g (12,36  
 mmol; 49%) produkt.

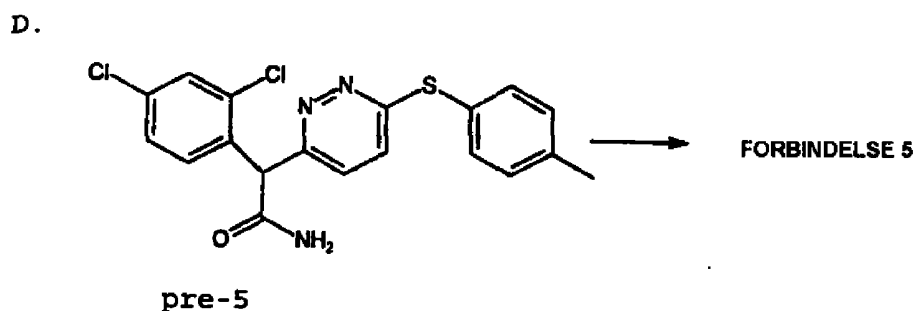
B.



Det andre mellomprodukt ble fremstilt på lignende måte som  
 15 beskrevet i eksempel 1B. Dette gav 3,82 g (9,92 mmol; 92%)  
 produkt.

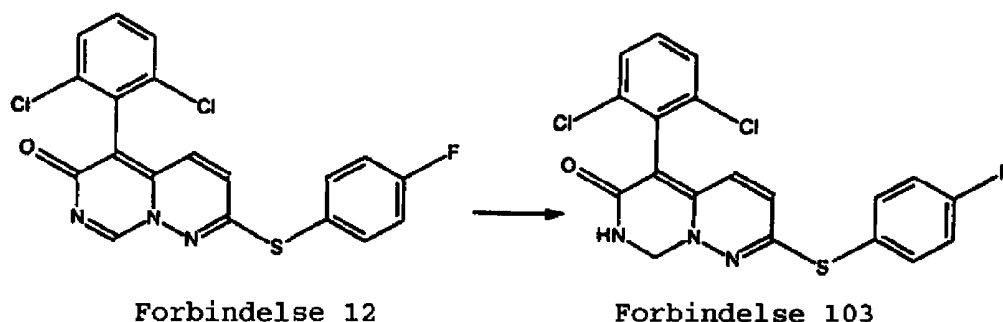


Det endelige mellomprodukt, pre-5, ble fremstilt på lignende måte som hva som ble beskrevet i eksempel 1C. Dette gav 0,10 g (0,24 mmol; 92%) produkt.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7,9 (d), 7,7 (d), 7,6-7,5 (dd), 7,4-7,3 (m), 2,4 (s).



Det endelige trinn ved fremstilling av forbindelse 5 (som er avbildet i tabell 1) ble utført på lignende måte som beskrevet i eksempel 1D. Dette gav 0,06 g produkt.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,64 (s), 7,51-7,42 (m), 7,32-7,21 (m), 6,85 (d), 6,51 (d), 2,42 (s).

Andre forbindelser med formel Ia ifølge foreliggende oppfinnelse kan fremstilles på lignende måte, ved bruk av de egnede utgangsstoffer.

EKSEMPEL 6Syntese av p38-inhibitorforbindelse 103

5 Dette eksempel viser en typisk syntese av en forbindelse med formel Ic.

A.

p38-inhibitorforbindelse 12 fremstilles hovedsaklig slik det vises i eksempel 4, unntatt at 4-fluortiofenyl benyttes i trinn B.

10 B.

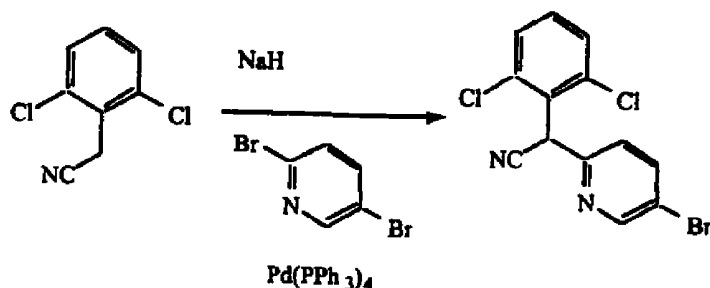
Forbindelse 12 ble løst opp i tørt THF (5 ml) ved romtemperatur. Til denne oppløsning satte vi diisobutylaluminiumhydrid (1M oppløsning i toluen, 5 ml; 5 mmol), og reaksjonsblandingen ble omrørt ved romtemperatur i 1 time.

15 Reaksjonsblandingen ble deretter fortynnet med etylacetat og inaktivert ved tilsetning av Rochelle-salt. Sjiktene ble separert, og det organiske sjikt ble isolert, vasket med vann, vasket med saltvann, tørket over magnesiumsulfat og filtrert for å gi rå forbindelse 103. Råproduktet ble kromatografert på kiselgel under eluering med 2% metanol i metylenklorid. Ren forbindelse 103 ble dermed erholdt (210 mg; 50% utbytte):  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 7,51 (m, 1H), 7,38 (d, 2H), 7,20 (t, 2H), 7,08 (t, 2H), 6,70 (bred s, 1H), 6,30 (dd, 2H), 5,20 (s, 2H).

20

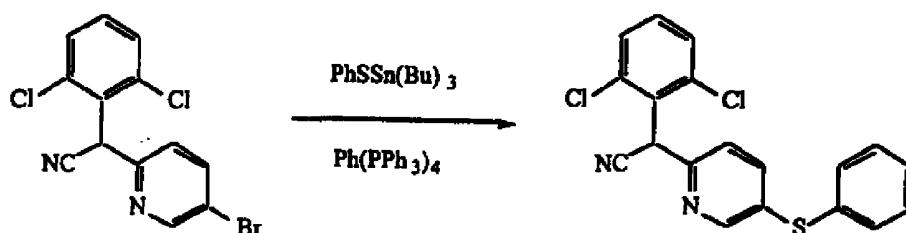
EKSEMPEL 7Syntese av p38-inhibitorforbindelse 201

A.



Det ovenfor viste utgangsnitril (5,9 g; 31,8 mmol) ble løst  
 5 opp i DMF (20 ml) ved romtemperatur. Natriumhydrid (763 mg;  
 31,8 mmol) ble deretter satt til, hvilket førte til en  
 sterkt gulfarget oppløsning. Etter 15 minutter ble en opp-  
 løsning av 2,5-dibromopyridin (5,0 g; 21,1 mmol) i DMF (10  
 ml) satt til, etterfulgt av palladiumtetrakis(trifenyl-  
 10 fosfin) (3 mmol). Oppløsningen ble deretter oppvarmet under  
 tilbakeløp i 3 timer. Reaksjonsblandingen ble avkjølt til  
 romtemperatur og fortynnet med etylacetat. Det organiske  
 sjikt ble deretter isolert, vasket med vann og deretter med  
 saltvann, tørket over magnesiumsulfat, filtrert og inndam-  
 15 pet under vakuum for å gi en rå olje. Flashkolonnekromato-  
 grafi under eluering med 10% etylacetat i heksan gav pro-  
 duktet (5,8 g; 84%) i form av et hvitaktig fast stoff.

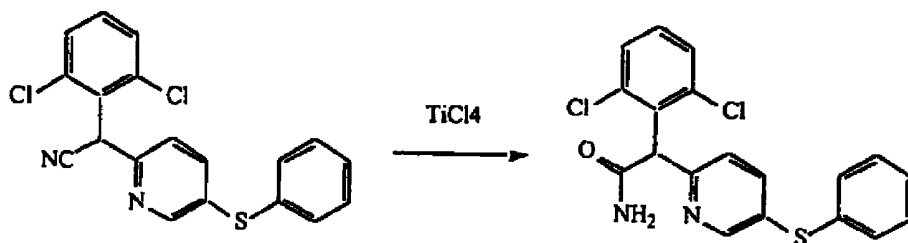
B.



Bromidet som ble dannet i trinn A (194,8 mg; 0,57 mmol),  
 20 ble løst opp i xylen (15 ml). Til denne oppløsning satte vi

tiofenylstannan (200 µl; 587 mmol) og palladiumtetrakis-  
(trifenylfosfin) (25 mg). Oppløsningen ble oppvarmet under  
tilbakekøl over natten, avkjølt, filtrert og inndampet  
under vakuum. Råproduktet ble kromatografert på kiselgel  
5 under eluering med metylenklorid for å gi et rent produkt  
(152 mg; 72%) i form av en gul olje.

C.

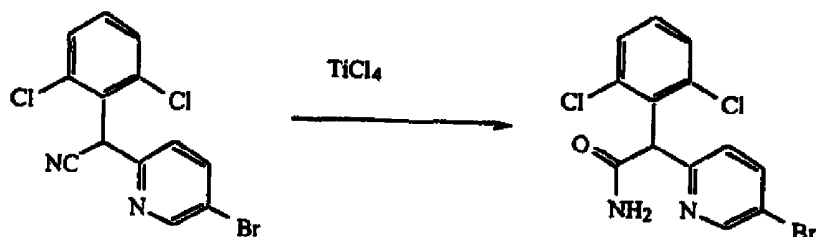


Forbindelse 201

Nitrilet som ble dannet i trinn B (1,2 g; 3,37 mmol), ble  
løst opp i iseddik (30 ml). Til denne oppløsning satte vi  
10 vann (120 µl; 6,67 mmol) etterfulgt av titantetraklorid  
(760 µl; 6,91 mmol), som førte til en eksoterm reaksjon.  
Oppløsningen ble deretter oppvarmet under tilbakekøl i to  
timer, avkjølt og helt i 1N HCl. Det vandige sjikt ble  
ekstrahert med metylenklorid. Det organiske sjikt ble  
15 tilbakevasket med 1N NaOH, tørket over magnesiumsulfat og  
filtrert over en plugg av kiselgel. Pluggen ble først  
eluert med metylenklorid for å fjerne ureagert utgangs-  
stoff, og deretter med etylacetat for å gi forbindelse 201.  
Etylacetatet ble inndampet for å gi ren forbindelse 201  
20 (1,0 g; 77%).

Eksempel 8Syntese av p38-inhibitorforbindelse 110

A.



Utgangsnitrilet (3,76 g; 11,1 mol) ble først løst opp i  
 5 iseddik (20 ml). Til denne oppløsning satte vi titantetra-  
 klorid (22,2 mmol) og vann (22,2 mmol), og oppvarmet opp-  
 løsningen under tilbakeløp i 1 time. Reaksjonsblandingen  
 ble deretter avkjølt og fortynnet i vann/etylacetat. Det  
 organiske sjikt ble deretter isolert, vasket med saltvann  
 10 og tørket over magnesiumsulfat. Det organiske sjikt ble  
 deretter filtrert og inndampet under vakuum. Det dannede  
 råprodukt ble kromatografert på kiselgel under eluering med  
 5% metanol i metylenklorid for å gi rent produkt i form av  
 et gult skum (2,77 g; 70%).

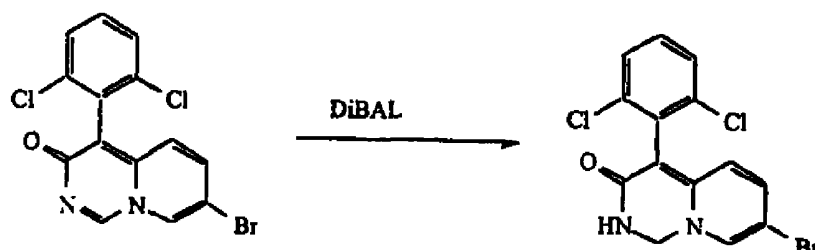
15 B.



Amidet som ble dannet i trinn A (1,54 g; 4,3 mmol), ble  
 løst opp i toluen (20 ml). Vi satte deretter N,N-dimetyl-  
 formamiddimetylacetal (1,53 g; 12,9 mmol) til, oppvarmet  
 den dannede oppløsning i 10 minutter og lot den deretter  
 20 avkjøles til romtemperatur. Reaksjonsblandingen ble deret-  
 ter inndampet under vakuum, og residuet ble kromatografert

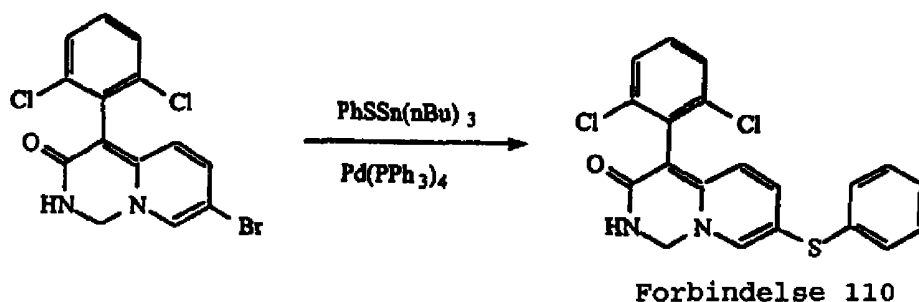
på kiselgel under eluering med 2-5% metanol i metylenklorid. Det isolerte materiale ble deretter løst opp i varmt etylacetat. Oppløsningen fikk avkjøles, hvilket førte til en krystallisasjon av rent produkt i form av et gult fast stoff (600 mg; 40%). Ytterligere materiale (ca. 800 mg) var tilgjengelig fra modervæsken.

C.



Bromidet fra trinn B (369 mg; 1 mmol) ble løst opp i THF (10 ml). Vi satte deretter diisobutylaluminiumhydrid (1,0 M oppløsning, 4 mmol) til, omrørte reaksjonsblandingen ved romtemperatur i 10 minutter og stanset deretter reaksjonen med metanol (1 ml). En mettet oppløsning av Rochelle-salter ble deretter satt til, og blandingen ble ekstrahert med etylacetat. Det organiske sjikt ble isolert, tørket over magnesiumsulfat og inndampet, og residuet ble kromatografert på kiselgel under eluering med 1-3% metanol i metylenklorid for å gi et sterkt oransjefarget fast stoff (85 mg; 23% utbytte).

D.

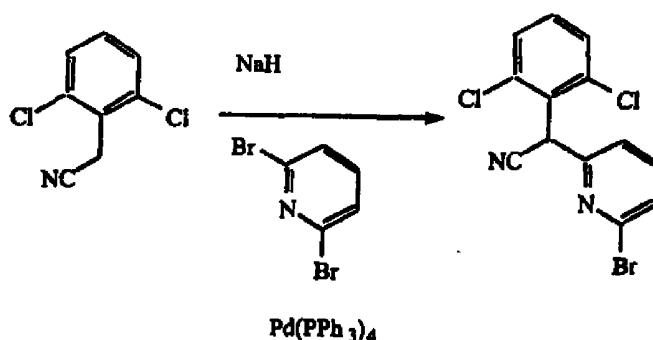


Bromidet som ble dannet i trinn C (35,2 mg; 0,1 mmol), ble løst opp i xylen (12 ml). Til denne oppløsning satte vi tiofenol (0,19 mmol) etterfulgt av tributyltinmetoksid (0,19 mmol). Den dannede oppløsning ble oppvarmet under  
 5 tilbakeløp i 10 minutter, etterfulgt av tilsetningen av palladiumtetrakis(trifenylfosfin) (0,020 mmol). Reaksjonsblandingen ble oppvarmet og overvåket for forsvinningen av bromidutgangstoffet. Reaksjonsblandingen ble deretter avkjølt til romtemperatur og ført gjennom en plugg av kisel-  
 10 gel. Pluggen ble eluert i utgangspunktet med metylenklorid for å fjerne overflødig tinreagens, og deretter med 5% metanol i etylacetat for å eluere p38-inhibitoren. Filtratet ble inndampet og deretter gjenkromatografert på kisel-  
 15 gel ved bruk av 5% metanol i etylacetat som elueringsmiddel for å gi ren forbindelse 110 (20 mg; 52%).

