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

(21) **PI0618939-3 A2**

BRPI0618939A2

(22) Data de Depósito: 22/11/2006
(43) Data da Publicação: 13/09/2011
(RPI 2123)

(51) Int.Cl.:
C07D 495/04
A61K 31/4365
A61P 29/00

(54) Título: MÉTODO PARA MODULAÇÃO DE SISTEMA DE PROTEÍNA QUINASE ATIVADA POR ESTRESSE

(30) Prioridade Unionista: 23/11/2005 US 60/739.315, 21/02/2006 US 60/775.823, 20/04/2006 US 60/793.526, 23/11/2005 US 60/739.315, 20/04/2006 US 60/793.526, 21/02/2006 US 60/775.823

(73) Titular(es): Intermune, INC.

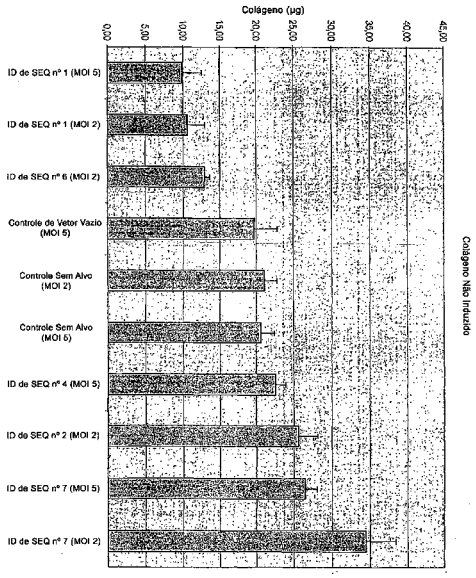
(72) Inventor(es): Karl Kossen, Scott D. Seiwert, Vladimir Serebryany

(74) Procurador(es): FLÁVIA SALIM LOPES

(86) Pedido Internacional: PCT US2006045287 de 22/11/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/062167de 31/05/2007

(57) Resumo: MÉTODO PARA MODULAÇÃO DE SISTEMA DE PROTEINA QUINASE ATIVADA POR ESTRESSE Foi recentemente descoberto que um efeito terapêutico alto no tratamento de várias doenças associadas com atividade aumentada da quinase p38 pode ser alcançado utilizando-se um potente composto inibidor da quinase p38? que também possua atividade inibidora contra a p38?. Além disso, descobriu-se que a redução das atividades tanto da quinase p38? quanto da quinase p38? sem reduzir a atividade de uma quinase p38? a um grau em que efeitos colaterais indesejados são observados sob administração a um indivíduo possuindo uma doença associada com atividade aumentada da quinase p38 é alcançável pela modificação dos inibidores dap38? de forma que a modificação gere atividade inibidora contra a p38?. São descritos compostos com atividade contra a p38? E p38?. São divulgados métodos de uso dos compostos e composições descritos para modular um sistema de proteína quinada ativada por estresse (SAPK) com um composto ativo, onde o composto ativo exibe inibição das MAPKs p38? e p38?. São também divulgados métodos para identificação de compostos que inibem as MAPKs p38? e p38? e que podem modular um sistema de proteína quinase ativada por estresse (SAPK)



MÉTODO PARA MODULAÇÃO DE SISTEMA DE PROTEÍNA QUINASE ATIVADA POR ESTRESSE

Campo da Invenção

Esta invenção relaciona-se a compostos e métodos úteis no tratamento de várias condições fibróticas, incluindo aquelas associadas com atividade aumentada da quinase p38.

Fundamento da Invenção

Um grande número de condições crônicas e agudas foi reconhecido por estar associado com a perturbação da resposta inflamatória. Acredita-se que numerosas citoquinas participam nesta resposta, incluindo IL-1, IL-6, IL-8 e TNF-α. Parece que a atividade destes citoquinas na regulação da inflamação pode estar associada com a ativação de uma enzima na via de sinalização da célula, um elemento da família da MAP quinase, geralmente conhecida como p38 e também conhecida como SAPK, CSBP e RK.

Vários inibidores da p38, tais como NPC 31169, SB239063, SB203580, Fralda (10)-167653, e pirfenidona foram testados *in vitro* e/ou *in vivo* e foi descoberto que eles são efetivos para modular as respostas inflamatórias.

Continua havendo uma necessidade por Fármacos seguros e efetivos para tratar várias condições inflamatórias tais como fibrose pulmonar inflamatória.

Sumário da Invenção

Em uma modalidade, é fornecido um método para modular um sistema de proteína quinase ativada por estresse (SAPK), compreendendo contatar um composto com uma proteína quinase p38 ativada por mitógeno (MAPK),

onde o composto exibe um IC_{50} na faixa de cerca de 10 pM a cerca de 500 μM para inibição da p38γ; e

onde o composto exibe um IC_{50} para inibição da MAPK p38α que é pelo menos duas vezes, cinco vezes ou dez vezes maior que o IC_{50} para inibição da MAPK p38γ.

Em uma outra modalidade, é fornecido um método para modular um sistema de proteína quinase ativada por estresse (SAPK), compreendendo contatar um composto com uma proteína quinase p38 ativada por mitógeno (MAPK),

onde o composto exibe um valor de IC_{50} na faixa de cerca de 10 pM a cerca de 500 μM para inibição da MAPK p38γ; e

onde o composto exibe um valor de IC_{50} na faixa de cerca de 10 pM a cerca de 1500 μM para inibição da MAPK p38α.

Em uma outra modalidade, é fornecido um método de tratamento ou prevenção de um estado de doença em um indivíduo, compreendendo:

identificar um indivíduo em risco de ou possuindo uma condição fibrótica;

administrar um composto ao indivíduo em uma quantidade efetiva para tratar ou prevenir a condição fibrótica;

onde o composto exibe um IC_{50} na faixa de cerca de 10 pM a cerca de 500 μM para inibição da p38γ; e

onde o composto exibe um IC_{50} para inibição da MAPK p38α que é pelo menos duas vezes, cinco vezes ou dez vezes maior que o IC_{50} para inibição da MAPK p38γ.

Em uma outra modalidade, é fornecido um método de identificação de um composto farmaceuticamente ativo, compreendendo:

fornecer uma biblioteca de compostos;

testar uma pluralidade de compostos da biblioteca para

inibição de uma MAPK p38α; e

testar uma pluralidade de compostos da biblioteca para inibição de uma MAPK p38γ; e

selecionar pelo menos um composto da pluralidade de compostos, onde o composto exibe um IC_{50} na faixa de cerca de 10 pM a cerca de 500 μM para inibição da MAPK p38γ; e

onde o composto exibe um IC_{50} para inibição da MAPK p38α que é pelo menos duas vezes, cinco vezes ou dez vezes maior que o IC_{50} para inibição da MAPK p38γ.

Em uma outra modalidade, é fornecido um método de identificação de um composto farmaceuticamente ativo, compreendendo:

fornecer uma biblioteca de compostos;

testar uma pluralidade de compostos da biblioteca para inibição de uma MAPK p38γ; e

selecionar pelo menos um composto da pluralidade de compostos, onde o composto exibe um IC_{50} na faixa de cerca de 10 pM a cerca de 500 μM para inibição da MAPK p38γ; e

onde o composto exibe um IC_{50} para inibição da MAPK p38α que é pelo menos duas vezes, cinco vezes ou dez vezes maior que o IC_{50} para inibição da MAPK p38γ.

Em uma outra modalidade, é fornecido um método de identificação de um composto farmaceuticamente ativo, compreendendo:

fornecer uma biblioteca de compostos;

testar uma pluralidade de compostos da biblioteca para inibição de uma MAPK p38α; e

selecionar pelo menos um composto da pluralidade de compostos, onde o composto exibe um IC_{50} na faixa de cerca de 10 pM a cerca de 1500 μM para inibição da MAPK p38α; e

onde o composto exibe um IC_{50} para inibição da MAPK p38α que é pelo menos duas vezes, cinco vezes ou dez vezes maior que o IC_{50} para inibição da MAPK p38γ.

Em uma modalidade, é fornecido um método para modular um sistema de proteína quinase ativada por estresse (SAPK), compreendendo contatar um composto com uma proteína quinase p38 ativada por mitógeno (MAPK),

onde o composto exibe um IC_{50} na faixa de cerca de 100 μM a cerca de 1000 μM para inibição da p38γ; e

onde o composto exibe um IC_{50} para inibição da MAPK p38α que é pelo menos duas vezes maior que o IC_{50} para inibição da MAPK p38γ.

Em uma outra modalidade, é fornecido um método de tratamento ou prevenção de um estado de doença em um indivíduo, compreendendo:

identificar um indivíduo em risco de ou possuindo uma condição fibrótica;

administrar um composto ao indivíduo em uma quantidade efetiva para tratar ou prevenir a condição fibrótica;

onde o composto exibe um IC_{50} na faixa de cerca de 100 μM a cerca de 1000 μM para inibição da p38γ; e

onde o composto exibe um IC_{50} para inibição da MAPK p38α que é pelo menos dez vezes maior que o IC_{50} para inibição da MAPK p38γ.

Em uma outra modalidade, é fornecido um método de identificação de um composto ativo farmaceuticamente, compreendendo:

fornecer uma biblioteca de compostos;

testar uma pluralidade de compostos da biblioteca para inibição de uma MAPK p38α; e

testar uma pluralidade de compostos da biblioteca para inibição de uma MAPK p38γ; e

selecionar pelo menos um composto da pluralidade de compostos, onde o composto exibe um IC_{50} na faixa de cerca de 10 pM a cerca de 5 μM para inibição da MAPK p38γ; e

onde o composto exibe um IC_{50} para inibição da MAPK p38α que é pelo menos dez vezes maior que o IC_{50} para inibição da MAPK p38γ.

Em uma outra modalidade, é fornecido um método de identificação de um composto farmaceuticamente ativo, compreendendo:

fornecer uma biblioteca de compostos;

testar uma pluralidade de compostos da biblioteca para inibição de uma MAPK p38γ; e

selecionar pelo menos um composto da pluralidade de compostos, onde o composto exibe um IC_{50} na faixa de cerca de 10 pM a cerca de 5 μM para inibição da MAPK p38γ; e

onde o composto exibe um IC_{50} para inibição da MAPK p38α que é pelo menos dez vezes maior que o IC_{50} para inibição da MAPK p38γ.