#### EKSEMPEL 9

#### Syntese av p38-inhibitorforbindelse 202

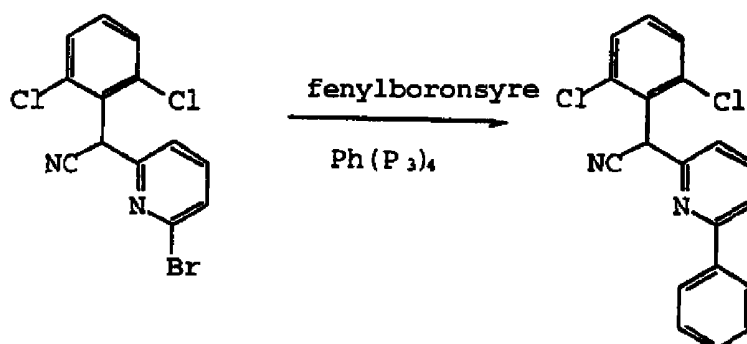
A.



Utgangsnitrilet (2,32 g; 12 mmol) ble løst opp i DMF (10  
 20 ml) ved romtemperatur. Natriumhydrid (12 mmol) ble deretter satt til, hvilket gav en sterkt gulfarget oppløsning. Etter 15 minutter ble en oppløsning av 2,6-dibrompyridin (2,36 g; 10 mmol) i DMF (5 ml) satt til, etterfulgt av palladium-  
 25 tetrakis(trifenylfosfin) (1,0 mmol). Oppløsningen ble deretter oppvarmet under tilbakeløp i 3 timer. Reaksjonsblandingen ble deretter avkjølt til romtemperatur og fortynnet med etylacetat. Det organiske sjikt ble isolert, vasket med

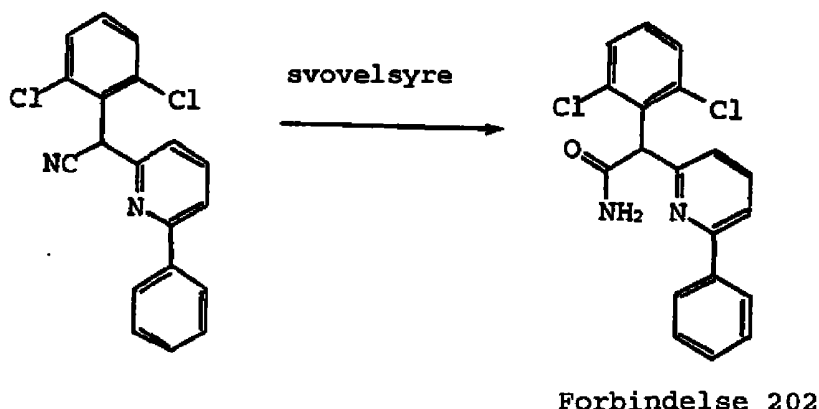
vann og saltvann, tørket over magnesiumsulfat, filtrert og inndampet under vakuum til en rå olje. Flashkolonnekromatografi under eluering med 10% etylacetat i heksan gav produktet (1,45 g; 42%) i form av et hvitt fast stoff.

5 B.



Bromforbindelsen som ble dannet i trinn A (1,77 g; 5,2 mmol), ble løst opp i toluen (20 ml), og den dannede oppløsning ble avgasset. Under en nitrogenatmosfære ble en oppløsning av fenylboronsyre (950 mg; 7,8 mmol) i etanol (4 ml) og en oppløsning av natriumkarbonat (1,73 g; 14 mmol) i vann (4 ml) satt til. Reaksjonsblandingen ble oppvarmet under tilbakesløp i én time og ble deretter avkjølt til romtemperatur. Reaksjonsblandingen ble deretter fortynnet med etylacetat og vasket med vann og saltvann. Det organiske sjikt ble deretter tørket med magnesiumsulfat, filtrert og inndampet under vakuum. Residuet ble rensset på kiselgel under eluering med 30% etylacetat i heksan for å gi produktet i form av et hvitt fast stoff (1,56 g; 88%).

C.

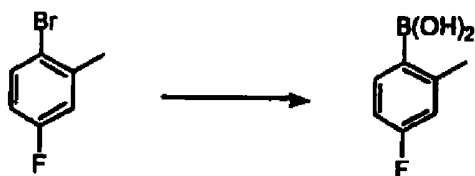


Nitrilet fra trinn B (700 mg; 2,07 mmol) ble løst opp i konsentrert svovelsyre (10 ml) og oppvarmet til 80°C i 1 time. Reaksjonsblandingen ble avkjølt til romtemperatur, og  
 5 pH-verdien ble justert til 8 ved bruk av 6N natriumhydroksid. Blandingen ble deretter ekstrahert med etylacetat. Det organiske sjikt ble isolert, tørket med magnesiumsulfat og inndampet under vakuum for å gi forbindelse 202 i form av et gult skum (618 mg; 84%).

10

EKSEMPEL 10Syntese av forbindelse 410

A.



I en flammetørket 100 ml rundbunnet kolbe ble 2,28 g (93,8 mmol) magnesiumspon satt til 50 ml vannfritt tetrahydro-  
 15 furan. En jodkrystall ble satt til, hvilket gav en lysebrun farge. Til oppløsningen satte man 1,5 ml 10,0 ml (79,1 mmol) prøve av 2-brom-5-fluortoluen. Oppløsningen ble oppvarmet under tilbakeløp. Den brune farge bleknet, og tilbakeløpet ble opprettholdt når den eksterne varmekilde ble

fjernet, hvilket tydet på en Grignard-dannelse. Når tilbaketilbake-  
 løpet gav seg, satte man til en ytterligere porsjon av  
 1,0-1,5 ml bromid, hvilket førte til et kraftig tilbaketilbake-  
 løp. Prosessen ble gjentatt inntil alt bromidet var blitt til-  
 5 satt. Den olivengrønne oppløsning ble eksternt oppvarmet  
 til tilbaketilbake- løp i én time for å sikre at reaksjonen var  
 fullført. Oppløsningen ble avkjølt i et isbad og ved hjelp  
 av en sprøyte satt til en oppløsning av 9,3 ml (81,9 mmol)  
 trimetylborat i 100 ml tetrahydrofuran ved -78°C. Etter at  
 10 Grignard-blandingen var blitt satt til, ble kolben fjernet  
 fra kjølebadet, og oppløsningen ble omrørt ved romtempera-  
 tur over natten. Den gråhvite oppslemming ble helt i 300 ml  
 H<sub>2</sub>O, og de flyktige stoffer ble inndampet under vakuum. HCl  
 (400 ml av en 2N oppløsning) ble satt til, og den melke-  
 15 hvite blanding ble omørt i én time ved romtemperatur. Et  
 hvitt fast stoff feltes. Blandingen ble ekstrahert med di-  
 etyleter, og det organiske ekstrakt ble tørket (MgSO<sub>4</sub>) og  
 inndampet under vakuum for å gi 11,44 g (94%) av borsyren i  
 form av et hvitt fast stoff.

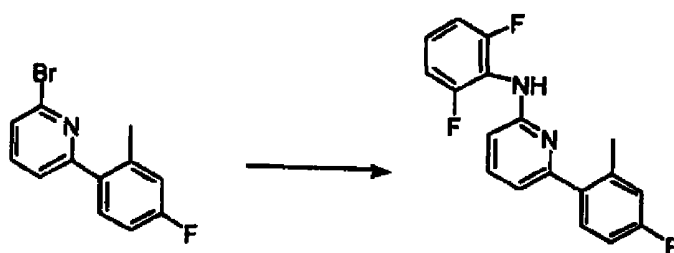
20 B.



I en 100 ml rundbunnet kolbe ble 7,92 g (33,4 mmol) 2,6-  
 dibromopyridin løst opp i 50 ml vannfritt toluen, hvorved  
 det dannedes en klar, fargeløs oppløsning. 4-Fluor-2-metyl-  
 benzenboronsyre (5,09 g; 33,1 mmol) som ble dannet i trinn  
 25 A, ble satt til, hvorved det dannedes en hvit suspensjon.  
 Thalliumkarbonat (17,45 g; 37,2 mmol) ble satt til, etter-  
 fulgt av en katalytisk mengde (150 mg) Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>. Blandin-  
 gen ble oppvarmet under tilbaketilbake- løp over natten, avkjølt og  
 filtrert over en pute av kiselgel. Kiselgelen ble vasket  
 30 med CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, og filtratet ble inndampet for å gi et hvitt

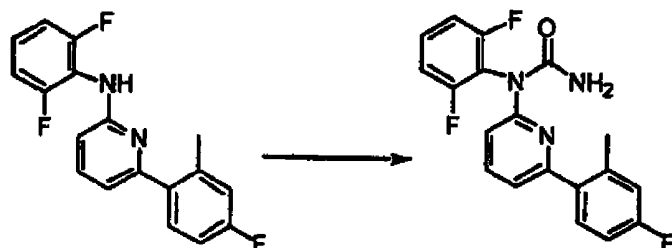
fast stoff. Det faste stoff ble løst opp i en minimal  
mengde 50% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/heksan og kromatografert på en kort  
kolonne av kiselgel ved bruk av 30% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/heksan for å gi  
6,55 g (74%) 2-brom-6-(4-fluor-2-metylfenyl)pyridin i form  
5 av et hvitt fast stoff.

C.



I en 50 ml rundbunnet kolbe ble 550 mg (2,07 mmol) 2-brom-  
6-(4-fluor-2-metylfenyl)pyridin som ble dannet i trinn B,  
løst opp i 30 ml vannfritt tetrahydrofuran, hvorved det  
10 dannedes en klar, fargeløs oppløsning. 2,6-difluoranilin  
(2,14 ml; 2,14 mmol) ble satt til, etterfulgt av 112 mg  
(2,79 mmol) av en 60% NaH-suspensjon i mineralolje. Gass-  
dannelse ble observert sammen med en mild eksoterm. Oppløs-  
ningen ble oppvarmet under tilbakesløp over natten og deret-  
15 ter avkjølt. Reaksjonsblandingen ble helt i 10% NH<sub>4</sub>Cl og  
ekstrahert med CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Det organiske ekstrakt ble tørket  
(MgSO<sub>4</sub>) og inndampet under vakuum for å gi en brun olje,  
som var en blanding av produktet og utgangsstoffet. Materi-  
alet ble kromatografert på en kort kolonne av kiselgel ved  
20 bruk av 50% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/heksan for å gi 262 mg (40%) 2-(2,6-di-  
fluorfenyl)-6-(4-fluor-2-metylfenyl)pyridin i form av en  
fargeløs olje.

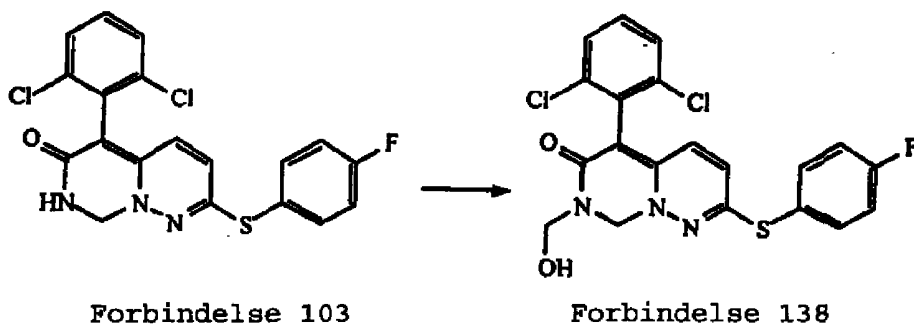
D.



I en 100 ml rundbunnet kolbe ble 262 mg (834  $\mu$ mol) 2-(2,6-difluorfenyl)-6-(4-fluor-2-metylfenyl)pyridin som ble dannet i trinn C, løst opp i 30 ml vannfritt  $\text{CHCl}_3$ , hvorved  
 5 det dannedes en klar, fargeløs oppløsning. Klorsulfonylisocyanat (1,0 ml; 11,5  $\mu$ mol) ble satt til, og den lysegule oppløsning ble omrørt ved romtemperatur over natten. Vann (ca. 30 ml) ble satt til, og forårsaket en mild eksoterm og en kraftig gassdannelse. Etter omrøring over natten ble det  
 10 organiske sjikt separert, tørket ( $\text{MgSO}_4$ ) og inndampet under vakuum for å gi en brun olje, som var en blanding av produktet og utgangsstoffet. Materialet ble kromatografert på en kort kiselgelkolonne ved bruk av 10% EtOAc/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Det isolerte utgangsstoff ble igjen behandlet ved de samme  
 15 reaksjonsbetingelser, og renses på samme måte for å gi tilsammen 205 mg (69%) urea i form av et hvitt fast stoff.

#### EKSEMPEL 11

##### Syntese av forbindelse 138



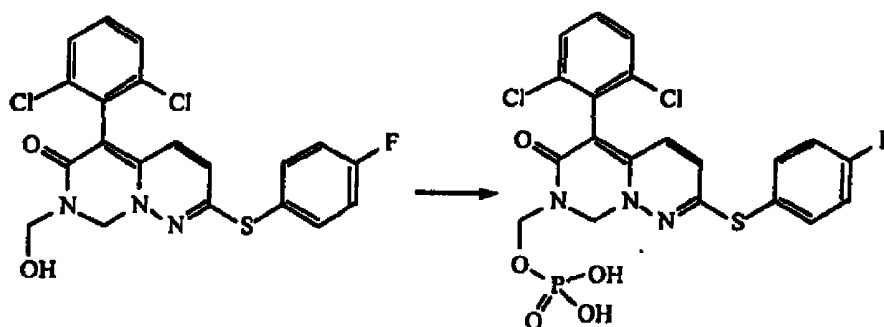
20 Forbindelse 103 (106 mg; 0,25  $\mu$ mol) ble løst opp i THF (0,5 ml), og til denne oppløsning satte man trietylamin (35  $\mu$ l;

0,25 mmol) etterfulgt av et overskudd formaldehyd (37% vandig oppløsning; 45 mg). Reaksjonsblandingen ble omrørt over natten ved romtemperatur. Reaksjonsblandingen ble deretter rotasjonsinndampet under redusert trykk, og residuet ble  
 5 løst opp i metylenklorid og påført på en flashkiselgelkolonne. Kolonnen ble eluert med 2% metanol i metylenklorid for å gi et rent produkt (78 mg; 70% utbytte).

### EKSEMPEL 12

#### Syntese av prodroger av forbindelse 103

10 A.

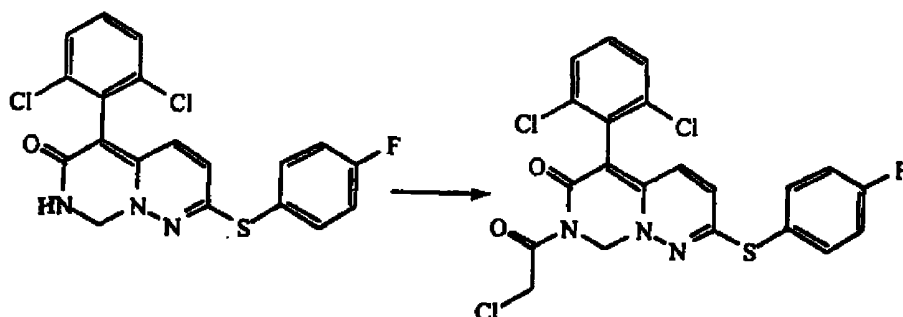


Forbindelse 138

Fosfatprodroke av  
forbindelse 103

Forbindelse 138 (1 ekvivalent) løses opp i metylenklorid, og til denne oppløsning settes trietylamin (1 ekvivalent)  
 15 etterfulgt av dibenzylfosfonylchlorid (1 ekvivalent). Opp-løsningen røres om ved romtemperatur og overvåkes ved TLC for å følge med forbruket av utgangsstoff. Metylenklorid-sjiktet fortynnes deretter med etylacetat og vaskes med 1N HCl, mettet natriumbikarbonat og mettet NaCl. Det organiske  
 20 sjikt tørkes deretter og rotasjonsfordampes, og råproduktet renses deretter på kiselgel. Det rene produkt løses deretter opp i metanol, og dibenzylesterne avbeskyttes med 10% palladium på trekull under en hydrogenatmosfære. Når overvåkingen viser at reaksjonen er fullført, filtreres katalysatoren over celitt, og filtratet rotasjonsinndampes for å  
 25 gi fosfatproduktet.

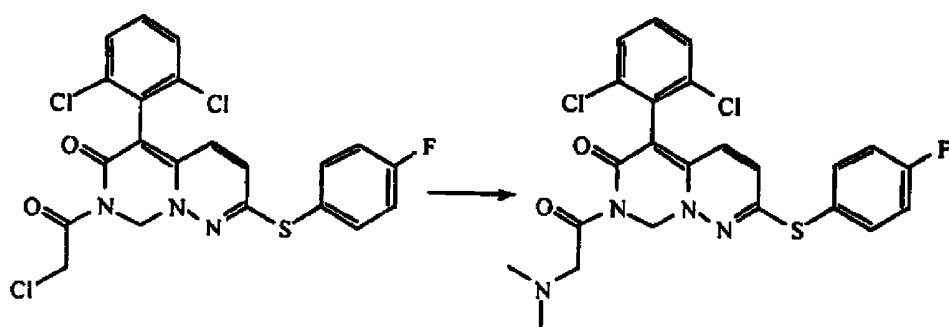
B.



Forbindelse 103

Forbindelse 103 (210 mg; 1,05 mmol) ble løst opp i THF (2 ml) og avkjølt til  $-50^{\circ}\text{C}$  under en nitrogenatmosfære. Til denne oppløsning satte man litiumheksametyldisilazan (1,1 mmol) etterfulgt av kloracetylklorid (1,13 mmol). Reaksjonsblandingen ble fjernet fra kjølebadet og fikk oppvarmes til romtemperatur, hvorefter reaksjonsblandingen ble fortynnet med etylacetat og inaktivert med vann. Det organiske sjikt ble vasket med saltvann, tørket og rotasjonsinndampet til tørrhet. Råproduktet ble flashkromatografert på kiselgel ved bruk av 25% etylacetat i heksan som elueringsmiddel for å gi 172 mg (70%) av det rene ønskede produkt, som ble brukt som det var i de følgende reaksjoner.

15 C.

Dimetylaminoacetalprodrege  
av forbindelse 103

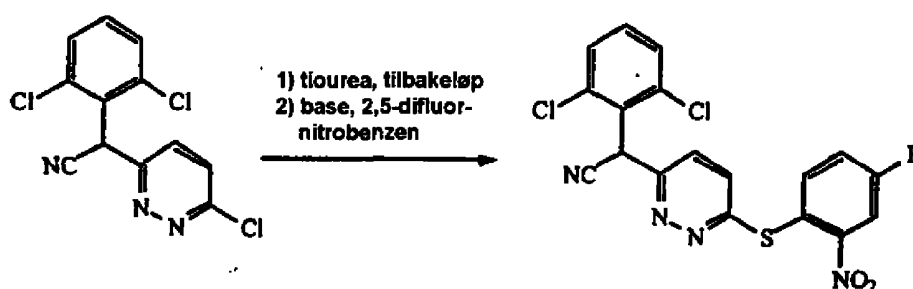
Kloracetylforbindelsen løses opp i metylenklorid og behandles med et overskudd dimetylamin. Reaksjonen overvåkes ved

TLC, og når den er fullført, fjernes alle flyktige stoffer for å gi det ønskede produkt.

### EKSEMPEL 13

#### Syntese av forbindelsene 34 og 117

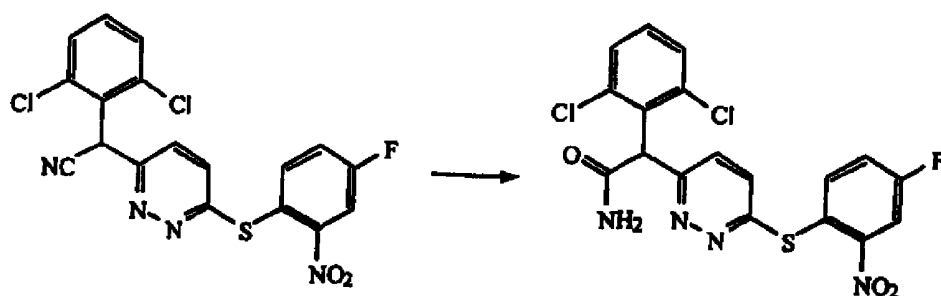
5 A.



Nitrilet fra eksempel 5, trinn A (300 mg; 1,0 mmol) ble løst opp i etanol (10 ml), og til denne oppløsning satte man tiourea (80,3 mg; 1,05 mmol). Reaksjonsblandingen ble oppvarmet under tilbakelep i 4 timer, og ved dette tids-  
10 punkt viste TLC at alt utgangsstoff var blitt oppbrukt. Reaksjonsblandingen ble avkjølt, alle flyktige stoffer ble fjernet under redusert trykk, og residuet ble løst opp i aceton (10 ml).

Til denne oppløsning satte man deretter 2,5-difluornitro-  
15 benzen (110 µl; 1,01 mmol) etterfulgt av kaliumkarbonat (200 mg; 1,45 mmol) og vann (400 µl). Reaksjonsblandingen ble omrørt ved romtemperatur over natten. Reaksjonsblandingen ble deretter fortynnet med metylenklorid (25 ml) og filtrert gjennom en bomullsplugg. Alle flyktige stoffer ble  
20 fjernet under redusert trykk, og residuet ble flashkromatografert på kiselgel under eluering med en gradient av fra 10 til 25% etylacetat i heksan for å gi det ønskede produkt (142 mg; 33%).

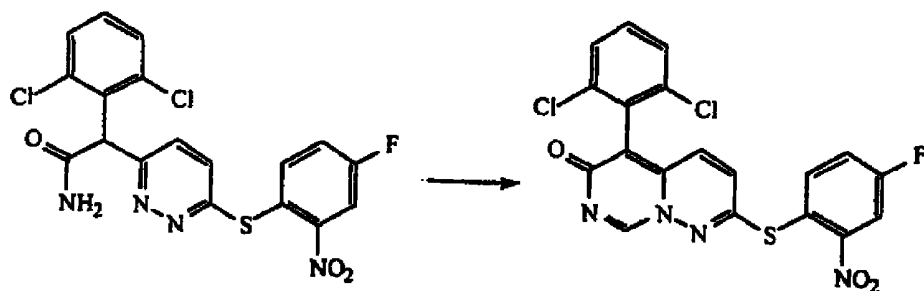
B.



Nitrilproduktet fra trinn A (142 mg; 0,33 mmol) ble blandet med konsentrert svovelsyre (2 ml), oppvarmet under tilbake-

- 5 Blandingen ble deretter fortynnet med etylacetat og forsiktig nøytralisert med mettet kaliumkarbonatoppløsning (vandig). Sjøktene ble separert, og det organiske sjikt ble vasket med vann og saltvann og tørket over magnesiumsulfat. Blandingen ble filtrert og inndampet til tørrhet. Residuet
- 10 ble brukt i det følgende trinn uten ytterligere rensing (127 mg; 85% utbytte).

C.

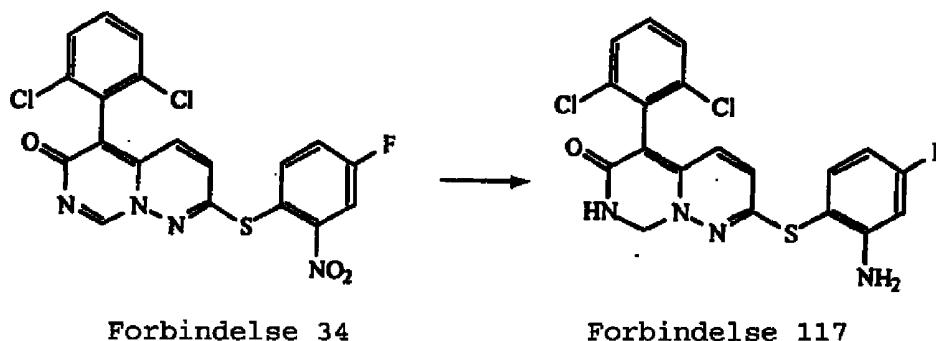


Forbindelse 34

- Amidet fra trinn B (127 mg; 0,28 mmol) ble løst opp i THF (3 ml), og til denne oppløsning satte man dimetylformamid-
- 15 dimetylacetal (110  $\mu$ l; 0,83 mmol). Reaksjonsblandingen ble oppvarmet under tilbake- løp i 5 minutter og deretter avkjølt til romtemperatur. Alle flyktige stoffer ble fjernet under vakuum, og residuet ble flashkromatografert på kiselgel

under eluering med 2,5% metanol i metylenklorid for å gi den rene ønskede forbindelse 34 (118 mg; 92%).

D.

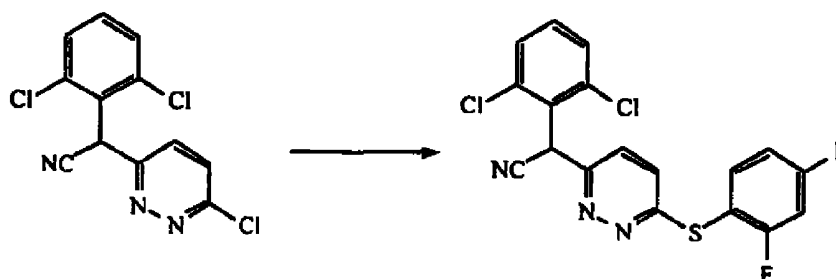


- 5 En oppløsning av nikkeldikloridheksahydrat (103 mg; 0,44 mol) i en blanding av benzen/metanol (0,84 ml/0,84 ml) ble satt til en oppløsning av forbindelse 34 (100,8 mg; 0,22 mmol) i benzen (3,4 ml), og denne oppløsning ble avkjølt til 0°C. Til denne oppløsning satte man deretter natrium-
- 10 borhydrid (49 mg; 1,3 mmol). Reaksjonsblandingen ble omrørt mens man lot den oppvarmes til romtemperatur. Reaksjonsblandingen ble inndampet under vakuum, og residuet ble flashkromatografert under eluering med 2% metanol i metylenklorid for å gi det rene ønskede produkt, nemlig forbind-
- 15 dese 117 (21 mg; 25% utbytte).

#### EKSEMPEL 14

##### Syntese av forbindelsene 53 og 142

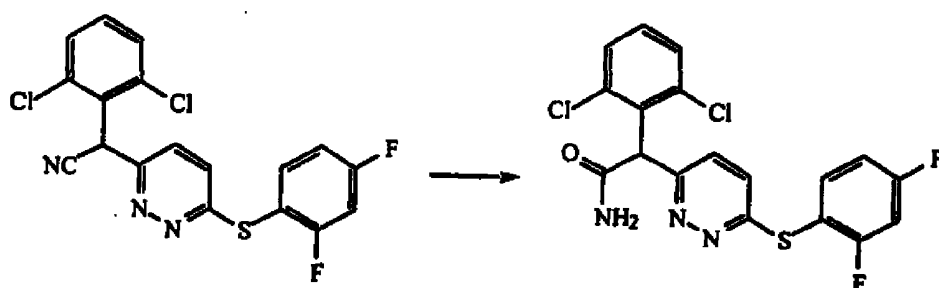
A.



Produktet som vises i reaksjonen ovenfor, ble fremstilt ved bruk av fremgangsmåten i eksempel 1, trinn B, ved bruk av klorpyridazin (359 mg; 1,21 mmol) og 2,4-difluortiofenol (176 mg; 1,21 mmol). Produktet ble erholdt etter flash-

5 kiselgelkromatografi (451 mg; 92%).

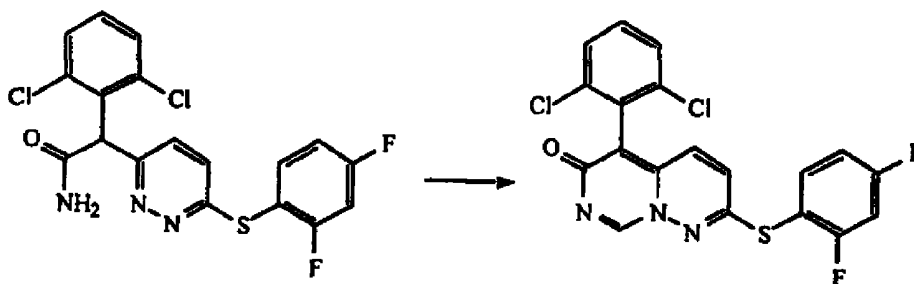
B.



Den ovenfor viste omsetning ble utført slik det ble beskrevet i eksempel 1, trinn C, ved bruk av 451 mg utgangsstoff og 5 ml konsentrert svovelsyre, for å gi det viste produkt

10 (425 mg; 90%).

C.

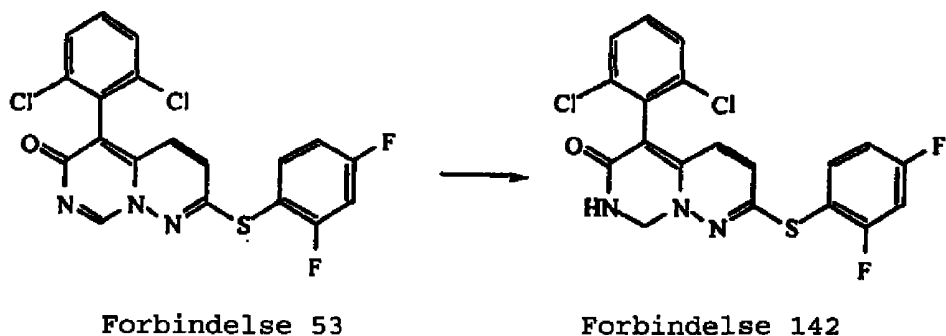


Forbindelse 53

Den ovenfor viste omsetning ble utført slik det ble beskrevet i eksempel 1, trinn D, ved bruk av utgangsamid (410 mg; 0,96 mmol) og dimetylformamiddimetylacetal (3 mmol). Reak-

15 sjonsblandingen ble oppvarmet ved 50°C i 30 minutter og opparbeidet slik det ble beskrevet tidligere. Forbindelse 53 ble erholdt (313 mg; 75%).