Em uma outra modalidade, é fornecido um método de identificação de um composto farmaceuticamente ativo, compreendendo:

fornecer uma biblioteca de compostos;

testar uma pluralidade de compostos da biblioteca para inibição de uma MAPK p38α; e

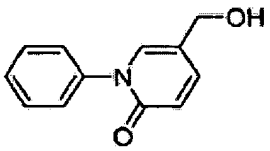
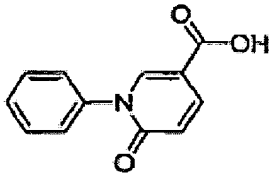
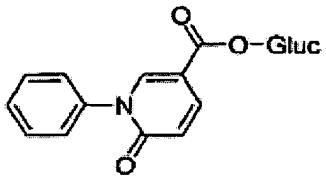
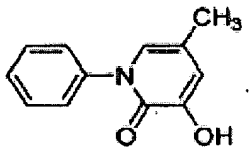
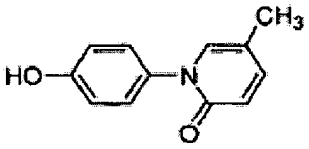
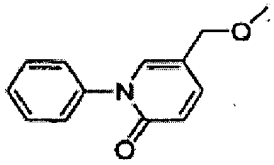
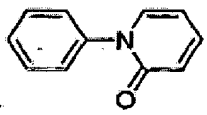
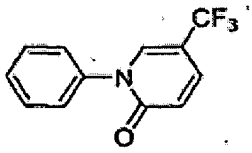
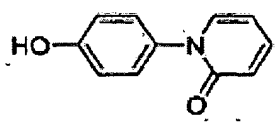
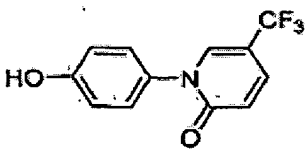
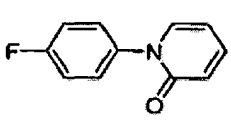
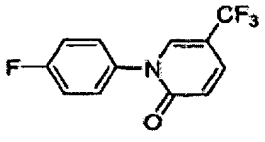
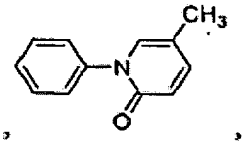
selecionar pelo menos um composto da pluralidade de compostos, onde o composto exibe um IC_{50} na faixa de cerca de 10 pM a cerca de 5 μM para inibição da MAPK p38γ; e

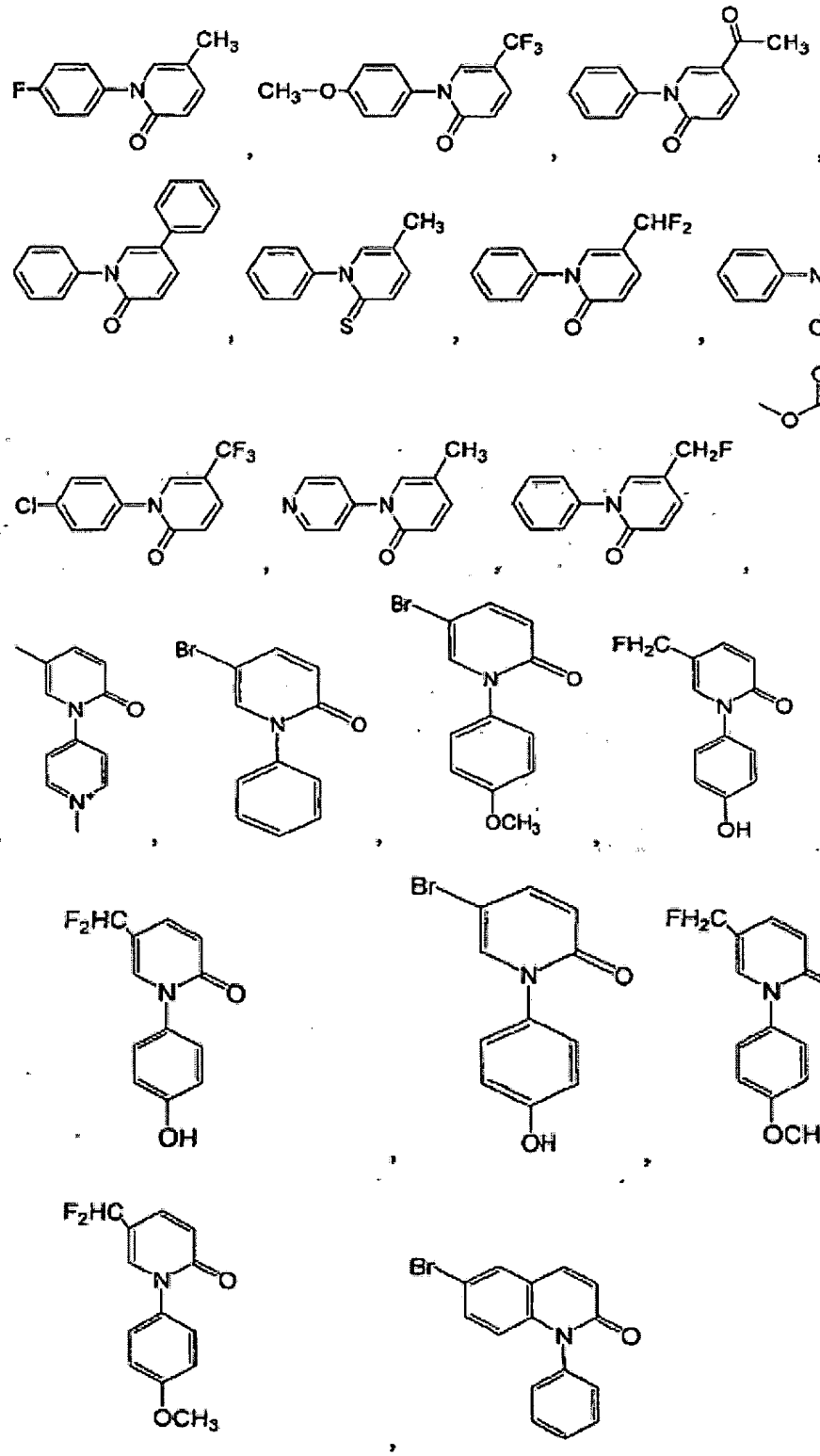
onde o composto exibe um IC_{50} para inibição da MAPK

p38α que é pelo menos dez vezes maior que o IC_{50} para inibição da MAPK p38γ.

Em algumas modalidades acima, o composto exibe um IC_{50} na faixa de cerca de 10 pM a cerca de 5 μM para inibição da MAPK p38γ. Em outras modalidades, o composto exibe um IC_{50} na faixa de cerca de 100 nM a cerca de 500 μM para inibição da MAPK p38γ.

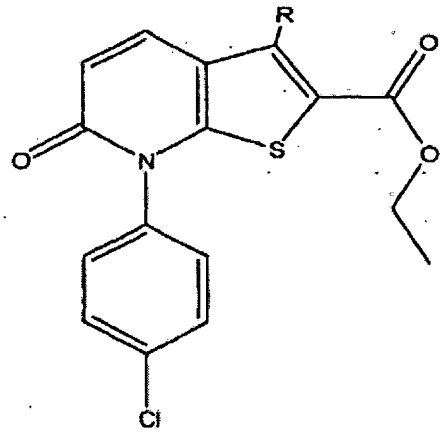
Em algumas modalidades acima, o composto não é selecionado a partir do grupo consistindo de:



e pirfenidona.

Em uma outra modalidade, é fornecido um composto possuindo a fórmula de Tipo I:



Tipo I;

onde

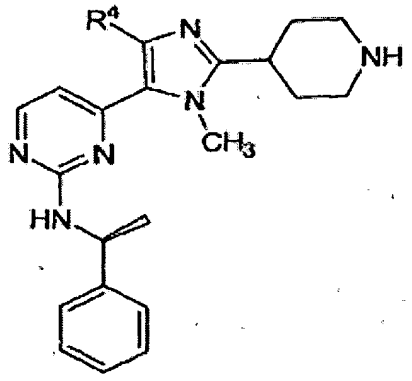
R é selecionado a partir do grupo consistindo de H, halo, ciano, nitro, hidroxi, alquil C_{1-6} opcionalmente substituído, cicloalquil C_{3-7} opcionalmente substituído, alquilcicloalquil C_{4-10} opcionalmente substituído, alquenil C_{2-6} opcionalmente substituído, alcoxi C_{1-6} opcionalmente substituído, aril C_6 ou C_{10} opcionalmente substituído, piridinil opcionalmente substituído, pirimidinil opcionalmente substituído, tienil opcionalmente substituído, furanil opcionalmente substituído, tiazolil opcionalmente substituído, oxazolil opcionalmente substituído, fenoxi opcionalmente substituído, tiofenoxi opcionalmente substituído, sulfonamido opcionalmente substituído, uréia opcionalmente substituída, tiouréia opcionalmente substituída, amido opcionalmente substituído, ceto opcionalmente substituído, carboxil opcionalmente substituído, carbamil opcionalmente substituído, sulfeto opcionalmente substituído, sulfóxido opcionalmente substituído, sulfona opcionalmente substituída, amino opcionalmente substituído, alcoxiamino opcionalmente substituído, alquiloxiheterociclil opcionalmente substituído, alquilamino opcionalmente substituído, alquilcarboxi opcionalmente substituído, carbonil

opcionalmente substituído, cicloalquil espirocíclico opcionalmente substituído, pirazinil opcionalmente substituído, piridazinil opcionalmente substituído, pirrolil opcionalmente substituído, tiofenil opcionalmente substituído, tiazolil opcionalmente substituído, oxazolil opcionalmente substituído, imidazolil opcionalmente substituído, isoxazolil opcionalmente substituído, pirazolil opcionalmente substituído, isotiazolil opcionalmente substituído, naftil opcionalmente substituído, quinolinil opcionalmente substituído, isoquinolinil opcionalmente substituído, quinoxalinil opcionalmente substituído, benzotiazolil opcionalmente substituído, benzotiofenil opcionalmente substituído, benzofuranil opcionalmente substituído, indolil opcionalmente substituído e benzimidazolil opcionalmente substituído;

ou um sal, éster, solvato ou pró-Fármaco do composto farmaceuticamente aceitáveis.

Em uma modalidade, o composto do Tipo I exibe um IC_{50} na faixa de cerca de 10 pM a cerca de 5 μM para inibição da p38γ.

Uma outra modalidade fornece um composto possuindo a fórmula de Tipo II:



Tipo II

onde

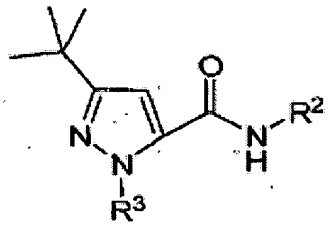
R^4 é selecionado a partir do grupo consistindo de H, halo, ciano, nitro, hidroxi, alquil C_{1-6} opcionalmente substituído, cicloalquil C_{3-7} opcionalmente substituído, alquilcicloalquil C_{4-10} opcionalmente substituído, alquenil C_{2-6} opcionalmente substituído, alcoxi C_{1-6} opcionalmente substituído, aril C_6 ou C_{10} opcionalmente substituído, piridinil opcionalmente substituído, pirimidinil opcionalmente substituído, tienil opcionalmente substituído, furanil opcionalmente substituído, tiazolil opcionalmente substituído, oxazolil opcionalmente substituído, fenoxi opcionalmente substituído, tiofenoxi opcionalmente substituído, sulfonamido opcionalmente substituído, uréia opcionalmente substituída, tiouréia opcionalmente substituída, amido opcionalmente substituído, ceto opcionalmente substituído, carboxil opcionalmente substituído, carbamil opcionalmente substituído, sulfeto opcionalmente substituído, sulfóxido opcionalmente substituído, sulfona opcionalmente substituída, amino opcionalmente substituído, alcoxiamino opcionalmente substituído, alquiloxiheterociclil opcionalmente substituído, alquilamino opcionalmente substituído, alquilcarboxi opcionalmente substituído, carbonil opcionalmente substituído, cicloalquil espirocíclico opcionalmente substituído, pirazinil opcionalmente substituído, piridazinil opcionalmente substituído, pirrolil opcionalmente substituído, tiofenil opcionalmente substituído, tiazolil opcionalmente substituído, oxazolil opcionalmente substituído, imidazolil opcionalmente substituído, isoxazolil opcionalmente substituído,

pirazolil opcionalmente substituído, isotiazolil opcionalmente substituído, naftil opcionalmente substituído, quinolinil opcionalmente substituído, isoquinolinil opcionalmente substituído, quinoxalinil opcionalmente substituído, benzotiazolil opcionalmente substituído, benzotiofenil opcionalmente substituído, benzofuranil opcionalmente substituído, indolil opcionalmente substituído e benzimidazolil opcionalmente substituído;

ou um sal, éster, solvato ou pró-Fármaco do composto farmaceuticamente aceitáveis.

Em uma modalidade, o composto do Tipo II exibe um IC_{50} na faixa de cerca de 10 pM a cerca de 5 μM para inibição da p38γ.