D.



Forbindelse 34 (213; 0,49 mmol) ble løst opp i THF (10 ml) og avkjølt til 0°C, og til denne oppløsning ble det satt boran i THF (1M; 0,6 mmol). Reaksjonsblandingen ble omrørt i 30 minutter, inaktivert med vann og fortynnet med etylacetat. Det organiske sjikt ble vasket med vann og saltvann, tørket og rotasjonsfordampet. Residuet ble renset på kiselgel under eluering med en gradient av fra 1 til 5% metanol i metylenklorid for å gi forbindelse 142 (125 mg; 57%).

#### EKSEMPEL 15

##### Kloning av p38-kinase i insektceller

To spleisevarianter av humant p38-kinase, nemlig CSBP1 og CSBP2, er blitt identifisert. Spesifikke oligonukleotid-primere ble brukt for å amplifisere det kodende parti av CSBP2-cDNA ved bruk av en HeLa-cellesamling (Stratagene) som sjablone. Polymerasekjedereaksjonsproduktet ble klonet inn i pET-15b-vektoren (Novagen). Baculovirus-overføringsvektoren, dvs. pVL-(His)6-p38, ble konstruert ved å subklone et XbaI-BamHI-fragment av pET15b-(His)6-p38 inn i de komplementære stillinger i plasmid pVL1392 (Pharmlingen).

Plasmidet pVL-(His)6-p38 styrte syntesen av et rekombinant protein som bestod av et 23 residuer langt peptid (MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMLE, hvor LVPRGS representerer en trombinspaltningsstilling) som var smeltet sammen i rammen med N-terminus av p38, slik det ble bekreftet ifølge DNA-

sekvensiering og ved N-terminal sekvensiering av det uttrykte protein. Monosjiktkultur av *Spodoptera frugiperda* (Sf9)-insektceller (ATCC) ble holdt i TNM-FH-medium (Gibco BRL) supplementert med 10% føtalt bovint serum i en T-kolbe ved 27°C. Sf9-celler i log-fase ble ko-transfisert med lineært viralt DNA fra *Autographa californica*-nukleært polyhedrosevirus (Pharmlingen) og overføringsvektor pVL-(His)6-p38 ved bruk av Lipofectin (Invitrogen). De enkelte rekombinante baculoviruskloner ble renset ved plakkassay ved bruk av 1% lavsmeltende agarose.

#### EKSEMPEL 16

##### Ekspresjon og rensing av rekombinant p38-kinase

*Trichoplusia ni* (Tn-368) "High-Five"-celler (Invitrogen) ble dyrket i suspensjon i Excel-405 proteinfritt medium (JRH Bioscience) i en rystekolbe ved 27°C. Celler i tettheten  $1,5 \times 10^6$  celler/ml ble infisert med det ovenfor beskrevne rekombinante baculovirus med en infeksjonsmultiplisitet på 5. Ekspresjonsnivået av rekombinant p38 ble overvåket ved immunoblotting ved bruk av et kanin-anti-p38-antistoff (Santa Cruz Biotechnology). Cellemassen ble samlet 72 timer etter infeksjonen, når ekspresjonsnivået av p38 nådde sitt maksimum.

Frossen cellepasta fra celler som uttrykker den (His)<sub>6</sub>-taggede p38, ble tint i 5 volumdeler Buffer A (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 8,0; 200 mM NaCl; 2 mM β-merkapttoetanol, 10% glycerol og 0,2 mM PMSF). Etter mekanisk sprengning av cellene i en mikrofluidiserer, ble lysatet sentrifugert ved  $30.000 \times g$  i 30 minutter. Supernatanten ble inkubert batchvis i 3-5 timer ved 4°C med "Talon" (Clontech) metallaffinitets-harpiks i forholdet 1 ml harpiks pr. 2-4 mg forventet p38. Harpiksen ble felt ved sentrifugering ved  $500 \times g$  i 5 minutter og forsiktig vasket batchvis med Buffer A. Harpiksen ble oppslemmet og helt i en kolonne (ca.  $2,6 \times 5,0$  cm) og vasket med Buffer A + 5 mM imidazol.

(His)<sub>6</sub>-p38 ble eluert med Buffer A + 100 mM imidazol og deretter dialysert over natten ved 4°C mot 2 liter Buffer B (50 mM HEPES, pH 7,5; 25 mM  $\beta$ -glycerofosfat; 5% glycerol; 2 mM DTT). His<sub>6</sub>-halen ble fjernet ved tilsetning av 1,5 enheter trombin (Calbiochem) pr. mg p38 og inkubering ved 20°C i 2-3 timer. Trombinet ble inaktivert ved tilsetning av 0,2 mM PMSF, og deretter ble hele prøven fylt på en 2 ml benzamidinagarose-kolonne (American International Chemical).

Gjennomstrømningsfraksjonen ble direkte ladet på en 2,6 × 5,0 cm Q-sepharose-kolonne (Pharmacia) som på forhånd var blitt ekvilibrert i Buffer B + 0,2 mM PMSF. p38 ble eluert med en 20 kolonnevolumers lineær gradient til 0,6M NaCl i Buffer B. De eluerte proteintopper ble samlet og dialysert over natten ved 4°C mot Buffer C (50 mM HEPES pH 7,5; 5% glycerol; 50 mM NaCl; 2 mM DTT; 0,2 mM PMSF).

Det dialyserte protein ble konsentrert i en Centriprep (Amicon) til 3-4 ml, og påført på en 2,6 × 100 cm Sephacryl S-100HR-kolonne (Pharmacia). Proteinet ble eluert med strømningshastigheten 35 ml/time. Hovedtoppen ble samlet, innstilt til 20 mM DTT, inndampet til 10-80 mg/ml og frosset i alikvoter ved -70°C eller brukt umiddelbart.

#### EKSEMPEL 17

##### Aktivering av p38

p38 ble aktivert ved å kombinere 0,5 mg/ml p38 med 0,005 mg/ml DD-dobbelmutant MKK6 i Buffer B + 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM ATP, 0,2 mM Na<sub>2</sub>VO<sub>4</sub> i 30 minutter ved 20°C. Aktiveringsblandingen ble deretter plassert på en 1,0 × 10 cm MonoQ-kolonne (Pharmacia) og eluert med en lineær 20 kolonnevolumers gradient til 1,0 M NaCl i Buffer B. Det aktive p38 eluerte etter ADP'et og ATP'et. Toppen med det aktive p38 ble samlet og dialysert mot buffer B + 0,2 mM Na<sub>2</sub>VO<sub>4</sub> for å fjerne NaCl'et. Det dialyserte protein ble justert til 1,1M kaliumfosfat ved tilsetning av en 4,0M stamopløs-

ning, og plassert på en 1,0 × 10 cm HIC-kolonne (Rainin Hydropore) som på forhånd var blitt ekvilibrert i Buffer D (10% glycerol; 20 mM β-glycerofosfat; 2,0 mM DTT) + 1,1 MK<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Proteinet ble eluert med en 20 kolonnevolumers  
 5 lineær gradient til Buffer D + 50 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Det dobbelt fosforylerte p38 ble eluert som hovedtoppen, og ble samlet for dialyse mot Buffer B + 0,2 mM Na<sub>2</sub>VO<sub>4</sub>. Det aktiverte p38 ble lagret ved -70°C.

#### EKSEMPEL 18

##### 10 p38-inhiberingsassayer

##### A. Inhibering av fosforylasjonen av EGF-receptorpeptid

Dette assay ble utført i nærvær av 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM β-glycerofosfat, 10% glycerol og 100 mM HEPES-buffer ved pH 7,6. For en typisk IC<sub>50</sub>-bestemmelse ble en stamoppløsning  
 15 fremstilt som inneholdt alle de ovennevnte komponenter og aktivert p38 (5 nM). Stamoppløsningen ble fylt i alikvoter på små flasker. Et fast volum DMSO eller inhibitor i DMSO (endelig konsentrasjon av DMSO i reaksjonsblandingen var 5%) ble innført i hver flaske, blandet og inkubert i 15  
 20 minutter ved romtemperatur. EGF-receptorpeptid, KRELVEPLTPSGEAPNQALLR, en fosforylakseptor i p38-katalysert kinasereaksjon (1), ble satt til hver flaske til den endelige konsentrasjon 200 μM. Kinasereaksjonen ble initiert med ATP (100 μM), og flaskene ble inkubert ved 30°C. Etter  
 25 30 minutter ble reaksjonene stanset med et likt volum av 10% trifluoreddiksyre (TFA).

Det fosforylerte peptid ble kvantifisert ved HPLC-analyse. Separasjon av fosforylert peptid fra det ufosforylerte peptid ble oppnådd på en reversfasekolonne (Deltapak, 5 μm,  
 30 C18 100D, del nr. 011795) med en binær gradient av vann og acetonitril, hver innholdende 0,1% TFA. IC<sub>50</sub> (konsentrasjonen av inhibitor som gav 50% inhibering) ble bestemt ved å

plotte % aktivitet som var igjen, mot inhibitorkonsentrasjonen.

#### B. Inhibering av ATPase-aktivitet

Dette assay ble utført i nærvær av 10 mM  $MgCl_2$ , 25 mM  $\beta$ -glycerofosfat, 10% glycerol og 100 mM HEPES-buffer ved pH 7,6. For en typisk bestemmelse av  $K_i$ -verdien ble  $K_m$ -verdien for ATP i ATPase-aktiviteten av reaksjonen med aktivert p38 bestemt i fravær av inhibitor og i nærvær av to konsentrasjoner av inhibitor. En stamopløsning ble fremstilt, som inneholdt alle de ovennevnte komponenter og aktivert p38 (60 nM). Stamopløsningen ble fylt i alikvoter på flasker. Et fast volum DMSO eller inhibitor i DMSO (endelig konsentrasjon av DMSO i reaksjonen var 2,5%) ble innført i hver flaske, blandet og inkubert i 15 minutter ved romtemperatur. Reaksjonen ble initiert ved å sette til forskjellige konsentrasjoner av ATP, og deretter inkubert ved 30°C. Etter 30 minutter ble reaksjonene stanset med 50  $\mu$ l EDTA (0,1 M; endelig konsentrasjon); pH 8,0. Produktet av p38-ATPase-aktiviteten, ADP, ble kvantifisert ved HPLC-analyse.

Separasjon av ADP fra ATP ble oppnådd på en reversfase-kolonne (Supelcosil, LC-18, 3  $\mu$ m, del nr. 5-8985) ved bruk av en binær løsemiddelgradient med den følgende sammensetning: Løsemiddel A: 0,1M fosfatbuffer som inneholdt 8 mM tetrabutylammoniumhydrogensulfat (Sigma Chemical Co., katalog-nr. T-7158), Løsemiddel B: Løsemiddel A med 30% metanol.

$K_i$ -verdien ble bestemt fra hastighetsdataen som en funksjon av inhibitor- og ATP-konsentrasjonene. Resultatene for flere av inhibitorene ifølge oppfinelsen er angitt i den følgende tabell 6:

Tabell 6

| Forbindelse | $K_i$ ( $\mu M$ ) |
|-------------|-------------------|
| 1           | >20               |
| 2           | 15                |
| 3           | 5,0               |
| 5           | 2,9               |
| 6           | 0,4               |

Andre p38-inhibitorer ifølge oppfinnelsen vil også inhibere ATPase-aktiviteten av p38.

5 C. Inhibering av IL-1-, TNF-, IL-6- og IL-8-produksjonen i LPS-stimulerte PBMC'er

Inhibitorer ble serielt fortynnet i DMSO fra en 20 mM stamopløsning. Minst 6 serielle fortynninger ble fremstilt. Deretter ble 4x inhibitor-stamopløsninger fremstilt ved å sette 4  $\mu l$  av en inhibitorfortynning til 1 ml RMPI1640-medium/10% føtalt bovint serum. 4x inhibitor-stamopløsnin-  
 10 gningene inneholdt inhibitor i konsentrasjonene 80  $\mu M$ , 32  $\mu M$ , 12,8  $\mu M$ , 5,12  $\mu M$ , 2,048  $\mu M$ , 0,819  $\mu M$ , 0,328  $\mu M$ , 0,131  $\mu M$ , 0,052  $\mu M$ , 0,021  $\mu M$  osv. 4x inhibitor-stamopløsnin-  
 15 gningene ble forhåndsoppvarmet til 37°C inntil bruk.

Ferske buffy-celler fra humant blod ble separert fra andre celler i en Vacutainer CPT fra Becton & Dickinson (som inneholdt 4 ml blod og tilstrekkelig DPBS uten  $Mg^{2+}/Ca^{2+}$  for å fylle røret) ved sentrifugering ved 1500  $\times g$  i 15 minutter. Perifere blod-mononukleære celler (PBMC'er), plassert på toppen av gradienten i Vacutaineren, ble fjernet og vasket to ganger med RMPI1640-medium/10% føtalt bovint serum. PBMC'er ble samlet ved sentrifugering ved 500  $\times g$  i 10 minutter. Det samlede celleantall ble bestemt ved bruk  
 20 av et Neubauer celle-kammer, og cellene ble justert til konsentrasjonen 4,8  $\times 10^6$  celler/ml i cellekulturmedium (RPMI1640 supplementert med 10% føtal bovint serum).

Alternativt ble fullblod som inneholdt et antikoaguleringsmiddel, brukt direkte i assayet.

Vi plasserte 100 µl cellesuspensjon eller fullblod i hver brønn av en 96-brønners cellekulturplate. Deretter satte vi  
5 50 µl av 4x inhibitor-stamopløsningen til cellene. Til slutt satte vi til 50 µl av en lipopolysakkarid (LPS)-arbeidsstamopløsning (16 ng/ml i cellekulturmedium) for å gi den endelige konsentrasjon 4 ng/ml LPS i assayet. Det samlede assayvolum av vehikkel-kontrollen ble også justert  
10 til 200 µl ved å sette til 50 µl cellekulturmedium. PBMC-cellene eller fullblodet ble deretter inkubert over natten (i 12-15 timer) ved 37°C/5% CO<sub>2</sub> i en befuktet atmosfære.

Den følgende dag ble cellene blandet på et rysteapparat i 3-5 minutter før sentrifugering ved 500 × g i 5 minutter.  
15 Cellekultursupernatanter ble samlet og analysert ved ELISA for å bestemme nivået av IL-1b (R & D Systems, Quantikine kits, nr. DBL50), TNF-α (BioSource, nr. KHC3012), IL-6 (Endogen, nr. EH2-IL6) og IL-8 (Endogen, nr. EH2-IL8) i henhold til produsentens anvisninger. ELISA-dataen ble  
20 brukt for å generere doseresponskurver, utfra hvilke IC<sub>50</sub>-verdiene ble avledet.

Resultatene for kinaseassayet ("kinase"; delavsnitt A ovenfor), IL-1 og TNF i LPS-stimulerte PBMC'er ("celle") og IL-1, TNF og IL-6 i fullblod ("WB") for forskjellige p38-inhibitorer ifølge foreliggende oppfinnelse angis i den  
25 følgende tabell 7:

| <i>forb.<br/>nr.</i> | <i>kinase<br/>IC50</i> | <i>celle-IL-1<br/>IC50</i> | <i>celle-TNF<br/>IC50</i> | <i>WB IL-1<br/>IC50</i> | <i>WB TNF<br/>IC50</i> | <i>WB IL-6<br/>IC50</i> |
|----------------------|------------------------|----------------------------|---------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|
| <b>2</b>             | +                      | N.D.                       | N.D.                      | N.D.                    | N.D.                   | N.D.                    |
| <b>3</b>             | +                      | N.D.                       | N.D.                      | N.D.                    | N.D.                   | N.D.                    |
| <b>5</b>             | +                      | N.D.                       | N.D.                      | N.D.                    | N.D.                   | N.D.                    |
| <b>6</b>             | ++                     | ++                         | +                         | N.D.                    | N.D.                   | N.D.                    |
| <b>7</b>             | +                      | +                          | +                         | N.D.                    | N.D.                   | N.D.                    |
| <b>8</b>             | +                      | +                          | +                         | N.D.                    | N.D.                   | N.D.                    |
| <b>9</b>             | +                      | +                          | +                         | N.D.                    | N.D.                   | N.D.                    |
| <b>10</b>            | +                      | N.D.                       | N.D.                      | N.D.                    | N.D.                   | N.D.                    |
| <b>11</b>            | +                      | +                          | +                         | N.D.                    | N.D.                   | N.D.                    |
| <b>12</b>            | ++                     | ++                         | ++                        | +                       | +                      | +                       |

| forb.<br>nr. | kinase<br>IC50 | celle-IL-1<br>IC50 | celle-TNF<br>IC50 | WB IL-1<br>IC50 | WB TNF<br>IC50 | WB IL-6<br>IC50 |
|--------------|----------------|--------------------|-------------------|-----------------|----------------|-----------------|
| 13           | +              | +                  | +                 | N.D.            | N.D.           | N.D.            |
| 14           | +              | ++                 | +                 | N.D.            | N.D.           | N.D.            |
| 15           | +              | ++                 | ++                | N.D.            | N.D.           | N.D.            |
| 16           | ++             | +                  | ++                | N.D.            | N.D.           | N.D.            |
| 17           | +              | +                  | +                 | N.D.            | N.D.           | N.D.            |
| 18           | +              | +                  | +                 | N.D.            | N.D.           | N.D.            |
| 19           | +              | +                  | +                 | N.D.            | N.D.           | N.D.            |
| 20           | ++             | +                  | +                 | N.D.            | N.D.           | N.D.            |
| 21           | ++             | ++                 | +                 | N.D.            | N.D.           | N.D.            |
| 22           | +              | +                  | +                 | N.D.            | N.D.           | N.D.            |
| 23           | ++             | ++                 | +                 | +               | +              | +               |
| 24           | ++             | ++                 | ++                | +               | +              | N.D.            |
| 25           | ++             | ++                 | +                 | N.D.            | N.D.           | N.D.            |
| 26           | +              | +++                | ++                | +               | +              | +               |
| 27           | ++             | +                  | +                 | +               | +              | +               |
| 28           | ++             | ++                 | ++                | N.D.            | N.D.           | N.D.            |
| 29           | ++             | ++                 | ++                | N.D.            | N.D.           | N.D.            |
| 30           | +              | +                  | +                 | +               | N.D.           | N.D.            |
| 31           | +              | +                  | +                 | N.D.            | N.D.           | N.D.            |
| 32           | ++             | +                  | ++                | +               | +              | +               |
| 33           | ++             | ++                 | ++                | +               | +              | +               |
| 34           | +              | +                  | +                 | N.D.            | N.D.           | N.D.            |
| 35           | ++             | ++                 | +                 | +               | +              | +               |
| 36           | +              | +                  | +                 | +               | +              | +               |
| 37           | ++             | ++                 | +                 | +               | +              | +               |
| 38           | +++            | +++                | ++                | ++              | ++             | ++              |
| 39           | ++             | +                  | +                 | N.D.            | N.D.           | N.D.            |
| 40           | ++             | ++                 | +                 | N.D.            | N.D.           | N.D.            |
| 41           | +++            | +++                | +++               | N.D.            | N.D.           | N.D.            |

| forb.<br>nr. | kinase<br>IC50 | celle-IL-1<br>IC50 | celle-TNF<br>IC50 | WB IL-1<br>IC50 | WB TNF<br>IC50 | WB IL-6<br>IC50 |
|--------------|----------------|--------------------|-------------------|-----------------|----------------|-----------------|
| 42           | +              | N.D.               | N.D.              | N.D.            | N.D.           | N.D.            |
| 43           | ++             | +                  | +                 | N.D.            | N.D.           | N.D.            |
| 44           | ++             | +                  | +                 | N.D.            | N.D.           | N.D.            |
| 45           | ++             | N.D.               | N.D.              | N.D.            | N.D.           | N.D.            |
| 46           | ++             | +                  | +                 | N.D.            | N.D.           | N.D.            |
| 47           | ++             | ++                 | +                 | N.D.            | N.D.           | N.D.            |
| 48           | ++             | ++                 | +                 | N.D.            | N.D.           | N.D.            |
| 49           | ++             | +++                | +                 | +               | +              | +               |
| 50           | +              | N.D.               | N.D.              | N.D.            | N.D.           | N.D.            |
| 51           | ++             | N.D.               | N.D.              | N.D.            | N.D.           | N.D.            |
| 52           | ++             | N.D.               | N.D.              | N.D.            | N.D.           | N.D.            |
| 53           | +++            | +++                | +++               | +++             | +++            | +++             |
| 101          | ++             | +++                | +++               | +               | +              | ++              |
| 102          | +++            | +++                | +++               | +               | ++             | ++              |
| 103          | +++            | +++                | +++               | +               | ++             | ++              |
| 104          | ++             | ++                 | ++                | +               | +              | +               |
| 105          | ++             | +                  | +                 | N.D.            | N.D.           | N.D.            |
| 106          | +++            | +++                | +++               | +               | ++             | ++              |
| 107          | ++             | +                  | +                 | N.D.            | N.D.           | N.D.            |
| 109          | +++            | +++                | +++               | +               | +              | ++              |
| 108          | +++            | ++                 | +++               | ++              | +++            | +++             |
| 110          | ++             | +                  | +                 | N.D.            | N.D.           | N.D.            |
| 111          | ++             | +                  | +                 | N.D.            | N.D.           | N.D.            |
| 112          | ++             | ++                 | +                 | +               | +              | +               |
| 113          | +++            | +++                | ++                | +               | +              | +               |
| 114          | +++            | +++                | +++               | ++              | ++             | +++             |
| 115          | +++            | +++                | +++               | +               | +              | +               |
| 116          | +++            | +++                | ++                | +               | +              | +               |
| 117          | +++            | +++                | +++               | ++              | ++             | +++             |

| <i>forb.</i><br><i>nr.</i> | <i>kinase</i><br><i>IC50</i> | <i>celle-IL-1</i><br><i>IC50</i> | <i>celle-TNF</i><br><i>IC50</i> | <i>WB IL-1</i><br><i>IC50</i> | <i>WB TNF</i><br><i>IC50</i> | <i>WB IL-6</i><br><i>IC50</i> |
|----------------------------|------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| 118                        | ++                           | ++                               | ++                              | +                             | +                            | +                             |
| 119                        | ++                           | N.D.                             | N.D.                            | N.D.                          | N.D.                         | N.D.                          |
| 120                        | N.D.                         | ++                               | +                               | +                             | +                            | +                             |
| 121                        | +++                          | +++                              | ++                              | +                             | +                            | +                             |
| 122                        | ++                           | ++                               | +                               | +                             | +                            | +                             |
| 123                        | ++                           | ++                               | ++                              | +                             | +                            | +                             |
| 124                        | +                            | +                                | +                               | N.D.                          | N.D.                         | N.D.                          |
| 125                        | +++                          | +++                              | +++                             | +                             | +                            | +                             |
| 126                        | +                            | ++                               | +                               | N.D.                          | N.D.                         | N.D.                          |
| 127                        | +++                          | +++                              | +++                             | ++                            | ++                           | +++                           |
| 128                        | +                            | +                                | +                               | N.D.                          | N.D.                         | N.D.                          |
| 129                        | +++                          | +++                              | +++                             | ++                            | +                            | ++                            |
| 130                        | +++                          | ++                               | +                               | N.D.                          | N.D.                         | N.D.                          |
| 131                        | +++                          | +++                              | +++                             | N.D.                          | N.D.                         | N.D.                          |
| 132                        | +++                          | +++                              | ++                              | N.D.                          | N.D.                         | N.D.                          |
| 133                        | +++                          | +++                              | +++                             | N.D.                          | N.D.                         | N.D.                          |
| 134                        | +++                          | ++                               | +                               | N.D.                          | N.D.                         | N.D.                          |
| 135                        | +++                          | ++                               | +                               | +                             | +                            | +                             |
| 136                        | +++                          | +++                              | +++                             | +                             | +                            | ++                            |
| 137                        | +++                          | +++                              | ++                              | +                             | +                            | ++                            |
| 138                        | ++                           | +++                              | ++                              | +                             | +                            | +++                           |
| 139                        | +++                          | +++                              | +                               | +                             | +                            | +                             |
| 140                        | +++                          | +++                              | +++                             | ++                            | +                            | ++                            |
| 141                        | +++                          | +++                              | +++                             | +                             | +                            | +                             |
| 142                        | +++                          | +++                              | +++                             | +++                           | +++                          | +++                           |
| 143                        | +++                          | +++                              | ++                              | +                             | +                            | +                             |
| 144                        | +++                          | +++                              | ++                              | +                             | +                            | ++                            |
| 145                        | +++                          | +++                              | +++                             | +++                           | +++                          | +++                           |
| 201                        | ++                           | +                                | +                               | +                             | +++                          | +                             |

| <i>forb.<br/>nr.</i> | <i>kinase<br/>IC50</i> | <i>celle-IL-1<br/>IC50</i> | <i>celle-TNF<br/>IC50</i> | <i>WB IL-1<br/>IC50</i> | <i>WB TNF<br/>IC50</i> | <i>WB IL-6<br/>IC50</i> |
|----------------------|------------------------|----------------------------|---------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|
| <b>203</b>           | +                      | N.D.                       | N.D.                      | N.D.                    | N.D.                   | N.D.                    |
| <b>204</b>           | +                      | N.D.                       | N.D.                      | N.D.                    | N.D.                   | N.D.                    |
| <b>205</b>           | +                      | N.D.                       | N.D.                      | N.D.                    | N.D.                   | N.D.                    |
| <b>206</b>           | ++                     | +                          | +                         | N.D.                    | N.D.                   | N.D.                    |
| <b>207</b>           | +                      | N.D.                       | N.D.                      | N.D.                    | N.D.                   | N.D.                    |
| <b>208</b>           | N.D.                   | ++                         | N.D.                      | N.D.                    | N.D.                   | N.D.                    |
| <b>209</b>           | N.D.                   | +                          | N.D.                      | N.D.                    | N.D.                   | N.D.                    |
| <b>202/<br/>301</b>  | +++                    | ++                         | ++                        | +                       | +                      | +                       |
| <b>302</b>           | +++                    | +++                        | ++                        | +                       | +                      | +                       |
| <b>303</b>           | +                      | +                          | +                         | +                       | +                      | +                       |
| <b>304</b>           | +                      | +                          | +                         | +                       | +                      | +                       |
| <b>305</b>           | +++                    | +++                        | +                         | +                       | +                      | +                       |
| <b>306</b>           | ++                     | ++                         | +                         | +                       | +                      | +                       |
| <b>307</b>           | +++                    | ++                         | +                         | +                       | +                      | +                       |
| <b>308</b>           | +                      | N.D.                       | N.D.                      | N.D.                    | N.D.                   | N.D.                    |
| <b>309</b>           | ++                     | ++                         | ++                        | +                       | +                      | +                       |
| <b>310</b>           | ++                     | +                          | +                         | N.D.                    | N.D.                   | N.D.                    |
| <b>311</b>           | ++                     | +                          | +                         | N.D.                    | N.D.                   | N.D.                    |
| <b>312</b>           | +++                    | ++                         | +                         | +                       | +                      | +                       |
| <b>313</b>           | ++                     | +                          | +                         | N.D.                    | N.D.                   | N.D.                    |
| <b>314</b>           | +                      | N.D.                       | N.D.                      | N.D.                    | N.D.                   | N.D.                    |
| <b>315</b>           | +                      | N.D.                       | N.D.                      | N.D.                    | N.D.                   | N.D.                    |
| <b>316</b>           | +                      | N.D.                       | N.D.                      | N.D.                    | N.D.                   | N.D.                    |
| <b>317</b>           | +                      | +                          | +                         | N.D.                    | N.D.                   | N.D.                    |
| <b>318</b>           | ++                     | N.D.                       | N.D.                      | N.D.                    | N.D.                   | N.D.                    |
| <b>319</b>           | +                      | N.D.                       | N.D.                      | N.D.                    | N.D.                   | N.D.                    |
| <b>320</b>           | +++                    | ++                         | ++                        | N.D.                    | N.D.                   | N.D.                    |
| <b>321</b>           | +                      | N.D.                       | N.D.                      | N.D.                    | N.D.                   | N.D.                    |