Em uma outra modalidade, é fornecido um composto possuindo a fórmula de Tipo III:



Tipo III;

onde

R^2 é selecionado a partir do grupo consistindo de H, halo, ciano, nitro, hidroxi, alquil C_{1-6} opcionalmente substituído, cicloalquil C_{3-7} opcionalmente substituído, alquilcicloalquil C_{4-10} opcionalmente substituído, alquenil C_{2-6} opcionalmente substituído, alcoxi C_{1-6} opcionalmente substituído, aril C_6 ou C_{10} opcionalmente substituído, piridinil opcionalmente substituído, pirimidinil opcionalmente substituído, tienil opcionalmente substituído, furanil opcionalmente substituído, tiazolil

opcionalmente substituído, oxazolil opcionalmente substituído, fenoxi opcionalmente substituído, tiofenoxi opcionalmente substituído, sulfonamido opcionalmente substituído, uréia opcionalmente substituída, tiouréia opcionalmente substituída, amido opcionalmente substituído, ceto opcionalmente substituído, carboxil opcionalmente substituído, carbamil opcionalmente substituído, sulfeto opcionalmente substituído, sulfóxido opcionalmente substituído, sulfona opcionalmente substituída, amino opcionalmente substituído, alcoxiamino opcionalmente substituído, alquiloxiheterociclil opcionalmente substituído, alquilamino opcionalmente substituído, alquilcarboxi opcionalmente substituído, carbonil opcionalmente substituído, cicloalquil espirocíclico opcionalmente substituído, pirazinil opcionalmente substituído, piridazinil opcionalmente substituído, pirrolil opcionalmente substituído, tiofenil opcionalmente substituído, tiazolil opcionalmente substituído, oxazolil opcionalmente substituído, imidazolil opcionalmente substituído, isoxazolil opcionalmente substituído, pirazolil opcionalmente substituído, isotiazolil opcionalmente substituído, naftil opcionalmente substituído, quinolinil opcionalmente substituído, isoquinolinil opcionalmente substituído, quinoxalinil opcionalmente substituído, benzotiazolil opcionalmente substituído, benzotiofenil opcionalmente substituído, benzofuranil opcionalmente substituído, indolil opcionalmente substituído e benzimidazolil opcionalmente substituído;

R^3 é selecionado a partir do grupo consistindo de H,

halo, ciano, nitro, hidroxi, alquil C_{1-6} opcionalmente substituído, cicloalquil C_{3-7} opcionalmente substituído, alquilcicloalquil C_{4-10} opcionalmente substituído, alquenil C_{2-6} opcionalmente substituído, alcoxi C_{1-6} opcionalmente substituído, aril C_6 ou C_{10} opcionalmente substituído, piridinil opcionalmente substituído, pirimidinil opcionalmente substituído, tienil opcionalmente substituído, furanil opcionalmente substituído, tiazolil opcionalmente substituído, oxazolil opcionalmente substituído, fenoxi opcionalmente substituído, tiofenoxi opcionalmente substituído, sulfonamido opcionalmente substituído, uréia opcionalmente substituída, tiouréia opcionalmente substituída, amido opcionalmente substituído, ceto opcionalmente substituído, carboxil opcionalmente substituído, carbamil opcionalmente substituído, sulfeto opcionalmente substituído, sulfóxido opcionalmente substituído, sulfona opcionalmente substituída, amino opcionalmente substituído, alcoxiamino opcionalmente substituído, alquiloxiheterociclil opcionalmente substituído, alquilamino opcionalmente substituído, alquilcarboxi opcionalmente substituído, carbonil opcionalmente substituído, cicloalquil espirocíclico opcionalmente substituído, pirazinil opcionalmente substituído, piridazinil opcionalmente substituído, pirrolil opcionalmente substituído, tiofenil opcionalmente substituído, tiazolil opcionalmente substituído, oxazolil opcionalmente substituído, imidazolil opcionalmente substituído, isoxazolil opcionalmente substituído, pirazolil opcionalmente substituído, isotiazolil opcionalmente substituído, naftil opcionalmente

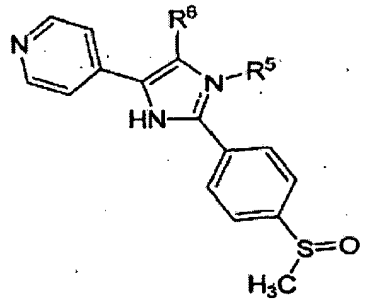
substituído, quinolinil opcionalmente substituído, isoquinolinil opcionalmente substituído, quinoxalinil opcionalmente substituído, benzotiazolil opcionalmente substituído, benzotiofenil opcionalmente substituído, benzofuranil opcionalmente substituído, indolil opcionalmente substituído e benzimidazolil opcionalmente substituído;

ou um sal, éster, solvato ou pró-Fármaco do composto farmaceuticamente aceitáveis.

Em uma modalidade, o composto do Tipo III exibe um IC_{50} na faixa de cerca de 10 pM a cerca de 5 μM para inibição da p38γ.

Em uma modalidade, o composto do Tipo III não é 1-(5-terc-butil-2-p-tolil-2H-pirazol-3-il)-3-[4-(2-morfolin-4-il-etoxi)naftalen-1-il]uréia (BIRB 796).

Uma outra modalidade fornece um composto possuindo a fórmula de Tipo IV:



Tipo IV

onde

R^5 e R^6 são, cada um, individualmente, selecionados a partir do grupo consistindo de H, halo, ciano, nitro, hidroxi, alquil C_{1-6} opcionalmente substituído, cicloalquil C_{3-7} opcionalmente substituído, alquilcicloalquil C_{4-10} opcionalmente substituído, alquenil C_{2-6} opcionalmente substituído, alcoxi C_{1-6} opcionalmente substituído, aril C_6 ou C_{10} opcionalmente substituído, piridinil opcionalmente

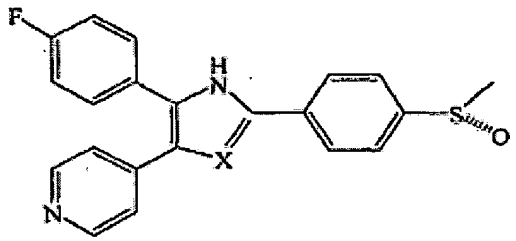
substituído, pirimidinil opcionalmente substituído, tienil opcionalmente substituído, furanil opcionalmente substituído, tiazolil opcionalmente substituído, oxazolil opcionalmente substituído, fenoxi opcionalmente substituído, tiofenoxi opcionalmente substituído, sulfonamido opcionalmente substituído, uréia opcionalmente substituída, tiouréia opcionalmente substituída, amido opcionalmente substituído, ceto opcionalmente substituído, carboxil opcionalmente substituído, carbamil opcionalmente substituído, sulfeto opcionalmente substituído, sulfóxido opcionalmente substituído, sulfona opcionalmente substituída, amino opcionalmente substituído, alcoxiamino opcionalmente substituído, alquiloxiheterociclil opcionalmente substituído, alquilamino opcionalmente substituído, alquilcarboxi opcionalmente substituído, carbonil opcionalmente substituído, cicloalquil espirocíclico opcionalmente substituído, pirazinil opcionalmente substituído, piridazinil opcionalmente substituído, pirrolil opcionalmente substituído, tiofenil opcionalmente substituído, tiazolil opcionalmente substituído, oxazolil opcionalmente substituído, imidazolil opcionalmente substituído, isoxazolil opcionalmente substituído, pirazolil opcionalmente substituído, isotiazolil opcionalmente substituído, naftil opcionalmente substituído, quinolinil opcionalmente substituído, isoquinolinil opcionalmente substituído, quinoxalinil opcionalmente substituído, benzotiazolil opcionalmente substituído, benzotiofenil opcionalmente substituído, benzofuranil opcionalmente substituído, indolil opcionalmente substituído e benzimidazolil opcionalmente

substituído;

ou um sal, éster, solvato ou pró-Fármaco do composto farmaceuticamente aceitáveis.

Em uma modalidade, o composto do Tipo IV exibe um IC_{50} na faixa de cerca de 10 pM a cerca de 5 μM para inibição da p38γ.

Em uma modalidade, o composto do Tipo IV não é:



onde X é N.

Estas e outras modalidades são descritas em maiores detalhes abaixo.

Descrição dos Desenhos

A Figura 1 descreve o nível de colágeno em células não induzidas como uma função de diferentes partículas lentivirais, incluindo várias partículas lentivirais que codificam o shRNA, administradas às células.

A Figura 2 descreve o nível de colágeno em células induzidas com TGF-β como uma função de diferentes partículas lentivirais, incluindo várias partículas lentivirais que codificam o shRNA, administradas às células.

Descrição Detalhada das Modalidades Preferidas

Foi recentemente descoberto que um efeito terapêutico alto no tratamento de várias doenças associadas com atividade aumentada da quinase p38 pode ser alcançado utilizando-se um potente composto inibidor da quinase p38γ que também possua atividade inibidora contra a p38α. Além

disso, descobriu-se que a redução das atividades tanto da quinase p38γ quanto da quinase p38α sem reduzir a atividade de uma quinase p38α a um grau em que efeitos colaterais indesejados são observados sob administração a um indivíduo possuindo uma doença associada com atividade aumentada da quinase p38 é alcançável pela modificação dos inibidores da p38α de forma que a modificação gere atividade inibidora contra a p38γ.

Portanto, em uma modalidade é fornecido um método para modular um sistema de quinase ativada por estresse (SAPK) contatando-se um composto com uma proteína quinase p38 ativada por mitógeno (MAPK). Um composto preferido exibe um IC_{50} contra uma MAPK p38γ na faixa de cerca de 10 pM a cerca de 5 μM, preferivelmente de cerca de 50 pM a cerca de 1 μM para a inibição da MAPK p38γ, mais preferivelmente de cerca de 50 pM a cerca de 200 nM para a inibição da MAPK p38γ. O composto preferido também exibe um valor de IC_{50} contra a p38α que não é menor que duas vezes seu valor de IC_{50} contra a p38γ.

"Proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs)" são serina/treonina quinases de forma evolucionária conservadas envolvidas na regulação de muitos eventos celulares. Vários grupos de MAPK foram identificados em células mamíferas, incluindo quinase regulada por sinal extracelular (ERK), p38, e SAPK/JNK. Acredita-se que as MAPKs são ativadas por suas MAPK quinases específicas (MAPKKs): ERK por MEK1 e MEK2, p38 por MKK3 e MKK6, e SAPK/JNK por SEK1 (também conhecida como MKK4) e MKK7 (SEK2). Estas MAPKKs podem também ser ativadas por várias MAPKK quinases (MAPKKKs) tais como Raf, MLK, MEKK1, TAK1, e ASK1.

Acredita-se que a rede de MAPK envolva pelo menos doze serina-treonina quinases prolina-direcionadas, clonadas altamente conservadas que, quando ativadas por estresses celulares (estresse oxidativo, dano ao DNA, calor ou choque osmótico, irradiação ultravioleta, reperfusão isquêmica), agentes exógenos (anisomicina, arsenito de sódio, lipopolissacerídeo, LPS) ou citoquinas pró-inflamatórias, TNF-α e IL-1β podem fosforilar e ativar outras quinases ou proteínas nucleares de forma que os fatores de transcrição ou no citoplasma ou no núcleo (ver Figura 1 de Underwood e outros, 2001 *Prog Respir Res* 31:342-345).

MAPK p38

Conforme aqui usado, "MAPK p38" é um elemento da família da proteína quinase ativada por estresse, que inclui pelo menos quatro isoformas (α, β, γ, δ), muitas das quais são consideradas essenciais nos processos importantes à resposta inflamatória e remodelagem do tecido (Lee e outros, 2000 *Immunopharmacol.*, 47:185-201). As quinases predominantes em monócitos e macrófagos, p38α e p38β, parecem mais amplamente expressas comparadas à p38γ (músculo esquelético) ou p38δ (testículos, pâncreas, próstata, intestino delgado, e glândulas salivares, pituitária e adrenal). Vários substratos da MAP quinase p38 foram identificados incluindo outras quinases (MAPKAP K2/3, PRAK, MNK 1/2, MSK1/RLPK, RSK-B), fatores de transcrição (ATF2/6, fator 2 melhorador de miócito, fator-β de transcrição nuclear, CHOP/GADD153, Elk1 e SAP-1A1) e proteínas citosólicas (estatimina), muitos dos quais são importantes fisiologicamente.