| forb<br>nr. | kinase<br>IC50 | celle-IL-1<br>IC50 | celle-TNF<br>IC50 | WB IL-1<br>IC50 | WB TNF<br>IC50 | WB IL-6<br>IC50 |
|-------------|----------------|--------------------|-------------------|-----------------|----------------|-----------------|
| 322         | ++             | +                  | +                 | N.D.            | N.D.           | N.D.            |
| 323         | ++             | ++                 | ++                | N.D.            | N.D.           | N.D.            |
| 324         | ++             | ++                 | +                 | N.D.            | N.D.           | N.D.            |
| 325         | +++            | +++                | ++                | +               | +              | +               |
| 326         | +              | N.D.               | N.D.              | N.D.            | N.D.           | N.D.            |
| 327         | ++             | N.D.               | N.D.              | N.D.            | N.D.           | N.D.            |
| 328         | +              | N.D.               | N.D.              | N.D.            | N.D.           | N.D.            |
| 329         | ++             | ++                 | +                 | +               | +              | +               |
| 330         | +              | N.D.               | N.D.              | N.D.            | N.D.           | N.D.            |
| 331         | +              | N.D.               | N.D.              | N.D.            | N.D.           | N.D.            |
| 332         | ++             | ++                 | +                 | +               | +              | +               |
| 333         | ++             | +                  | +                 | N.D.            | N.D.           | N.D.            |
| 334         | +              | N.D.               | N.D.              | N.D.            | N.D.           | N.D.            |
| 335         | ++             | +                  | +                 | +               | +              | +               |
| 336         | +              | N.D.               | N.D.              | N.D.            | N.D.           | N.D.            |
| 337         | +              | N.D.               | N.D.              | N.D.            | N.D.           | N.D.            |
| 338         | +              | N.D.               | N.D.              | N.D.            | N.D.           | N.D.            |
| 339         | +              | N.D.               | N.D.              | N.D.            | N.D.           | N.D.            |
| 340         | +              | N.D.               | N.D.              | N.D.            | N.D.           | N.D.            |
| 341         | ++             | ++                 | ++                | N.D.            | N.D.           | N.D.            |
| 342         | +              | N.D.               | N.D.              | N.D.            | N.D.           | N.D.            |
| 343         | +              | N.D.               | N.D.              | N.D.            | N.D.           | N.D.            |
| 344         | +              | N.D.               | N.D.              | N.D.            | N.D.           | N.D.            |
| 345         | +              | N.D.               | N.D.              | N.D.            | N.D.           | N.D.            |
| 346         | ++             | +                  | +                 | +               | +              | +               |
| 347         | +              | N.D.               | N.D.              | N.D.            | N.D.           | N.D.            |
| 348         | +              | N.D.               | N.D.              | N.D.            | N.D.           | N.D.            |
| 349         | +              | ++                 | +                 | +               | +              | +               |
| 350         | +              | ++                 | +                 | N.D.            | N.D.           | N.D.            |

| <i>forb.</i><br><i>nr.</i> | <i>kinase</i><br><i>IC50</i> | <i>celle-IL-1</i><br><i>IC50</i> | <i>celle-TNF</i><br><i>IC50</i> | <i>WB IL-1</i><br><i>IC50</i> | <i>WB TNF</i><br><i>IC50</i> | <i>WB IL-6</i><br><i>IC50</i> |
|----------------------------|------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| <b>351</b>                 | +                            | +                                | +                               | N.D.                          | N.D.                         | N.D.                          |
| <b>352</b>                 | +                            | +                                | N.D.                            | N.D.                          | N.D.                         | N.D.                          |
| <b>353</b>                 | ++                           | +                                | +                               | N.D.                          | N.D.                         | N.D.                          |
| <b>354</b>                 | +                            | N.D.                             | N.D.                            | N.D.                          | N.D.                         | N.D.                          |
| <b>355</b>                 | +                            | N.D.                             | N.D.                            | N.D.                          | N.D.                         | N.D.                          |
| <b>356</b>                 | +                            | N.D.                             | N.D.                            | N.D.                          | N.D.                         | N.D.                          |
| <b>357</b>                 | +                            | N.D.                             | N.D.                            | N.D.                          | N.D.                         | N.D.                          |
| <b>358</b>                 | ++                           | +                                | +                               | N.D.                          | N.D.                         | N.D.                          |
| <b>359</b>                 | +                            | N.D.                             | N.D.                            | N.D.                          | N.D.                         | N.D.                          |
| <b>360</b>                 | +                            | N.D.                             | N.D.                            | N.D.                          | N.D.                         | N.D.                          |
| <b>361</b>                 | ++                           | ++                               | +                               | N.D.                          | N.D.                         | N.D.                          |
| <b>362</b>                 | +++                          | ++                               | ++                              | +                             | +                            | +                             |
| <b>363</b>                 | +++                          | +++                              | ++                              | +                             | +                            | +                             |
| <b>364</b>                 | +++                          | +++                              | ++                              | +                             | +                            | +                             |
| <b>365</b>                 | N.D.                         | N.D.                             | N.D.                            | N.D.                          | N.D.                         | N.D.                          |
| <b>366</b>                 | +                            | N.D.                             | N.D.                            | N.D.                          | N.D.                         | N.D.                          |
| <b>367</b>                 | N.D.                         | N.D.                             | N.D.                            | N.D.                          | N.D.                         | N.D.                          |
| <b>368</b>                 | N.D.                         | N.D.                             | N.D.                            | N.D.                          | N.D.                         | N.D.                          |
| <b>369</b>                 | N.D.                         | N.D.                             | N.D.                            | N.D.                          | N.D.                         | N.D.                          |
| <b>370</b>                 | N.D.                         | N.D.                             | N.D.                            | N.D.                          | N.D.                         | N.D.                          |
| <b>371</b>                 | N.D.                         | N.D.                             | N.D.                            | N.D.                          | N.D.                         | N.D.                          |
| <b>372</b>                 | N.D.                         | N.D.                             | N.D.                            | N.D.                          | N.D.                         | N.D.                          |
| <b>373</b>                 | N.D.                         | N.D.                             | N.D.                            | N.D.                          | N.D.                         | N.D.                          |
| <b>374</b>                 | ++                           | N.D.                             | N.D.                            | N.D.                          | N.D.                         | N.D.                          |
| <b>375</b>                 | +++                          | N.D.                             | N.D.                            | N.D.                          | N.D.                         | N.D.                          |
| <b>376</b>                 | +++                          | N.D.                             | N.D.                            | N.D.                          | N.D.                         | N.D.                          |
| <b>377</b>                 | +++                          | N.D.                             | N.D.                            | N.D.                          | N.D.                         | N.D.                          |
| <b>378</b>                 | +++                          | N.D.                             | N.D.                            | N.D.                          | N.D.                         | N.D.                          |
| <b>379</b>                 | +++                          | N.D.                             | N.D.                            | N.D.                          | N.D.                         | N.D.                          |

| <i>forb.<br/>nr</i> | <i>kinase<br/>IC50</i> | <i>celle-IL-1<br/>IC50</i> | <i>celle-TNF<br/>IC50</i> | <i>WB IL-1<br/>IC50</i> | <i>WB TNF<br/>IC50</i> | <i>WB IL-6<br/>IC50</i> |
|---------------------|------------------------|----------------------------|---------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|
| <b>380</b>          | ++                     | N.D.                       | N.D.                      | N.D.                    | N.D.                   | N.D.                    |
| <b>381</b>          | ++                     | N.D.                       | N.D.                      | N.D.                    | N.D.                   | N.D.                    |
| <b>382</b>          | +++                    | N.D.                       | N.D.                      | N.D.                    | N.D.                   | N.D.                    |
| <b>383</b>          | +++                    | N.D.                       | N.D.                      | N.D.                    | N.D.                   | N.D.                    |
| <b>384</b>          | ++                     | N.D.                       | N.D.                      | N.D.                    | N.D.                   | N.D.                    |
| <b>385</b>          | ++                     | N.D.                       | N.D.                      | N.D.                    | N.D.                   | N.D.                    |
| <b>386</b>          | +                      | N.D.                       | N.D.                      | N.D.                    | N.D.                   | N.D.                    |
| <b>387</b>          | +                      | N.D.                       | N.D.                      | N.D.                    | N.D.                   | N.D.                    |
| <b>388</b>          | +++                    | N.D.                       | N.D.                      | N.D.                    | N.D.                   | N.D.                    |
| <b>389</b>          | ++                     | N.D.                       | N.D.                      | N.D.                    | N.D.                   | N.D.                    |
| <b>390</b>          | +                      | N.D.                       | N.D.                      | N.D.                    | N.D.                   | N.D.                    |
| <b>391</b>          | ++                     | N.D.                       | N.D.                      | N.D.                    | N.D.                   | N.D.                    |
| <b>392</b>          | ++                     | N.D.                       | N.D.                      | N.D.                    | N.D.                   | N.D.                    |
| <b>393</b>          | ++                     | N.D.                       | N.D.                      | N.D.                    | N.D.                   | N.D.                    |
| <b>394</b>          | +++                    | N.D.                       | N.D.                      | N.D.                    | N.D.                   | N.D.                    |
| <b>395</b>          | +++                    | N.D.                       | N.D.                      | N.D.                    | N.D.                   | N.D.                    |
| <b>396</b>          | +++                    | N.D.                       | N.D.                      | N.D.                    | N.D.                   | N.D.                    |
| <b>397</b>          | +                      | N.D.                       | N.D.                      | N.D.                    | N.D.                   | N.D.                    |
| <b>398</b>          | N.D.                   | N.D.                       | N.D.                      | N.D.                    | N.D.                   | N.D.                    |
| <b>399</b>          | +++                    | N.D.                       | N.D.                      | N.D.                    | N.D.                   | N.D.                    |
| <b>1301</b>         | +++                    | N.D.                       | N.D.                      | N.D.                    | N.D.                   | N.D.                    |
| <b>401</b>          | +++                    | ++                         | ++                        | +                       | +                      | +                       |
| <b>402</b>          | +++                    | +++                        | +++                       | +                       | +                      | +                       |
| <b>403</b>          | +++                    | +++                        | +++                       | +                       | +                      | ++                      |
| <b>404</b>          | +++                    | +++                        | +++                       | +                       | +                      | +                       |
| <b>405</b>          | +++                    | +++                        | ++                        | N.D.                    | N.D.                   | N.D.                    |
| <b>406</b>          | ++                     | ++                         | +                         | N.D.                    | N.D.                   | N.D.                    |
| <b>407</b>          | ++                     | ++                         | +                         | N.D.                    | N.D.                   | N.D.                    |
| <b>408</b>          | +++                    | +++                        | ++                        | N.D.                    | N.D.                   | N.D.                    |

| forb.<br>nr. | kinase<br>IC50 | celle-IL-1<br>IC50 | celle-TNF<br>IC50 | WB IL-1<br>IC50 | WB TNF<br>IC50 | WB IL-6<br>IC50 |
|--------------|----------------|--------------------|-------------------|-----------------|----------------|-----------------|
| <b>409</b>   | +++            | +++                | +++               | +               | +              | ++              |
| <b>410</b>   | +++            | +++                | +++               | ++              | ++             | ++              |
| <b>411</b>   | +++            | +++                | +++               | +               | +              | +               |
| <b>412</b>   | N.D.           | N.D.               | N.D.              | N.D.            | N.D.           | N.D.            |

For kinase IC50-verdier betyr "+++" >0,1  $\mu$ M; "++" betyr mellom 0,1 og 1,0  $\mu$ M; og "+" betyr <1,0  $\mu$ M. For verdiene for cellulært IL-1 og TNF betyr "+++" >0,1  $\mu$ M; "++" betyr mellom 0,1 og 0,5  $\mu$ M og "+" betyr <0,5  $\mu$ M. For alle helblods ("WB")-assayverdier representerer "+++" >0,25  $\mu$ M; "++" betyr mellom 0,25 og 0,5  $\mu$ M, og "+" betyr <0,5  $\mu$ M. I alle assayer som angis i tabellen ovenfor, betyr "N.D." at verdien ikke ble bestemt.

Andre p38-inhibitorer ifølge foreliggende oppfinnelse vil også inhibere fosforylasjonen av EGF-receptorpeptid og produksjonen av IL-1, TNF og IL-6, samt IL-8 i LPS-stimulerte PBMC'er eller i fullblod.

#### D. Inhibering av IL-6- og IL-8-produksjonen i IL-1-stimulerte PBMC'er

15 Dette assay ble utført på PBMC'er på nøyaktig samme måte som beskrevet ovenfor, unntatt at 50  $\mu$ l av en IL-1 $\beta$ -arbeidsstamopløsning (2 ng/ml i cellekulturmedium) ble satt til assayet istedenfor (LPS-) arbeidsstamopløsningen.

20 Cellekultursupernatanter ble samlet på samme måte som beskrevet ovenfor, og analysert ved ELISA for å bestemme mengden av IL-6 (Endogen, nr. EH2-IL6) og IL-8 (Endogen, nr. EH2-IL8) i henhold til produsentens anvisninger. ELISA-dataen ble brukt for å generere doseresponskurver, utfra hvilke IC50-verdiene ble avledet.

Resultatene for p38-inhibitorforbindelse 6 vises i den følgende tabell 8:

Tabell 8

| Testet cytokin | IC <sub>50</sub> (μM) |
|----------------|-----------------------|
| <i>IL-6</i>    | 0,60                  |
| <i>IL-8</i>    | 0,85                  |

5 E. Inhibering av LPS-indusert prostaglandin endoperoksid syntase-2 (PGHS-2 eller COX-2)-induksjon i PBMC'er

Humane perifere mononukleære celler (PBMC'er) ble isolert fra buffy coats fra ferskt humant blod ved sentrifugering i en Vacutainer CPT (Becton & Dickinson). Vi plasserte 15 × 10<sup>6</sup> celler i en 6-brønners vevkulturskål som inneholdt RPMI 1640 supplementert med 10% føtalt bovint serum, 50 U/ml penicillin, 50 μg/ml streptomycin og 2 mM L-glutamin. Forbindelse 6 (ovenfor) ble satt til i de endelige konsentrasjoner 0,2, 2,0 og 20 μM i DMSO. Deretter satte vi til LPS til den endelige konsentrasjon 4 ng/ml for å indusere enzympresjon. Det endelige kulturvolum var 10 ml/brønn.

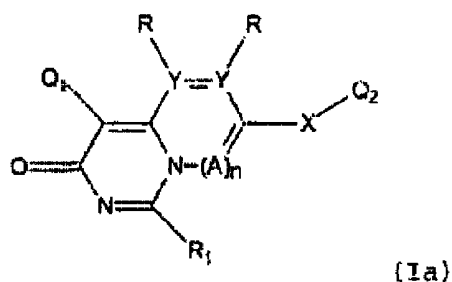
Etter inkubering over natten ved 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, ble cellene samlet ved skraping og påfølgende sentrifugering, deretter ble supernatanten fjernet og cellene ble vasket to ganger i iskald DPBS (Dulbeccos fosfatbufret saltvann, BioWhittaker). Cellene ble spaltet på is i 10 minutter i 50 μl kald lysisbuffer (20 mM Tris-HCl, pH 7,2; 150 mM NaCl; 1% Triton-X-100; 1% deoksykolinisyre; 0,1% SDS; 1 mM EDTA; 2% aprotinin (Sigma); 10 μg/ml pepstatin, 10 μg/ml leupeptin, 2 mM PMSF, 1 mM benzamidin, 1 mM DTT) som inneholdt 1 μl Benzonase (DNase fra Merck). Proteinkonsentrasjonen av hver prøve ble bestemt ved bruk av BCA-assayet (Pierce) og bovint serumalbumin som standard. Deretter ble proteinkonsentrasjonen av hver prøve justert til 1 mg/ml med kald lysisbuffer. Til 100 μl lysat satte man et likt volum 2×SDS

PAGE-ladebuffer, og prøven ble kokt i 5 minutter. Proteiner (30 mg/bane) ble størrelsesfraksjonert på 4-20% SDS PAGE-gradientgeler (Novex) og deretter overført til en nitro-cellulosemembran ved elektroforetiske midler i 2 timer ved 100 mA i Towbin-overføringsbuffer (25 mM Tris, 192 mM glycin) som inneholdt 20% metanol. Membranen ble forhåndsbehandlet i 1 time ved romtemperatur med blokkerende buffer (5% fettfri tørrmelk i DPBS supplementert med 0,1% Tween-20) og vasket tre ganger i DPBS/0,1% Tween-20. Membranen ble inkubert over natten ved 4°C med en 1:250-fortynning av monoklonalt anti-COX-2-antistoff (Transduction Laboratories) i blokkeringsbuffer. Etter 3 vaskinger i DPBS/0,1% Tween-20, ble membranen inkubert med en 1:1000-fortynning av pepperrotperoksidase-konjugert geite-antiserum mot muse-Ig (Amersham) i blokkeringsbuffer i 1 time ved romtemperatur. Deretter ble membran vasket igjen 3 ganger i DPBS/0,1% Tween-20, og et ECL-påvisningssystem ("Super-Signal" CL-HRP substratsystem, Pierce) ble brukt for å bestemme ekspresjonsnivået av COX-2.