Jiang, Y. e outros, 1996 J. *Biol. Chem.*, 271:17920-

17926 relatou a caracterização da p38β como uma proteína de 372 aminoácidos intimamente relacionada à p38α. Tanto a p38α quanto a p38β são ativadas pelas citoquinas proinflamatórias e estresse ambiental, a p38β é preferencialmente ativada pela MAP quinase quinase-6 (MKK6) e preferencialmente é ativada pelo fator 2 de transcrição. Kumar, S. e outros, 1997 *Biochem Biophys Res Comm* 235:533-538 e Stein, B. e outros, 1997 *J Biol Chem* 272:19509-19517 relatou uma segunda isoforma de p38β, p38β2, contendo 364 aminoácidos com 73% de identidade à p38α. Acredita-se que a p38β seja ativada pelas citoquinas pró-inflamatórias e estresse ambiental, embora a segunda isoforma de p38β relatada, a p38β2, pareça ser preferencialmente expressada no sistema nervoso central (CNS), músculo do coração e esquelético, comparada à expressão do tecido mais ubíqua da p38α. Além disso, acredita-se que o fator-2 de transcrição ativada (ATF-2) seja um substrato melhor para a p38β2 que para a p38α.

A identificação da p38γ foi relatada por Li, Z. e outros, 1996 *Biochem Biophys Res Comm* 228:334-340 e da p38δ por Wang, X. e outros, 1997 *J Biol. Chem* 272:23668-23674 e por Kumar, S. e outros, 1997 *Biochem Biophys Res Comm* 235:533-538. Estas duas isoformas de p38 (γ e δ) representam um subconjunto único da família de MAPK com base nos seus padrões de expressão de tecido, utilização de substrato, resposta ao estímulo direto e indireto, e susceptibilidade aos inibidores da quinase. Acredita-se que a p38α e β estão intimamente relacionadas, mas divergem de γ e δ, que são mais intimamente relacionadas entre si.

Tipicamente, a via MAP quinase p38 é diretamente ou

indiretamente ativado pelos receptores de superfície celular, tais como as tirosinas quinases receptoras, quimioquinas ou receptores acoplados à proteína G, que foram ativados por um ligante específico, por exemplo, citoquinas, quimioquinas ou lipopolissacarídeos (LPS) ligados a um receptor cognato. Subsequentemente, a MAP quinase p38 é ativada pela fosforilação em resíduos de treonina 180 e tirosina 182. Após a ativação, a MAP quinase p38 pode fosforilar outras proteínas intracelulares, incluindo as proteínas quinases, e pode ser translocada ao núcleo celular, onde ela fosforila e ativa os fatores de transcrição levando à expressão das citoquinas pró-inflamatórias e outras proteínas que contribuem à resposta inflamatória, adesão celular e degradação proteolítica. Por exemplo, em células de linhagem mielóide, tais como macrófagos e monócitos, tanto a IL-1β e TNF-α são transcritas em resposta à ativação da p38. A tradução e secreção subseqüentes destas e de outras citoquinas inicia uma resposta inflamatória local ou sistêmica no tecido adjacente e através da infiltração de leucócitos. Embora esta resposta seja uma parte normal das respostas fisiológicas ao estresse celular, o estresse celular agudo ou crônico leva à expressão em excesso, não regulada, ou em excesso e não regulada das citoquinas pró-inflamatórias. Isto, sucessivamente, leva ao dano do tecido, resultando muitas vezes em dor e debilitação.

Em macrófagos alveolares, a inibição das quinases p38 com o inibidor da p38, SB203580, reduz os produtos de gene da citoquina. Acredita-se que as citoquinas inflamatórias (TNF-α, IFN-γ, IL-4, IL-5) e quimioquinas (IL-8, RANTES,

eotaxina) são capazes de regular ou suportar a inflamação crônica das vias aéreas. A produção e ação de muitos dos mediadores potenciais da inflamação das vias aéreas parecem ser dependentes do sistema da MAP quinase ativada por estresse (SAPK) ou cascata da quinase p38 (Underwood e outros, 2001 *Prog Respir Res* 31:342-345). A ativação da via da quinase p38 por numerosos estímulos ambientais resulta na elaboração de mediadores inflamatórios reconhecidos cuja produção é considerada para ser regulada de forma traducional. Além disso, uma variedade de mediadores inflamatórios ativa a MAPK p38, que pode então ativar os alvos do sistema da MAPK incluindo outras quinases ou fatores de transcrição, criando assim o potencial para um processo inflamatório amplificado nos pulmões.

Substratos do grupo p38 das MAP quinases

Substratos da Proteína Quinase de p38α ou p38β: Proteína quinase 2 ativada por MAP quinase (MAPKAPK2 ou M2), proteína quinase de interação com MAP quinase (MNK1), quinase p38 regulada/ativada (PRAK), quinase ativada por mitógeno e estresse (MSK: RSK-B ou RLPK).

Fatores de transcrição ativados por p38: ativar o fator de transcrição (ATF)-1, 2 e 6, proteína acessória SRF-1 (Sap 1) CHOP (gene 153 indutor de dano ao DNA e bloqueio de crescimento, ou GADD153), p53, C/EBPβ, fator 2C ativador de miócito (MEF2C), MEF2A, MITF1, DDIT3, ELK1, NFAT, e proteína de grupo de alta mobilidade (HBP1).

Outros tipos de substratos para p38: cPLA2, isoforma-1 trocadora de Na^+/H^+, tau, queratina 8 e estatimina.

Genes regulados pela via da p38: c-jun. c-fos, junB, IL-1, TNF, IL-6, IL-8, MCP-1, VCAM-1, iNOS, PPARγ,

ciclooxigenase (COX)-2, colagenase-1 (MMP-1), colagenase-3 (MMP-13), HIV-LTR, Fgl-2, peptídeo natriurético cerebral (BNP), CD23, CCK, fosfoenolpiruvato carboxi-quinase-citosólica, ciclina D1, receptor LDL (Ono e outros, 2000 *Cellular Signalling* 12:1-13).

Conseqüências biológicas da ativação da p38

p38 e inflamação

Acredita-se que a inflamação aguda e crônica sejam fundamentais à patogênese de muitas doenças tais como artrite reumatóide, asma, doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD) e síndrome do desconforto/angústia respiratório aguda (ARDS). A ativação da via da p38 pode executar um papel importante em: (1) produção de citoquinas pró-inflamatórias tais como IL-1β, TNF-α e IL-6; (2) indução de enzimas tais como COX-2, que controla a remodelagem do tecido conjuntivo em condição patológica; (3) expressão de uma enzima intracelular tal como iNOS, que regula a oxidação; (4) indução de proteínas aderentes tais como VCAM-1 e muitas outras moléculas relacionadas inflamatórias. Além disso, a via da p38 pode executar uma função reguladora na proliferação e diferenciação das células do sistema imune. A p38 pode participar na proliferação e/ou diferenciação celular induzida por GM-CSF, CSF, EPO e CD40.

O papel da via da p38 nas doenças relacionadas à inflamação foi estudado em vários modelos animais. A inibição da p38 pelo SB203580 reduziu a mortalidade em um modelo murino de choque induzido por endotoxina e inibiu o desenvolvimento de artrite induzida por colágeno em rato e artrite induzida por adjuvante em rato. Um estudo recente

mostrou que o SB220025, que é um inibidor da p38 mais potente, causou uma diminuição dependente da dose significante na densidade vascular do granuloma. Estes resultados indicam que a p38 ou os componentes da via da p38 podem ser um alvo terapêutico para a doença inflamatória.

p38 e fibrose

A deposição não controlada e/ou anômala das proteínas da matriz extracelular leva à fibrose e é fundamental à patogênese de doenças incluindo fibrose pulmonar idiopática (IPF), sarcoidose, doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD) e cirrose. A p38 tem sido envolvida em vários eventos de vias pró-fibróticas através de seu papel na sinalização do receptor TGF-β (Kaminska e outros, Acta Biochimica Polonica 52(2): 329-37). A TGF-β é fundamental à fibrose e está envolvida nos eventos que incluem a indução de deposição de colágeno, síntese de citoquinas pró-fibróticas, proliferação de fibroblastos, diferenciação de miofibroblastos e transição epitelial-mesenquimal (Kaminska et al Acta Biochimica Polonica 52(2): 329-37; Border and Noble 1994 NEJM 331: 1286-92) (R. Newton and N.S. Holden, Drug Discovery Today: Disease Mechanisms, Volume 3, edição n° 1, Spring 2006, Pages 53-61). A p38 é ativada pela citoquina adicional e fatores de crescimento que podem estar associados com a fibrose incluindo: interleucina-1β (IL-1β), interleucina-17 (IL-17), fator de crescimento epidermal (EGF), e fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF).

A fibrose, por exemplo no fígado, ocorre por deposição excessiva dos componentes da matriz extracelular,

especialmente colágeno, devido a um desequilíbrio entre a quantidade de macromoléculas da matriz produzida contra a degradada no fígado (NIH Guide PA-99-110 National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism). Historicamente, a fibrose do fígado tem sido considerada um processo irreversível envolvendo a substituição progressiva do parênquima hepático com ECM rica em colágeno (Muddu e outros, Int J Biochem Cell Biol. 7 de outubro de 2006). Evidência bioquímica para uma deposição aumentada do colágeno em humanos foi demonstrada em pacientes com ambas as formas, aguda e crônica, da fibrose pulmonar (Laurent, Ciba Found Symp. 1985 114:222-33). Na fibrose pulmonar idiopática, há uma produção exorbitante de moléculas da matriz extracelular, incluindo colágeno, tenascina e proteoglicans (Noble e outros, Clin Chest Med 2004 25:749-758). Os mecanismos que controlam a etapa da fibrogênese (uma reação potencialmente reversível) à fibrose (irreversível) podem estar ligados à maturação do colágeno, calcificação, ou formação das massas de proteína entrecruzadas (Toxicol. Pathol., 1991;19(4 Pt 1):526-39). Conforme descrito aqui e mostrado nos Exemplos, foi descoberto através dos experimentos de inibição de RNA que a inibição da p38, incluindo mas não limitada à isoforma p38γ, pode afetar os níveis de produção de colágeno nas células alvo, incluindo os fibroblastos.

A interferência por RNA (RNAi) é um mecanismo celular em que RNAs filamentares curtos duplos, conhecidos como RNAs curtos interferentes ou siRNAs, direcionam a degradação de uma RNA alvo complementar. Este processo pode levar a uma redução significante no nível do RNA alvo.

Elbashir e colaboradores (2001 Nature 411: 494-8) definiram as características estruturais de um siRNA típico como um dúplex de 19 pares de base com duas projeções de nucleotídeo em ambas as extremidades. Pesquisadores usaram subsequentemente este formato para projetar siRNAs sintéticos em que um dos dois oligonucleotídeos de RNA é complementar a um gene de interesse. A introdução destes siRNAs sintéticos em células de mamífero pode promover a degradação do mRNA complementar e uma redução correspondente no produto da proteína correspondente. O uso de tecnologia de RNAi permite estudos funcionais em que a redução da expressão dos genes específicos permite experimentos para investigar o papel daquele gene em uma via celular ou estado de doença.

RNAs curtos tipo grampo de cabelo (ou shRNAs) são uma ferramenta de pesquisa relacionada em que os 21 nucleotídeos dúplex descritos por Elbashir e colaboradores são convertidos em um formato de grampo de cabelo. O desenho do grampo de cabelo permitr a introdução dos cassetes de expressão nas células que direcionam a expressão do shRNA a partir de um promotor transcricional apropriado. O uso de shRNAs elimina a necessidade por transfecção eficiente de células com siRNAs sintéticos, que pode ser difícil com certos tipos de célula, e portanto expande o número de tipos de célula que podem ser usadas de forma bem sucedida para os experimentos baseados em RNAi. O uso de shRNAs também permite redução de expressão ("*knockdown*") prolongada/estável de um mRNA alvo e o isolamento das populações de célula que foram traduzidas com um cassete de expressão do shRNA.

Uma modalidade da introdução estável dos cassetes de expressão de shRNA é os lentivírus atenuados. Moffat e colaboradores descreveram uma biblioteca de partículas lentivirais atenuadas que são propostas para incorporar de forma estável um cassete de expressão de shRNA acionado pelo promotor U6 no genoma de células infectadas (Moffat e outros, 2006 Cell 124: 1283-98). O segmento transferido do vírus de engenharia genética também codifica um marcador de resistência à puromicina que pode ser usado para selecionar células que tinham um cassete de expressão de shRNA integrado de forma estável.

Quando oito partículas lentivirais contendo regiões codificadoras (Id. de Seq. n°s:1-8) que codificam diferentes shRNAs que têm como alvo p38α ou p38γ foram preparadas e introduzidas nas células conforme descrito no Exemplo 10, mRNAs isolados e quantificados de acordo com o Exemplo 11, e níveis de colágeno analisados de acordo com o Exemplo 12, os resultados mostraram que as seqüências que diminuem os níveis de p38γ estavam associadas com o decréscimo resultante no acúmulo de colágeno. Veja Tabela 1 no Exemplo 12. Assim, a inibição de, por exemplo, p38γ pode resultar em níveis diminuídos de expressão de colágeno, e, portanto, podem inibir a fibrose.

p38 e apoptose

Parece que ativação concomitante da p38 e apoptose é induzida por uma variedade de agentes tais como retirada de NGF e ligação de Fas. As proteases de cisteína (caspases) são fundamentais aa via apoptótico e são expressas como zimógenos inativos. Os inibidores da caspase podem então bloquear a ativação da p38 através do entrecruzamento de

Fas. Entretanto, o superexpressão de MKK6b ativa dominante pode também induzir a atividade da caspase e a morte celular. O papel da p38 na apoptose é dependente do tipo celular e do estímulo. Embora a sinalização da p38 tenha sido mostrada para promover a morte celular em algumas linhas de célula, em diferentes linhas de célula, a p38 mostrou aumentar a sobrevivência, crescimento celular e diferenciação.

p38 no ciclo celular

A superexpressão da p38α em levedura leva ao retardamento significante da proliferação, indicando o envolvimento da p38α no crescimento celular. Uma proliferação mais lenta das células de mamífero em cultura foi observada quando as células foram tratadas com o inibidor da p38α/β, SB203580.

p38 e hipertrofia do cardiomiócito

A ativação e função da p38 na hipertrofia de cardiomiócito foi estudada. Durante o progresso da hipertrofia, tanto os níveis da p38α quanto os níveis da p38β foram aumentados e a MKK3 ativa de forma constitutiva e respostas hipertróficas induzidas por MKK6 foram aumentadas pela organização sarcomérica e elevada expressão do fator natriurético atrial. Também, a sinalização reduzida da p38 no coração promove a diferenciação do miócito através de um mecanismo envolvendo sinalização calcineurina-NFAT.

p38 e desenvolvimento

Apesar da não viabilidade de camundongo nocaute para p38, existe evidência em relação ao papel diferencial da p38 no desenvolvimento. A p38 foi ligada à angiogênese

placentária mas não ao desenvolvimento cardiovascular em vários estudos. Além disso, a p38 também tem sido ligada à expressão da eritropoietina sugerindo uma função na eritropoiese. PRAK foi recentemente envolvida no desenvolvimento celular na implantação de murina. Descobriu-se que o PRAK mRNA, assim como as isoformas p38, são expressados por todo o desenvolvimento do blastocisto.

p38 e diferenciação celular

Descobriu-se que a p38α e/ou p38β executam um importante papel na diferenciação celular para vários tipos de células diferentes. A diferenciação das células 3T3-L1 em adipócitos e a diferenciação das células PC12 em neurônios requerem p38α e/ou p38β. Descobriu-se que a via da p38 é necessário e suficiente para a diferenciação do SKT6 em células hemoglobinizadas assim como a diferenciação da C2C112 em miotúbulos.

p38 na senescência e supressão tumoral

A p38 possui um papel importante na tumorigênese e senescência. Há relatos de que a ativação da MKK6 e MKK3 leva a um fenótipo senescente dependente da atividade da MAPK p38. Também, a atividade de MAPK p38 mostrou-se responsável pela senescência em resposta ao encurtamento do telômero, exposição à H_2O_2, e sinalização do oncogene RAS crônica. Uma característica comum das células tumorais é uma perda de senescência e a p38 está ligada à tumorigênese em certas células. Foi relatado que a ativação da p38 é reduzida em tumores e que a perda de componentes da via da p38 tal como MKK3 e MKK6 resultou na proliferação aumentada e probabilidade de conversão tumorigênica sem levar em consideração a linha de célula ou o agente de indução

tumoral usado nestes estudos.

Inibidores da MAP quinase p38

Um "inibidor da MAPK p38" e um composto que inibe a atividade da p38. Os efeitos inibitórios de um composto na atividade da p38 podem ser medidos por vários métodos bem conhecidos daqueles habilitados na técnica. Por exemplo, os efeitos inibitórios podem ser medidos através da medição do nível de inibição da produção de citoquinas estimulada por lipopolissacarídeos (LPS) (Lee e outros, 1988, *Int J. Immunopharmacol* 10:835-843; Lee e outros, 1993 *Ann NY Acad Sci* 696:149-170; Lee e outros, 1994 *Nature* 372:739-746; Lee e outros, 1999 *Pharmacol Ther* 82:389-397).

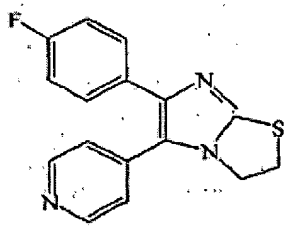
Esforços para desenvolver inibidores de MAPK p38 têm focado geralmente no aumento da potência. Descobriu-se que o SB203580 é um potente inibidor da quinase p38 com um valor de IC_{50} na faixa de nanomolar. Por exemplo, para o SB203580, descobriu-se que o valor de IC50 é 48 nM. Os piridinilimidazol SKF 86002 (P1) e SB203582 (P2) mostrados abaixo são também inibidores da quinase p38. Publicações recentes (Lee e outros, 2000 *Intmunopharmacology* 47:185-201) divulgaram os inibidores da p38 (P3-P6) mostrados abaixo. Entre estes inibidores, a potência e a seletividade relativamente altas descritas para o composto P4 (IC_{50} da p38 = 0,19 nM) e a inibição da angiogênese acionada por inflamação pelo SB220025 (P6) são notáveis. Acredita-se que tais compostos se ligam nos bolsos de ATP do polipeptídeo da p38α, e são inibidores competitivos do cofator de ATP.

Descobriu-se que certos imidazóis de pirimidina são inibidores potentes da quinase p38 com valores de IC_{50} subnanomolares (Liverton e outros, 1999, *J. Biol. Chem.* 42:

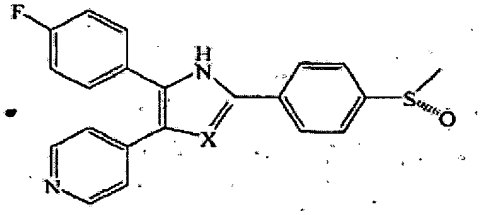
2180-2190). Acredita-se que tais compostos se ligam nos bolsos de ATP do polipeptídeo da p38α, e são inibidores competitivos do cofator de ATP essencial.

Certais diaril uréias, por exemplo, BIRB 796, são também inibidores potentes da MAPK p38 (Pargellis e outros, *Nature Structural Biology* 9:268-272). A BIRB 796 possui um IC50 contra TNF-α de 18 nM. A diaril uréia é estruturalmente distinta dos piridinil imidazóis e os inibidores de piridinil imidazol da p38. Acredita-se que certas diaril uréias são inibidores alostéricos da p38α. Acredita-se que ao ligar a p38α em um sítio espacialmente removido do bolso de ligação de ATP, o inibidor alostérico induz uma mudança conformacional no bolso de ligação de ATP do polipeptídeo e a mudança conformacional resulta no bolso de ligação de ATP incompatível com ligação eficiente de ATP, assim considerando a potência observada do composto como um inibidor da p38α.

Dois inibidores da p38 relatados como estando em desenvolvimento clinico são HEP689 (P7) e VX-745 (P8). VX-745 está supostamente nos experimentos de Fase II para artrite reumatóide. Atividade antiinflamatória tópica potente foi divulgada para HRP689, que entrou supostamente em desenvolvimento clínico para explorar seu potencial como um agente tópico para o tratamento de psoríase e outras doenças da pele.

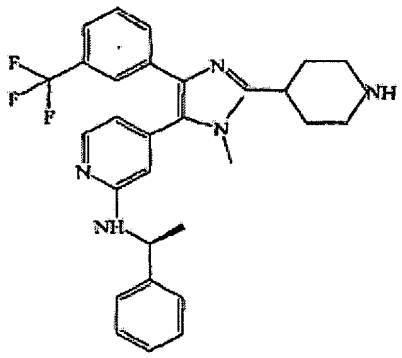


P1 SK&F 86002

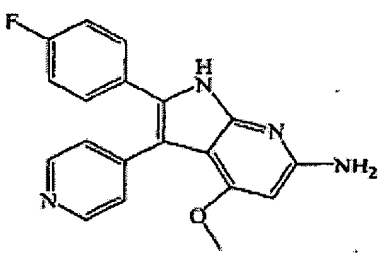


P2 X = N; SB 203580

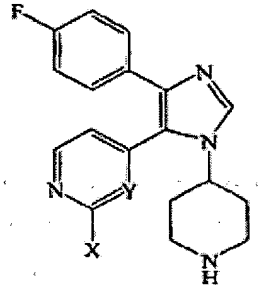
P3 X = CH; L-167307



P4

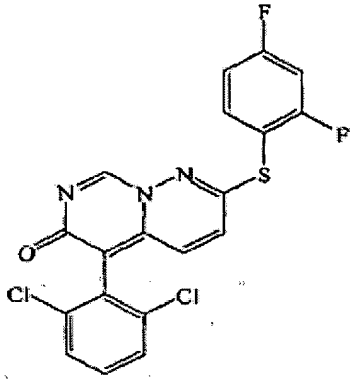


P5 RWJ 68354



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

P7 X = HN_2, Y = N; SB 220025



P8 VX-745

Discussão adicional de vários inibidores da p38 pode ser encontrada em Boehm e outros, 2000 *Exp Opin Ther Pat* 10:25-37; e Salituro e outros, 1999 *Curr Med Chem* 6:807-823 e Fitzgerald e outros, 2003, *Nature Structural Biology* 10:764-769.

Foi descoberto que a isoforma γ da p38 possui significante similaridade estrutural em relação à isoforma α. Entretanto, embora resíduos importantes sejam conservados entre as isoformas, a variação estrutural é observada incluindo na região em torno do bolso de ligação de ATP da proteína. A modelagem dos inibidores da p38 descrita acima demonstrou que interações energeticamente desfavoráveis foram observadas quando os inibidores da p38α interagiram com a isoforma p38γ. A modelagem também revelou que outras interações energeticamente favoráveis foram

retidas quando os inibidores da p38α interagiram com a isoforma p38γ.