Resultatene av det ovennevnte assay tyder på at forbindelse 6 inhiberer LPS-indusert PGHS-2-ekspresjon i PBMC'er.

## P a t e n t k r a v

## 1. Forbindelse med formel:



eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, hvori:

hver av  $Q_1$  og  $Q_2$  uavhengig velges fra et karbocyklisk eller  
 5 heterocyklisk ringsystem valgt fra fenyl, naftyl, pyridyl, tienyl, benzofuranyl, benzotienyl, indolyl, imidazolyl eller furanyl; hvor:

$Q_1$  er substituert med 1 til 4 substituenten, som hver uavhengig velges fra halo;  $C_1$ - $C_3$ -alkyl som valgfritt kan være  
 10 substituert med  $NR'_2$ ,  $OR'$ ,  $-CO_2R'$  eller  $CONR'_2$ ;  $O-(C_1-C_3)$ -alkyl som valgfritt kan være substituert med  $NR'_2$ ;  $OR'$ ,  $CO_2R'$  eller  $CONR'_2$ ;  $NR'_2$ ;  $CF_3$ ;  $NO_2$ ;  $CO_2R'$ ;  $CONR'$ ;  $C_1$ - $C_3$ -alkylendioksy;  $CN$ ;  $N=CH-N(R')_2$ ; morfolino- $C_1$ - $C_3$ -alkanoylamino; halo- $C_1$ - $C_3$ -alkanoylamino;  $C_1$ - $C_3$ -alkanoylamino; eller  
 15  $OH$ ;

$Q_2$  er valgfritt substituert med opptil 4 substituenten, som hver uavhengig velges fra halo;  $C_1$ - $C_3$  rettkjedet eller forgrenet alkyl som valgfritt kan være substituert med  
 20  $CONR'_2$ ,  $NR'_2$ ,  $OR'$ ,  $CO_2R'$ ,  $NHR^3$ ,  $R^3$  eller  $CONR'_2$ ;  $O-(C_1-C_3)$ -alkyl eventuelt substituert med  $NR'_2$ ;  $OR'$  eller  $CO_2R'$ ;  $NR'_2$ ;  $OCF_3$ ;  $CF_3$ ;  $NO_2$ ;  $CO_2R'$ ;  $CONHR'$ ;  $SR'$ ;  $CN$ ;  $CONR'_2$ ;  $CH=N-OH$ ;  $NHC(O)OR'$ ;  $NH_2C(O)NH_2$ ;  $NHC(=NH)(NH_2)$ ;  $C(O)R'$  eller  $OH$ ;

hvor  $R'$  velges fra hydrogen,  $(C_1-C_3)$ -alkyl valgfritt substituert med  $OH$ ,  $NH_2$  eller karboksy; eller fenyl;

$R^3$  velges fra piperazinyll; pyrrolidinyll; imidazolyl;  
morfolinyll eller fenyl;

X velges fra -S-, -C(O)- eller -CH(OH)-;

hvor hver R uavhengig velges fra hydrogen,  $-R^2$ ,  $-N(R^2)_2$   
5 eller  $-OR^2$ ;

$R^2$  velges fra hydrogen eller  $(C_1-C_3)$ alkyl;

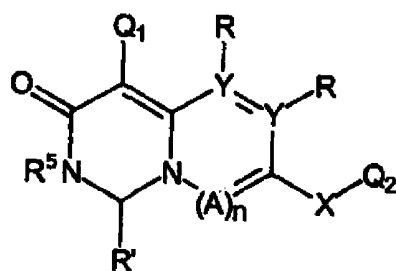
Y velges fra N eller C;

A, når den foreligger, velges fra N eller  $CR'$ ;

n er 1; og

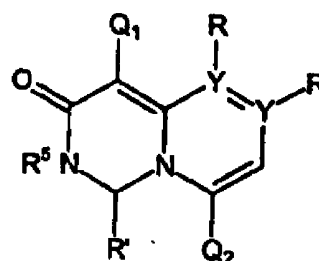
10  $R_1$  velges fra hydrogen,  $(C_1-C_3)$ alkyl, OH eller O- $(C_1-C_3)$ -alkyl.

2. Forbindelse med formel:



(Ic)

eller

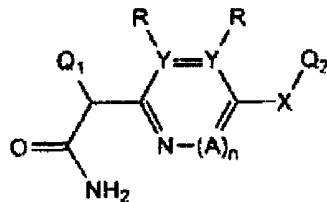


(Id)

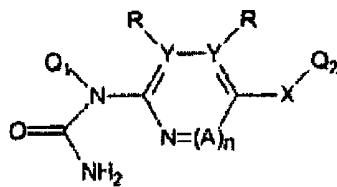
eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, hvor A,  $Q_1$ ,  
 $Q_2$ , R,  $R'$ , X, Y og n er definert på samme måte som ble  
15 beskrevet for forbindelsene med formel Ia; og

$R^5$  velges fra hydrogen eller  $-CR'_2OH$ .

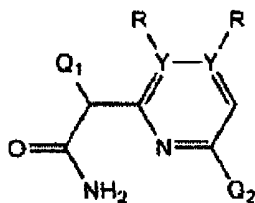
3. Forbindelse med formel:



(Ie)

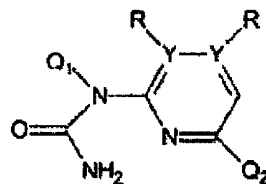


(If),



(Ig)

, eller

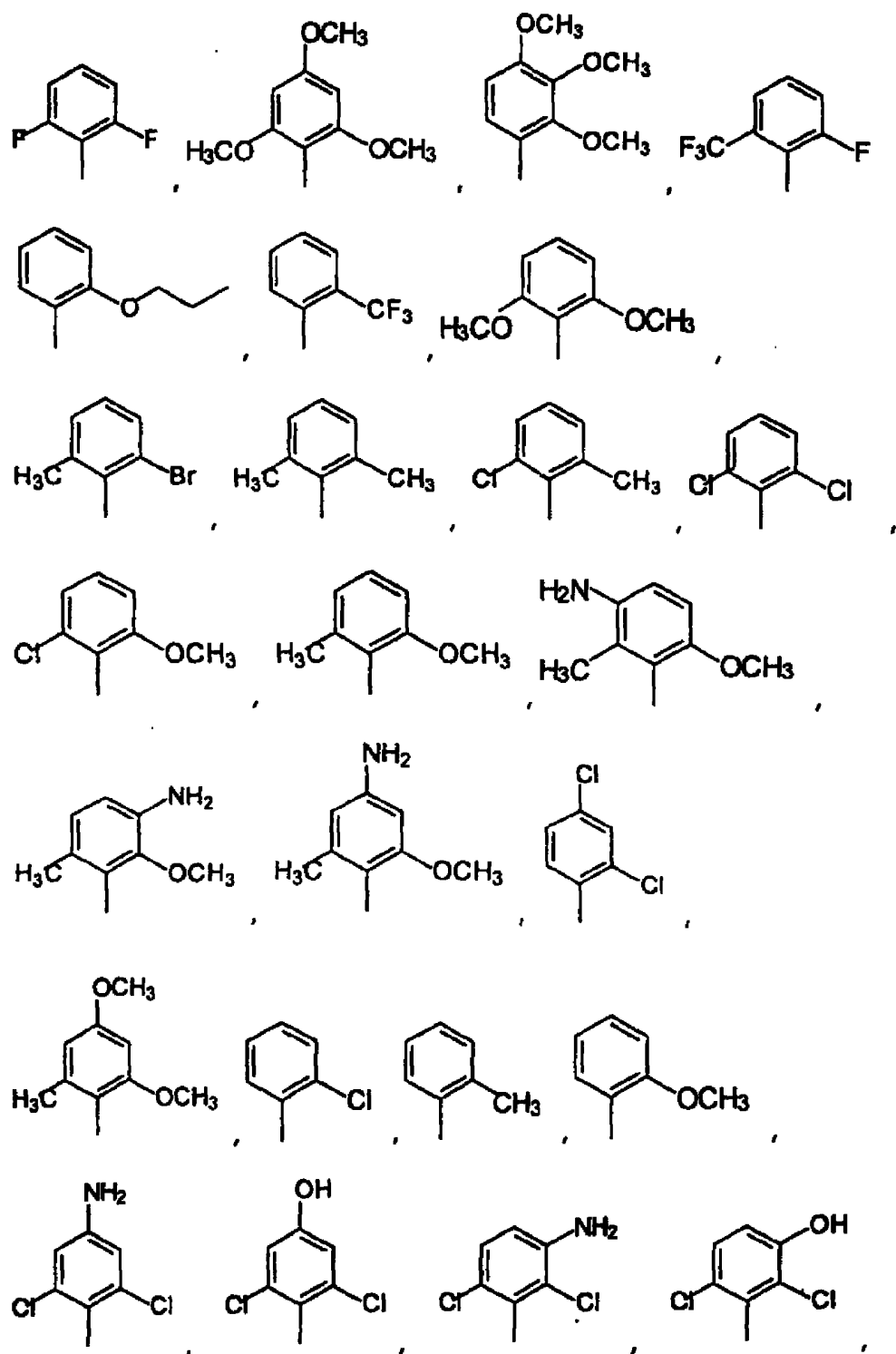


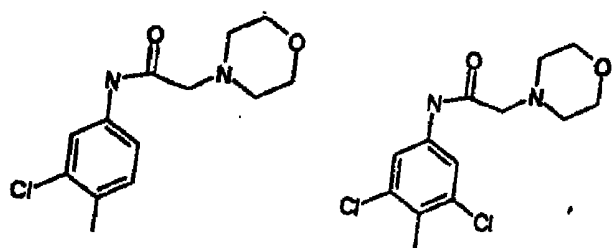
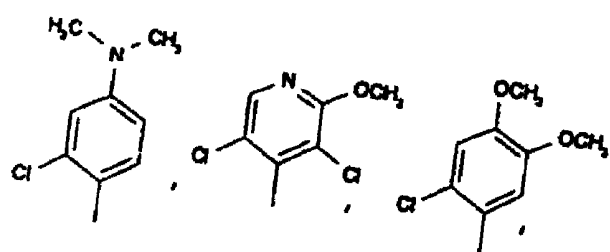
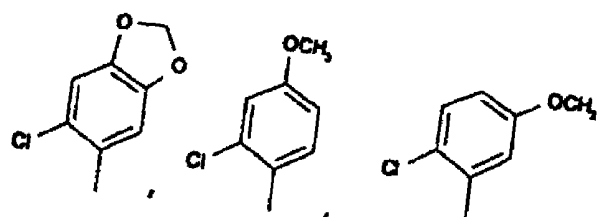
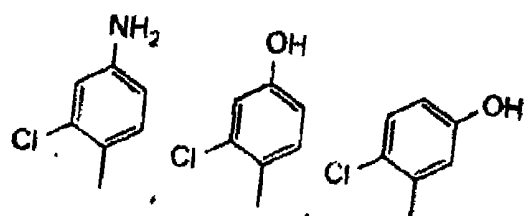
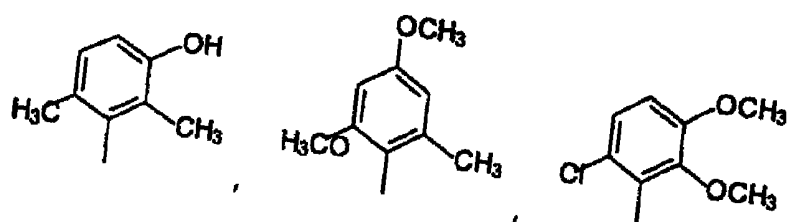
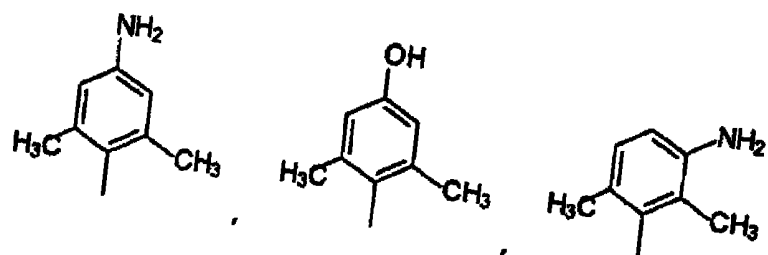
(Ih),

eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, hvor:

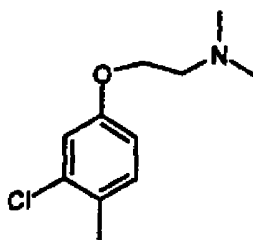
A, Q<sub>1</sub>, Q<sub>2</sub>, R, R', X, Y og n har betydningene som ble angitt i krav 1.