Foi descoberto que certos compostos do Tipo II necessitam de interações estericamente desfavoráveis, por exemplo, a interação estericamente desfavorável entre MET109 da p38γ e a metade de trifluorometilfenil do composto 1 descrito em Fitzgerald e outros, 2003 *Nature Structural Biology* 10:764-769, e também que certos compostos do Tipo II possuem substituintes que interagem com a p38γ e transmitem energia de ligação positiva. Foi descoberto que a remoção simples da metade de trifluorometilfenil pode necessitar da energia de ligação favorável de um composto portando um substituinte que interage com a proteína. Consequentemente, em algumas modalidades, o substituinte do trifluorometilfenil no composto 1 de Fitzgerald e outros, 2003 *Nature Structural Biology* 10:764-769 é substituído por substituintes de volume molecular menores, ou por substituintes de volume molecular menor e que façam interações de Van der Waals com o bolso hidrofóbido definido pelos resíduos Leu89, Leu58, Leu107 e Leu108 da p38γ, ou por substituintes de volume molecular menor e que façam ligações de hidrogênio ou interação eletrostática com Met109 da p38γ, ou por substituintes de volume molecular menor e que façam interações de Van der Waals com o bolso hidrofóbido definido pelos resíduos Leu89, Leu58, Leu107 e Leu108 da p38γ, e que também façam ligação de hidrogênio ou interação eletrostática com Met109 da p38γ.

Foi descoberto que certos compostos do Tipo IV necessitam de interações estericamente desfavoráveis, por

exemplo, a interação estericamente desfavorável entre Met109 da p38γ e a metade de fluorofenil da P2, e também que certos compostos do Tipo IV possuem substituintes que interagem com a p38γ e transmitem energia de ligação positiva. Consequentemente, em algumas modalidades, o substituinte de fluorofenil de P2 é substituído por substituintes de volume molecular menor, ou por substituintes de volume molecular menor e que façam interações de Van der Waals com o bolso hidrofóbido definido pelos resíduos Leu89, Leu58, Leu107 e Leu108 da p38γ, ou por substituintes de volume molecular menor e que façam ligações de hidrogênio ou interação eletrostática com Met109 da p38γ, ou por substituintes de volume molecular menor e que façam interações de Van der Waals com o bolso hidrofóbido definido pelos resíduos Leu89, Leu58, Leu107 e Leu108 da p38γ, e que também façam ligação de hidrogênio ou interação eletrostática com Met109 da p38γ.

Foi descoberto que certos compostos do Tipo III necessitam de interações estericamente desfavoráveis, por exemplo, a interação estericamente desfavorável entre Met109 da p38γ e a metade naftileno substituído de BIRB 796, e também que certos compostos do Tipo III possuem substituintes que interagem com a p38γ e transmitem energia de ligação positiva. Consequentemente, em algumas modalidades, o naftileno substituído de BIRB 796 é substituído por substituintes de volume molecular menor, ou por substituintes de volume molecular menor e que façam interações de Van der Waals com o bolso hidrofóbico definido pelos resíduos Leu89, Leu58, Leu107 e Leu108 da p38γ, ou por substituintes de volume molecular menor e que

façam ligações de hidrogênio ou interação eletrostática com Met109 da p38γ, ou por substituintes de volume molecular menor e que façam interações empilhamento-π ou cátion-π com Phe111 da p38γ, ou por substituintes de menor volume molecular e que façam interações de Van der Waals com o bolso hidrofóbico definido pelos resíduos Leu89, Leu58, Leu107 e Leu108 da p38γ, e que também façam ligação de hidrogênio ou interação eletrostática com Met109 da p38γ, ou por substituintes de menor volume molecular e que façam interações de Van der Walls com o bolso hidrofóbico definido pelos resíduos Leu89, Leu58, Leu107 e Leu108 da p38γ, e que também façam interações empilhamento-π ou cátion-π com Phe111 da p38γ, ou por substituintes de menor volume molecular e que façam interações de Van der Waals com o bolso hidrofóbico definido pelos resíduos Leu89, Leu58, Leu107 e Leu108 da p38γ, e que também façam ligação de hidrogênio ou interação eletrostática com Met109 da p38γ e empilhamento-π ou cátion-π com Phe111 da p38γ.

Inibidores da p38 preferidos aqui descritos são derivados de oxopiridina bicíclicos e análogos que exibem potência relativamente alta da inibição da p38γ e que possuem um efeito relativamente alto (por exemplo, para modular um sistema de SAPK) como um resultado de tal inibição. Preferivelmente, os inibidores da p38 das modalidades exibem um IC_{50} na faixa de cerca de 10 pM a cerca de 500 μM, preferivelmente de cerca de 10 pM a cerca de 5 μM ou de cerca de 100 nM a cerca de 500 μM, preferivelmente de cerca de 50 pM a cerca de 1 μM, mais preferivelmente de cerca de 50 pM a cerca de 200 nM para a inibição da MAPK p38γ. Preferivelmente, os inibidores da

p38 das modalidades exibem um valor de IC_{50} para a inibição da p38α que é pelo menos cerca de duas vezes maior que o valor de IC_{50} para a inibição da MAPK p38γ. Mais preferivelmente, os inibidores da p38 das modalidades exibem um valor de IC_{50} para a inibição da p38α que é pelo menos cerca de cinco vezes maior que o valor de IC_{50} para a inibição da MAPK p38γ. Ainda mais preferivelmente, os inibidores da p38 das modalidades exibem um valor de IC_{50} para a inibição da p38α que é pelo menos cerca de dez vezes maior que o valor de IC_{50} para a inibição da MAPK p38γ.

Inibidores da p38 preferidos aqui descritos são derivados de pirimidinil imidazol e análogos que exibem potência relativamente alta da inibição da p38γ e que possuem um efeito relativamente alto (por exemplo, para modular um sistema de SAPK) como um resultado de tal inibição. Preferivelmente, os inibidores da p38 das modalidades exibem um IC_{50} na faixa de cerca de 10 pM a cerca de 500 μM, preferivelmente de cerca de 10 pM a cerca de 5 μM ou de cerca de 100 nM a cerca de 500 μM, preferivelmente de cerca de 50 pM a cerca de 1 μM, mais preferivelmente de cerca de 50 pM a cerca de 200 nM para a inibição da MAPK p38γ. Preferivelmente, os inibidores da p38 das modalidades exibem um valor de IC_{50} para a inibição da p38α que é pelo menos cerca de duas vezes maior que o valor de IC_{50} para a inibição da MAPK p38γ. Mais preferivelmente, os inibidores da p38 das modalidades exibem um valor de IC_{50} para a inibição da p38α que é pelo menos cerca de cinco vezes maior que o valor de IC_{50} para a inibição da MAPK p38γ. Ainda mais preferivelmente, os inibidores da p38 das modalidades exibem um valor de IC_{50}

para a inibição da p38α que é pelo menos cerca de dez vezes maior que o valor de IC_{50} para a inibição da MAPK p38γ.

Inibidores da p38 preferidos aqui descritos são derivados de diaril uréia e análogos que exibem potência relativamente alta da inibição da p38γ e que possuem um efeito relativamente alto (por exemplo, para modular um sistema de SAPK) como um resultado de tal inibição. Preferivelmente, os inibidores da p38 das modalidades exibem um IC_{50} na faixa de cerca de 10 pM a cerca de 500 μM, preferivelmente de cerca de 10 pM a cerca de 5 μM ou de cerca de 100 nM a cerca de 500 μM, preferivelmente de cerca de 50 pM a cerca de 1 μM, mais preferivelmente de cerca de 50 pM a cerca de 200 nM para a inibição da MAPK p38γ. Preferivelmente, os inibidores da p38 das modalidades exibem um valor de IC_{50} para a inibição da p38α que é pelo menos cerca de duas vezes maior que o valor de IC_{50} para a inibição da MAPK p38γ.

O termo "alquil" aqui usado refere-se a um radical de cadeira linear ou ramificada monovalente de um a dez átomos de carbono, incluindo, mas não limitado a metil, etil, n-propil, isopropil, n-butil, isobutil, terc-butil, n-hexil e etc.

O termo "alquenil" aqui usado refere-se a um radical de cadeira linear ou ramificada monovalente de dois a dez átomos de carbono contendo uma ligação dupla entre carbonos incluindo, mas não limitado a 1-propenil, 2-propenil, 2-metil-1-propenil, 1-butenil, 2-butenil e etc.

O termo "halo" aqui usado refere-se a flúor, cloro, bromo ou iodo.

O termo "haloalquil" aqui usado refere-se a um ou mais

grupos halo ligados a um radical alquil.

O termo "nitroalquil" aqui usado refere-se a um ou mais grupos nitro ligados a um radical alquil.

O termo "tioalquil" aqui usado refere-se a um ou mais grupos tio ligados a um radical alquil.

O termo "hidroxialquil" aqui usado refere-se a um ou mais grupos hidroxi ligados a um radical alquil.

O termo "alcoxi" aqui usado refere-se ao radical de cadeira linear ou ramificada, ligado de forma covalente à molécula de origem através de uma ligação --O--. Exemplos de grupos alcoxi incluem, mas estão limitados a metoxi, etoxi, propoxi, isopropoxi, butoxi, *n*-butoxi, *sec*-butoxi, *terc*-butoxi e etc.

O termo "alcoxialquil" aqui usado refere-se a um ou mais grupos alcoxi ligados a um radical alquil.

O termo "carboxi" aqui usado refere-se a -COOH.

O termo "alcoxicarbonil" refere-se -(CO)-O-alquil. Exemplos de grupos alcoxicarbonil incluem, mas estão limitados ao grupo metoxicarbonil, grupo etoxicarbonil, grupo propoxicarbonil e etc.

Conforme aqui usado, um radical indica uma espécie com um único elétron não emparelhado de forma que as espécies contendo o radical possam ser covalentemente ligadas a outras espécies. Por conseguinte, neste contexto, um radical não é necessariamente um radical livre. Em vez disso, um radical indica uma porção específica de uma molécula maior. O termo "radical" pode ser usado de forma intercambiável com o termo "grupo".

Conforme aqui usado, um grupo substituído é derivado da estrutura original não substituída em que houve uma

troca de um ou mais átomos de hidrogênio por um outro átomo ou grupo. Quando substituído, o(s) grupo(s) substituinte(s) é(são) um ou mais grupo(s) individualmente e independentemente selecionado a partir de alquil, cicloalquil, aril, aril fundido, heterociclil, heteroaril, hidroxi, alcoxi, arilóxi, mercapto, alquiltio, ariltio, ciano, halo, carbonil, tiocarbonil, alcoxicarbonil, nitro, silil, trihalometanossufonil, trifluorometil e amino, incluindo grupos amino mono- e di-substituído, e os derivados protegidos deste. Os grupos protetores que podem formar os derivados protetores dos substituintes acima são conhecidos daqueles habilitados na técnica e podem ser encontrados em referências tais como Greene and Wuts *Protective Groups em Organic Synthesis;* John Wiley and Sons: New York, 1999. Sempre que um substituinte for descrito como "opcionalmente substituído", este substituinte pode ser substituído com os substituintes acima.

O termo "purificado" refere-se a um composto que foi separado de outros compostos de forma que ele compreenda pelo menos 95% da substância medida quando analisada.

Átomos de carbono assimétrico podem estar presentes nos compostos descritos aqui. Todos estes isômeros, incluindo diastereoisômeros e enanciômeros, assim como as misturas destes são objetivadas para estarem incluídas no escopo do composto citado. Em certos casos, os compostos podem existir em formas tautoméricas. Todas as formas tautoméricas são objetivadas para estarem incluídas do composto citado. De forma semelhante, quando os compostos contêm um grupo alquenil ou aquenileno, existe a

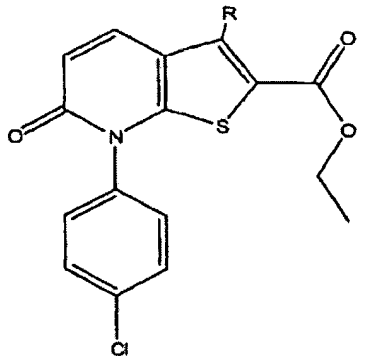
possibilidade das formas isoméricas dos compostos *cis-* e *trans-*. Ambos os isômeros *cis-* e *trans-*, assim como as misturas de isômeros *cis-* e *trans-*, são considerados. Assim, a referência aqui a um composto inclui todas as formas isoméricas supracitadas a menos que o contexto dite claramente de outra forma.

Várias formas são incluídas nas modalidades, incluindo polimorfos, solvatos, hidratos, confôrmeros, sais e derivados de pró-Fármaco. Um polimorfo é uma composição possuindo a mesma fórmula química, mas uma estrutura diferente. Um solvato é uma composição formada por solvatação (a combinação de moléculas se solvente com moléculas ou íons do soluto). Um hidrato é um composto formado por uma incorporação de água. Um confôrmero é uma estrutura que é um isômero conformacional. O isomerismo conformacional é o fenômeno das moléculas com a mesma fórmula estrutura mas com conformações diferentes (confôrmeros) de átomos sobre uma ligação rotacional. Sais de compostos podem ser preparados por métodos conhecidos daqueles habilitados na técnica. Por exemplo, sais de compostos podem ser preparados reagindo-se a base ou ácido apropriado com um equivalente estequiométrico do composto. Um pró-Fármaco é um composto que passa por biotransformação (conversão química) antes de exibir seus efeitos farmacológicos. Por exemplo, um pró-Fármaco pode deste modo ser vista como um Fármaco contendo grupos protetores especializados usados de uma maneira provisória para alterar ou eliminar propriedades indesejáveis na molécula de origem. Assim, a referência aqui a um composto inclui todas as formas supracitadas a menos que o contexto dite

claramente de outra forma.

Os compostos descritos abaixo são úteis nos métodos aqui descritos. Em uma modalidade, um composto conforme descritos abaixo exibe um IC_{50} na faixa de cerca de 10 pM a cerca de 5 μM para inibição da p38γ, preferivelmente de cerca de 100 nm a cerca de 500 μM.

Uma modalidade fornece uma família de compostos representada pelo seguinte tipo (Tipo I):

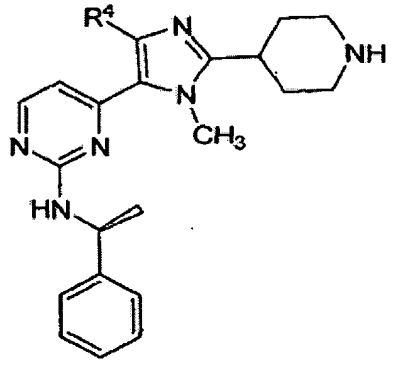


Tipo I;

onde R é selecionado a partir do grupo consistindo de H, halo, ciano, nitro, hidroxi, alquil C_{1-6} opcionalmente substituído, cicloalquil $C_{3,7-7}$ opcionalmente substituído, alquilcicloalquil C_{4-10} opcionalmente substituído, alquenil C_{2-6} opcionalmente substituído, alcoxi C_{1-6} opcionalmente substituído, aril C_6 ou C_{10} opcionalmente substituído, piridinil opcionalmente substituído, pirimidinil opcionalmente substituído, tienil opcionalmente substituído, furanil opcionalmente substituído, tiazolil opcionalmente substituído, oxazolil opcionalmente substituído, fenoxi opcionalmente substituído, tiofenoxi opcionalmente substituído, sulfoamido opcionalmente substituído, uréia opcionalmente substituída, tiouréia opcionalmente substituída, amido opcionalmente substituído, ceto opcionalmente substituído, carboxil opcionalmente substituído, carbamil opcionalmente substituído, sulfeto

opcionalmente substituído, sulfóxido opcionalmente substituído, sulfona opcionalmente substituída, amino opcionalmente substituído, alcoxiamino opcionalmente substituído, alquiloxiheterociclil opcionalmente substituído, alquilamino opcionalmente substituído, alquilcarboxi opcionalmente substituído, carbonil opcionalmente substituído, cicloalquil espirocíclico opcionalmente substituído, pirazinil opcionalmente substituído, piridazinil opcionalmente substituído, pirrolil opcionalmente substituído, tiofenil opcionalmente substituído, tiazolil opcionalmente substituído, oxazolil opcionalmente substituído, imidazolil opcionalmente substituído, isoxazolil opcionalmente substituído, pirazolil opcionalmente substituído, isotiazolil opcionalmente substituído, naftil opcionalmente substituído, quinolinil opcionalmente substituído, isoquinolinil opcionalmente substituído, quinoxalinil opcionalmente substituído, benzotiazolil opcionalmente substituído, benzotiofenil opcionalmente substituído, benzofuranil opcionalmente substituído, indolil opcionalmente substituído e benzimidazolil opcionalmente substituído.

Uma outra modalidade fornece uma família de compostos representada pelo seguinte tipo (Tipo II):

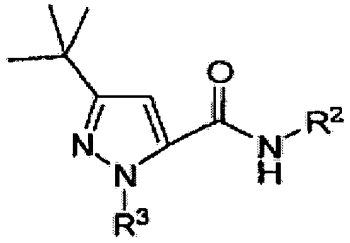


Tipo II;

onde R^4 é selecionado a partir do grupo consistindo de H, halo, ciano, nitro, hidroxi, alquil C_{1-6} opcionalmente substituído, cicloalquil $C3_{-7}$ opcionalmente substituído, alquilcicloalquil C_{4-10} opcionalmente substituído, alquenil C_{2-6} opcionalmente substituído, alcoxi C_{1-6} opcionalmente substituído, aril C_6 ou C_{10} opcionalmente substituído, piridinil opcionalmente substituído, pirimidinil opcionalmente substituído, tienil opcionalmente substituído, furanil opcionalmente substituído, tiazolil opcionalmente substituído, oxazolil opcionalmente substituído, fenoxi opcionalmente substituído, tiofenoxi opcionalmente substituído, sulfoamido opcionalmente substituído, uréia opcionalmente substituída, tiouréia opcionalmente substituída, amido opcionalmente substituído, ceto opcionalmente substituído, carboxil opcionalmente substituído, carbamil opcionalmente substituído, sulfeto opcionalmente substituído, sulfóxido opcionalmente substituído, sulfona opcionalmente substituída, amino opcionalmente substituído, alcoxiamino opcionalmente substituído, alquiloxiheterociclil opcionalmente substituído, alquilamino opcionalmente substituído, alquilcarboxi opcionalmente substituído, carbonil opcionalmente substituído, cicloalquil espirocíclico opcionalmente substituído, pirazinil opcionalmente substituído, piridazinil opcionalmente substituído, pirrolil opcionalmente substituído, tiofenil opcionalmente substituído, tiazolil opcionalmente substituído, oxazolil opcionalmente substituído, imidazolil opcionalmente substituído, isoxazolil opcionalmente substituído, pirazolil opcionalmente substituído, isotiazolil

opcionalmente substituído, naftil opcionalmente substituído, quinolinil opcionalmente substituído, isoquinolinil opcionalmente substituído, quinoxalinil opcionalmente substituído, benzotiazolil opcionalmente substituído, benzotiofenil opcionalmente substituído, benzofuranil opcionalmente substituído, indolil opcionalmente substituído e benzimidazolil opcionalmente substituído.

Uma outra modalidade fornece uma família de compostos representada pelo seguinte tipo (Tipo III):



Tipo III;

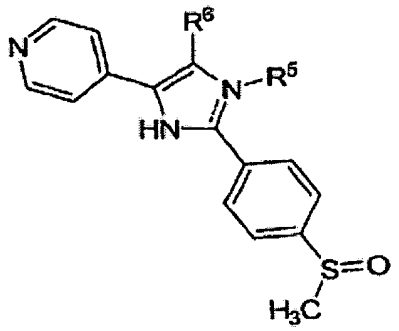
onde

R^2 e R^3 são, cada um, individualmente, selecionados a partir do grupo consistindo de H, halo, ciano, nitro, hidroxi, alquil C_{16} opcionalmente substituído, cicloalquil C_{3-7} opcionalmente substituído, alquilcicloalquil C_{4-10} opcionalmente substituído, alquenil C_{2-6} opcionalmente substituído, alcoxi C_{1-6} opcionalmente substituído, aril C_6 ou C_{10} opcionalmente substituído, piridinil opcionalmente substituído, pirimidinil opcionalmente substituído, tienil opcionalmente substituído, furanil opcionalmente substituído, tiazolil opcionalmente substituído, oxazolil opcionalmente substituído, fenoxi opcionalmente substituído, tiofenoxi opcionalmente substituído, sulfonamido opcionalmente substituído, uréia opcionalmente substituída, tiouréia opcionalmente substituída, amido

opcionalmente substituído, ceto opcionalmente substituído, carboxil opcionalmente substituído, carbamil opcionalmente substituído, sulfeto opcionalmente substituído, sulfóxido opcionalmente substituído, sulfona opcionalmente substituída, amino opcionalmente substituído, alcoxiamino opcionalmente substituído, alquiloxiheterociclil opcionalmente substituído, alquilamino opcionalmente substituído, alquilcarboxi opcionalmente substituído, carbonil opcionalmente substituído, cicloalquil espirocíclico opcionalmente substituído, pirazinil opcionalmente substituído, piridazinil opcionalmente substituído, pirrolil opcionalmente substituído, tiofenil opcionalmente substituído, tiazolil opcionalmente substituído, oxazolil opcionalmente substituído, imidazolil opcionalmente substituído, isoxazolil opcionalmente substituído, pirazolil opcionalmente substituído, isotiazolil opcionalmente substituído, naftil opcionalmente substituído, quinolinil opcionalmente substituído, isoquinolinil opcionalmente substituído, quinoxalinil opcionalmente substituído, benzotiazolil opcionalmente substituído, benzotiofenil opcionalmente substituído, benzofuranil opcionalmente substituído, indolil opcionalmente substituído e benzimidazolil opcionalmente substituído.

Em uma modalidade, o composto do Tipo III não é 1-(5-terc-butil-2-p-tolil-2H-pirazol-3-il)-3-[4-(2-morfolin-4-il-etoxi)naftalen-1-il]uréia (BIRB 796).