4. Forbindelse ifølge et av kravene 1-3, hvor Q<sub>1</sub> velges fra fenyl eller pyridyl som inneholder 1-3 substituentersom hver uavhengig velges fra klor, fluor, brom, -CH<sub>3</sub>, -OCH<sub>3</sub>, -OH, -CF<sub>3</sub>, -O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>, 3,4-metylendioksy, -N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -NH-C(O)CH<sub>2</sub>-morfolin eller -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, og hvor minst én av substituentene er i orto-posisjon.
5. Forbindelse ifølge krav 4, hvor Q<sub>1</sub> innholder minst to substituentersom begge er i orto-posisjon.
6. Forbindelse ifølge krav 4, hvor Q<sub>1</sub> velges fra:





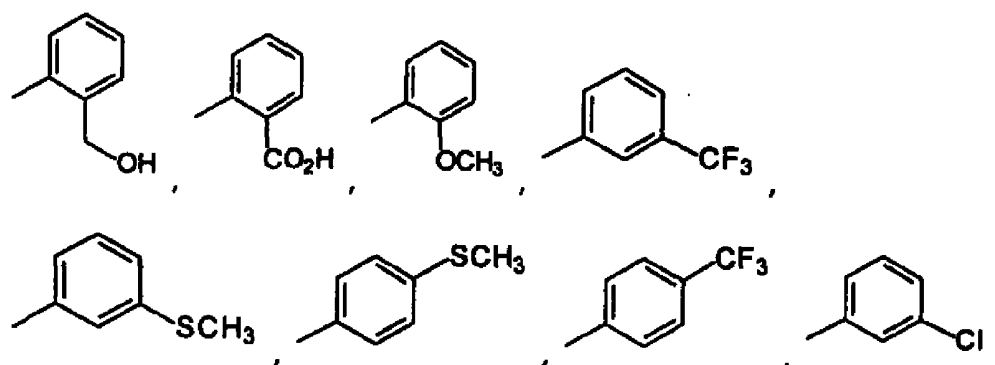
eller

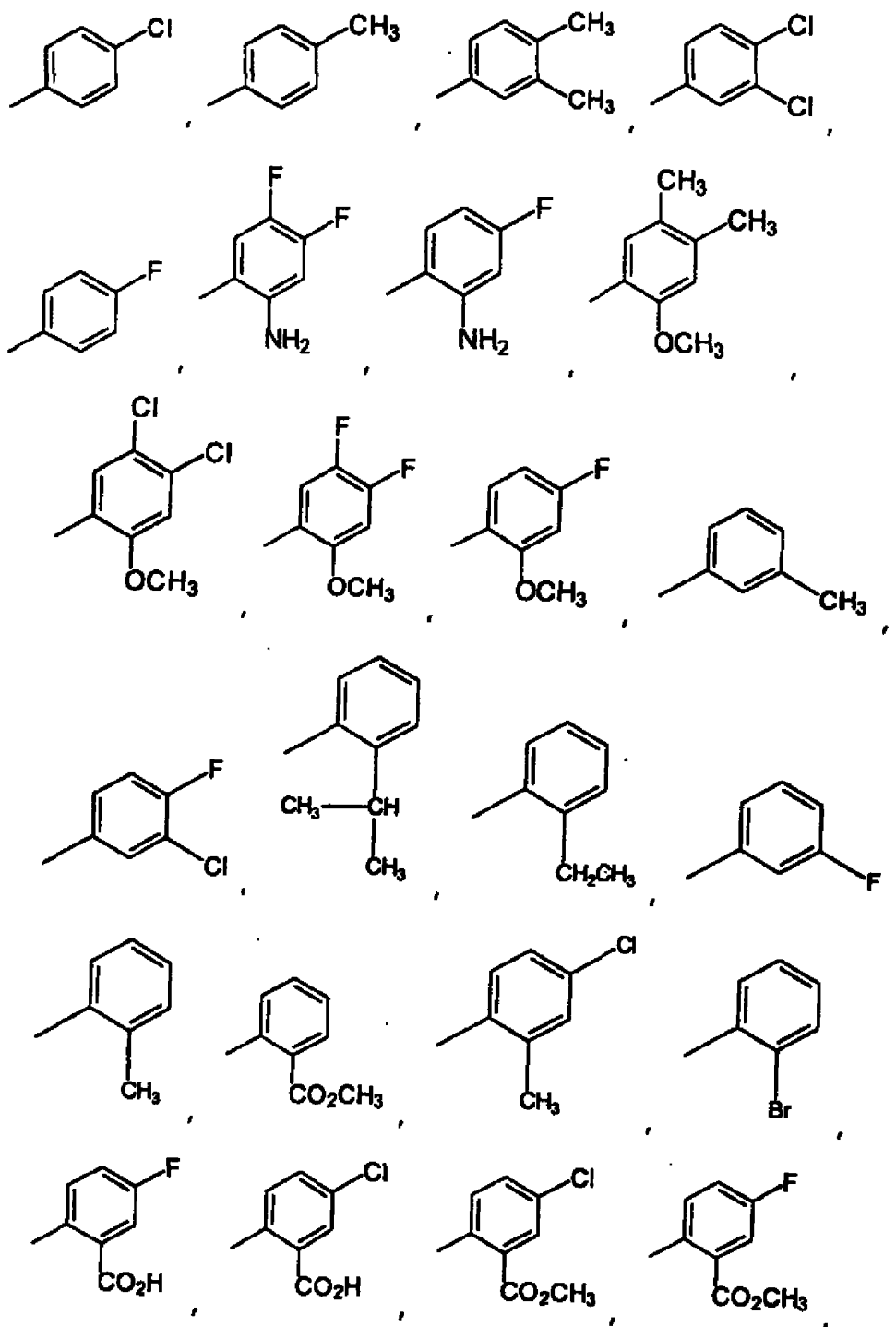


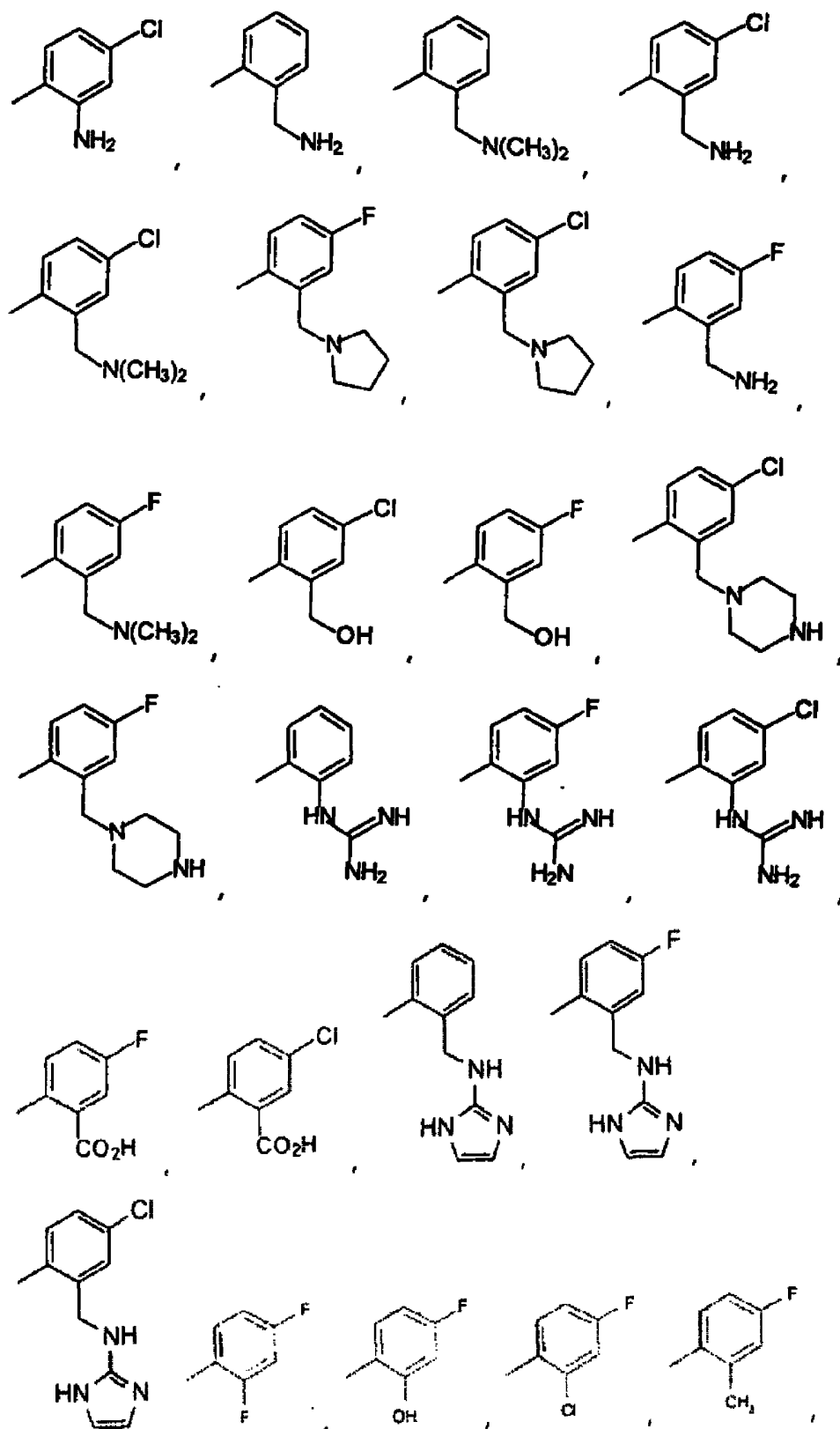
7. Forbindelse ifølge ethvert av kravene 1 til 3, hvor  $Q_1$  velges fra 2-fluor-6-trifluormetylfenyl, 2,6-difluorfenyl, 2,6-diklorfenyl, 2-klor-4-hydroksyfenyl, 2-klor-4-amino-  
 5 2,6-diklor-4-aminofenyl, 2,6-diklor-3-aminofenyl, 2,6-dimetyl-4-hydroksyfenyl, 2-metoksy-3,5-diklor-4-pyri-  
 dyl, 2-klor-4,5-metylendioksyfenyl eller 2-klor-4-(N-2-morfolinoacetamido)fenyl.

8. Forbindelse ifølge ethvert av kravene 1 til 3, hvor  $Q_2$  velges fra fenyl eller pyridyl, og hvor  $Q_2$  valgfrit inneholder opptil 3 substituenten, som hver uavhengig velges  
 10 fra klor, fluor, brom, metyl, etyl, isopropyl,  $-OCH_3$ ,  $-OH$ ,  $-NH_2$ ,  $-CF_3$ ,  $-OCF_3$ ,  $-SCH_3$ ,  $-OCH_3$ ,  $-C(O)OH$ ,  $-C(O)OCH_3$ ,  $-CH_2NH_2$ ,  $-N(CH_3)_2$ ,  $-CH_2$ -pyrrolidin og  $-CH_2OH$ .

9. Forbindelse ifølge krav 8, hvor  $Q_2$  velges fra:







usubstituert 2-pyridyl eller usubstituert fenyl.

10. Forbindelse ifølge ethvert av kravene 1 til 3, hvor  $Q_2$  velges fra fenyl, 2-isopropylfenyl, 3,4-dimetylfenyl, 2-etylphenyl, 3-fluorfenyl, 2-metylfenyl, 3-klor-4-fluorfenyl, 3-klorfenyl, 2-karbometoksyfenyl, 2-karboksyfenyl, 2-metyl-4-klorfenyl, 2-bromfenyl, 2-pyridyl, 2-metylenhydroksyfenyl, 4-fluorfenyl, 2-metyl-4-fluorfenyl, 2-klor-4-fluorfenyl, 2,4-difluorfenyl, 2-hydroksy-4-fluorfenyl eller 2-metylenhydroksy-4-fluorfenyl.
11. Forbindelse ifølge ethvert av kravene 1 til 3, hvor X velges fra -S- eller -C(O)-.
12. Forbindelse ifølge krav 11, hvor X betyr S.
13. Forbindelse ifølge ethvert av kravene 1 til 3, hvor A betyr N.
14. Forbindelse ifølge ethvert av kravene 1 til 3, hvor hver Y betyr C.
15. Forbindelse ifølge krav 14, hvor hver R forbundet med Y er uavhengig valgt fra hydrogen eller metyl.
16. Forbindelse ifølge krav 1, hvor forbindelsen velges fra hvilken som helst av forbindelsene 2 til 3 eller 5 til 53 som er avbildet i tabell 1.
17. Forbindelse ifølge krav 2, hvor forbindelsen velges fra hvilken som helst av forbindelsene 101 til 145 som er avbildet i tabell 2.
18. Forbindelse ifølge krav 3, hvor forbindelsen er en forbindelse med formel Ie og er valgt fra hvilken som helst av forbindelsene 201 eller 203 til 209 som er avbildet i tabell 3.

19. Forbindelse ifølge krav 3, hvor forbindelsen er en forbindelse med formel Ig og er valgt fra hvilken som helst av forbindelsene 202/301, 302 til 399 eller 1301 som er avbildet i tabell 4.

5 20. Forbindelse ifølge krav 3, hvor forbindelsen er en forbindelse med formel Ih og er valgt fra hvilken som helst av forbindelsene 401 til 412 som er avbildet i tabell 5.

21. Farmasøytisk sammensetning omfattende en mengde av en forbindelse ifølge ethvert av kravene 1 til 3 som virksomt  
10 inhiberer p38, og en farmasøytisk akseptabel bærer.

22. Anvendelse av en forbindelse ifølge krav 1 til 20 eller en sammensetning ifølge krav 21 ved fremstilling av et medikament som er egnet til behandling eller forebyg-  
gelse av inflammatoriske sykdommer, autoimmune sykdommer,  
15 destruktive benforstyrrelser, proliferative forstyrrelser, infeksjonssykdommer, neurodegenerative sykdommer, allergier, reperfusjon/iskemi ved slag, hjerteanfall, angiogene forstyrrelser, organhypoksi, vaskulær hyperplasi, hjertehypertrofi, trombin-indusert blodplateaggregasjon eller  
20 tilstander forbundet med prostaglandin endoperoksidase syntase-2.

23. Anvendelse ifølge krav 22, hvor medikamentet skal brukes for å behandle eller forebygge en inflamatorisk sykdom valgt fra akutt pankreatitt, kronisk pankreatitt, asthma,  
25 allergier eller åndenødssyndrom hos voksne.

24. Anvendelse ifølge krav 22, hvor medikamentet skal brukes for å behandle eller forebygge en autoimmun sykdom valgt fra glomerulonefritt, rheumatoid artritt, systemisk lupus erythematos, skleroderma, kronisk thyroidditt,  
30 Graves' sykdom, autoimmun gastritt, diabetes, autoimmun hemolytisk anemi, autoimmun neutropeni, trombocytopenia, atopisk dermatitt, kronisk aktiv hepatitt, myasthenia gra-

vis, multippel sklerose, inflammatorisk tarmsykdom, ulcerativ kolitt, Crohn's sykdom, psoriasis eller "graft-vs.-host-disease".

25. Anvendelse ifølge krav 22, hvor medikamentet skal brukes for å behandle eller forebygge en destruktiv benforstyrrelse valgt fra osteoartritt, osteoporose eller multippel myeloma-relatert benforstyrrelse.

26. Anvendelse ifølge krav 22, hvor medikamentet skal brukes for å behandle eller forebygge en proliferativ sykdom valgt fra akutt myelogen leukemi, kronisk myelogen leukemi, metastatisk melanom, Kaposi sarkoma eller multippelt myeloma.

27. Anvendelse ifølge krav 22, hvor medikamentet skal brukes for å behandle eller forebygge en infeksjonssykdom valgt fra sepsis, septisk sjokk eller Shigellose.

28. Anvendelse ifølge krav 22, hvor medikamentet skal brukes for å behandle eller forebygge en viral sykdom valgt fra akutt hepatittinfeksjon, HIV-infeksjon eller CMV-retitt.

29. Anvendelse ifølge krav 22, hvor medikamentet skal brukes for å behandle eller forebygge en neurodegenerativ sykdom valgt fra Alzheimers sykdom, Parkinsons sykdom, cerebral iskemi eller neurodegenerativ sykdom forårsaket av traumatisk skade.

30. Anvendelse ifølge krav 22, hvor medikamentet skal brukes for å behandle eller forebygge iskemi/reperfusjon ved slag eller myokardial iskemi, renal iskemi, hjerteanfall, organhypoksi eller trombin-indusert blodplateaggregasjon.

31. Anvendelse ifølge krav 22, hvor medikamentet skal brukes for å behandle eller forebygge en tilstand forbundet

med prostaglandin endoperoksid syntase-2 valgt fra ødem, feber, analgesia eller smerte.

32. Anvendelse ifølge krav 31, hvor smerten velges fra neuromuskulær smerte, hodepine, kreftsmerte, tannpine eller  
5 artrittsmerter.

33. Anvendelse ifølge krav 22, hvor medikamentet skal brukes for å behandle eller forebygge en angiogen forstyrrelse valgt fra faste svulster, okulær neovaskulisasjon eller infantile hemangiomaer.