Uma outra modalidade fornece uma família de compostos representada pelo seguinte tipo (Tipo IV):



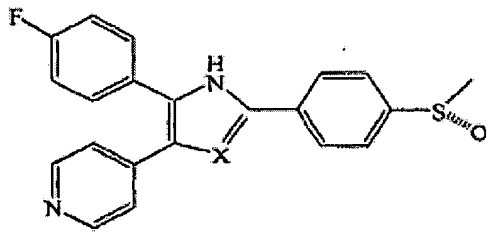
Tipo IV;

onde

R^5 e R^6 são, cada um, individualmente, selecionados a partir do grupo consistindo de H, halo, ciano, nitro, hidroxi, alquil C_{1-6} opcionalmente substituído, cicloalquil C_{3-7} opcionalmente substituído, alquilcicloalquil C_{4-10} opcionalmente substituído, alquenil C_{2-6} opcionalmente substituído, alcoxi C_{1-6} opcionalmente substituído, aril C_6 ou C_{10} opcionalmente substituído, piridinil opcionalmente substituído, pirimidinil opcionalmente substituído, tienil opcionalmente substituído, furanil opcionalmente substituído, tiazolil opcionalmente substituído, oxazolil opcionalmente substituído, fenoxi opcionalmente substituído, tiofenoxi opcionalmente substituído, sulfonamido opcionalmente substituído, uréia opcionalmente substituída, tiouréia opcionalmente substituída, amido opcionalmente substituído, ceto opcionalmente substituído, carboxil opcionalmente substituído, carbamil opcionalmente substituído, sulfeto opcionalmente substituído, sulfóxido opcionalmente substituído, sulfona opcionalmente substituída, amino opcionalmente substituído, alcoxiamino opcionalmente substituído, alquiloxiheterociclil opcionalmente substituído, alquilamino opcionalmente substituído, alquilcarboxi opcionalmente substituído, carbonil opcionalmente substituído, cicloalquil espirocíclico opcionalmente substituído, pirazinil

opcionalmente substituído, piridazinil opcionalmente substituído, pirrolil opcionalmente substituído, tiofenil opcionalmente substituído, tiazolil opcionalmente substituído, oxazolil opcionalmente substituído, imidazolil opcionalmente substituído, isoxazolil opcionalmente substituído, pirazolil opcionalmente substituído, isotiazolil opcionalmente substituído, naftil opcionalmente substituído, quinolinil opcionalmente substituído, isoquinolinil opcionalmente substituído, quinoxalinil opcionalmente substituído, benzotiazolil opcionalmente substituído, benzotiofenil opcionalmente substituído, benzofuranil opcionalmente substituído, indolil opcionalmente substituído e benzimidazolil opcionalmente substituído.

Em uma modalidade, o composto do Tipo IV não é:



onde X é N.

Será reconhecido que um composto particular aqui descrito pode ser um elemento de mais de um dos vários tipos descritos acima. Os compostos descritos aqui são úteis para modular um sistema de proteína quinase ativada por estresse (SAPK).

Uma outra modalidade está direcionada a compostos representados pelos Tipos de I a IV. O grau de pureza pode ser expresso como um percentual conforme descrito acima. Nas modalidades preferidas, compostos purificados representados pelos Tipos I a IV, possuem uma pureza de

cerca de 96% ou mais, mais preferivelmente de cerca de 98% ou mais, em peso com base no peso total da composição que compreende o composto purificado.

Os compostos do Tipo I a IV podem ser sintetizados utilizando-se várias reações convencionais conhecidas na técnica. Exemplos de síntese incluem os esquemas sintéticos apresentados nos Exemplos 6, 7, 8 e 9.

Como derivados de oxopiridina bicíclica, compostos do Tipo I podem também ser sintetizados por quaisquer reações convencionais conhecidas na técnica com base nos esquemas sintéticos conhecidos para oxopiridinas bicíclicas, tal como fornecido no Exemplo 6.

Como derivados de pirimidinil imidazol, compostos do Tipo II e IV podem também ser sintetizados por quaisquer reações convencionais conhecidas na técnica, incluindo aquelas baseadas nos esquemas sintéticos conhecidos para pirimidinil imidazol, por exemplo, conforme ilustrado nos Exemplos 7 e 9.

Como derivados de diaril uréia, compostos do Tipo III podem também ser sintetizados por quaisquer reações convencionais conhecidas na técnica, incluindo aquelas baseadas nos esquemas sintéticos conhecidos para diaril uréia, por exemplo, conforme ilustrado nos Exemplo 8.

Os materiais iniciais descritos aqui estão disponíveis comercialmente, são conhecidos, ou podem ser preparados por métodos conhecidos na técnica. Adicionalmente, os materiais iniciais não descritos aqui estão disponíveis comercialmente, são conhecidos ou podem ser preparados por métodos conhecidos na técnica.

Os materiais iniciais podem ter os substituintes

apropriados para finalmente fornecer os produtos desejados com os substituintes correspondentes. Alternativamente, os substituintes podem ser adicionados a qualquer ponto da síntese para dar finalmente os produtos desejados com os substituintes correspondentes.

O esquema sintético descrito no Exemplo 6 mostra métodos que podem ser usados para preparar os compostos do Tipo I. Os esquemas sintéticos descritos nos Exemplos 7 e 9 mostram métodos que podem ser usados para preparar os compostos do Tipo II e IV. O esquema sintético descrito no Exemplo 8 mostra métodos que podem ser usados para preparar os compostos do Tipo III. Alguém habilitado na técnica irá avaliar que vários diferentes esquemas de reação sintética podem ser usados para sintetizar os compostos dos Tipos I a IV. Também, alguém habilitado na técnica irá compreender que vários solventes diferentes, agentes de ligação, e condições de reação podem ser usados nas reações de síntese para produzir resultados comparáveis.

Qualquer um habilitado na técnica irá avaliar variações na seqüência e, também, irá reconhecer variações nas condições de reação apropriadas a partir das reações análogas mostradas ou de outra forma conhecidas que podem ser adequadamente usadas nos processos acima para produzir os compostos dos Tipos de I a IV.

Nos processos descritos aqui para a preparação, dos compostos dos Tipos I a IV, o uso de grupos protetores é geralmente bem reconhecido por aqueles habilitados na técnica de química orgânica, e consequentemente o uso de grupos protetores apropriados pode, em alguns casos, estar envolvidos pelos processos dos esquemas aqui, embora tais

grupos podem não estar expressamente ilustrados. A introdução e remoção de tais grupos protetores adequados são bem conhecidas na técnica da química orgânica; veja por exemplo, T.W. Greene, "Protective Groups in Organic Synthesis", Wiley (New York), 1999. Os produtos das reações descritos aqui podem ser isolados por meios convencionais tais como extração, destilação, cromatografia e etc.

Os sais, por exemplo, os sais farmaceuticamente aceitáveis, dos compostos dos Tipos I a IV podem ser preparados reagindo-se a base ou ácido apropriado com um equivalente estequiométrico dos compostos. Similarmente, os derivados farmaceuticamente aceitáveis (por exemplo, ésteres), metabólitos, hidratos, solvatos e pró-Fármacos dos compostos dos Tipos I a IV podem ser preparados por métodos geralmente conhecidos daqueles habilitados na técnica. Assim, uma outra modalidade fornece compostos que são pró-Fármacos de um composto ativo. Em geral, um pró-Fármaco é um composto que é metabolizado *in vivo* (por exemplo, por uma transformação metabólica tal como desaminação, desalquilação, desesterificação e etc.) para fornecer um composto ativo. Um "pró-Fármaco farmaceuticamente aceitável" significa um composto que é, do ponto de vista médico, adequado para uso farmacêutico em um paciente sem toxidade, irritação, resposta alérgica inadequadas e etc., e é efetivo para o uso objetivado, incluindo um éster farmaceuticamente aceitável assim como uma forma zwiteriônica, onde possível, dos compostos das modalidades. Exemplos de tipos de pró-Fármaco farmaceuticamente aceitáveis estão descritos em T. Higuchi e V. Stella, Pro-drugs as Novel Delivery Systems, Vol. 14

da A.C.S. Symposium Series, e em Edward B. Roche, ed., Bioreversible Carriers in Drug Design. American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987, ambos os quais estão aqui incorporados por referência.

Os compostos e composições descritos aqui podem também incluir metabólitos. Conforme aqui usado, o termo "metabólito" significa um produto do metabolismo de um composto das modalidades ou um sal farmaceuticamente aceitável, análogo ou derivado deste, que exibe uma atividade similar *in vitro* ou *in vivo* a um composto das modalidades. Os compostos e composições descritos aqui podem também incluir hidratos e solvatos. Conforme aqui usado, o termo "solvato" refere-se a um complexo formado por um soluto (aqui, um composto dos Tipos I a IV) e um solvente. Tais solventes para o propósito das modalidades preferivelmente não devem interferir com a atividade biológica do soluto. Os solventes podem ser, por meio de exemplo, água, etanol ou ácido acético. Em vista do precedente, a referência aqui a um composto particular ou tipo de compostos será compreendido para incluir as várias formas descritas acima, incluindo sais farmaceuticamente aceitáveis, ésteres, pró-Fármacos, metabólitos e solvatos destes.

Seleção de uma biblioteca de compostos para os inibidores preferenciais da p38γ:

Em um outro aspecto, é fornecido um método para identificar um composto farmaceuticamente ativo, por exemplo, para determinar se um composto é potencialmente útil como um agente terapêutico, por exemplo, para a prevenção ou tratamento de uma condição fibrótica (tal como

a condição associada com a p38 ou citoquina). O método inclui analisar uma pluralidade de compostos para inibição de uma p38γ, selecionar um composto que exibe uma potência relativamente alta para inibir uma p38γ, e também testar o composto selecionado para inibição da p38α e selecionar um composto que também exibe uma potência relativamente alta para inibir a p38α. O método também inclui analisar uma pluralidade de compostos para inibição de uma p38γ, selecionar um composto que exibe uma potência relativamente alta para inibir uma p38γ e que também exibe uma potência relativamente alta para inibir uma p38α. O método inclui analisar uma pluralidade de compostos para inibição de uma p38α, selecionar um composto que exibe uma potência relativamente alta para inibir uma p38α e que também exibe uma potência relativamente alta para inibir uma p38γ. Preferivelmente, um IC_{50} de tal composto inibidor da p38γ e p38α de alta potência está na faixa de cerca de 10 pM e cerca de 500 μM, preferivelmente de cerca de 10 pM a cerca de 5 μM ou de cerca de 100 nM a cerca de 500 μM, mais preferivelmente de cerca de 500 pM a cerca de 1 μM, ainda mais preferivelmente de cerca de 500 pM a cerca de 1 μM para inibição da p38γ. Preferivelmente, um valor de IC_{50} contra p38α de tal composto inibidor da p38γ e p38α de alta potência é maior que duas vezes seu valor de IC_{50} contra a p38γ. Mais preferivelmente, um valor de IC_{50} contra p38α de tal composto inibidor da p38γ e p38α de alta potência é maior que cinco vezes seu valor de IC_{50} contra a p38γ. Ainda mais preferivelmente, um valor de IC_{50} contra p38α de tal composto inibidor da p38γ e p38α de alta potência é maior que dez vezes seu valor de IC_{50} contra a p38γ. A pluralidade

de compostos a serem analisados é preferivelmente selecionada a partir de uma biblioteca de compostos potenciais. A análise da pluralidade de compostos da biblioteca pode ser conduzida de várias formas. Por exemplo, em algumas modalidades, os métodos também compreendem contatar uma MAPK p38 com a pluralidade de compostos, e determinar se os compostos inibem a atividade de citoquinas. A MAPK p38 é preferivelmente selecionada a partir do grupo consistindo da p38α e p38γ. Em modalidades preferidas, a etapa de contato ocorre *in vitro*; em certas modalidades preferidas, a etapa de contato compreende contatar uma célula compreendendo a MAPK p38 com o composto.

Em ainda uma outra modalidade, são fornecidos métodos para inibir a atividade da MAPK p38 em uma célula, *in vitro* ou *in vivo*. Em geral, tais métodos incluem contatar uma célula contendo uma p38. A MAPK com uma quantidade de inibição da p38 efetiva de um composto (por exemplo, um composto do Tipo I a IV), sob condições tal que a atividade da p38 na célula seja inibida. Exemplos de tais métodos são fornecidos na seção de Exemplos abaixo. O composto exibe preferivelmente um IC_{50} na faixa de cerca de 10 pm a cerca de 500 μM, preferivelmente de cerca de 10 pM a cerca de 5 μM ou de cerca de 100 nM a cerca de 500 μM, mais preferivelmente de cerca de 500 pM a cerca de 1 μM, ainda preferivelmente de cerca de 500 pM a cerca de 1 μM para inibição da p38γ. Preferivelmente, um valor de IC_{50} contra a p38α do composto é maior que duas vezes seu valor de IC_{50} contra a p38γ.

Métodos *in vivo* incluem, por exemplo, a introdução em

um grupo de animais oralmente ou pela injeção de um composto de interesse (por exemplo, um composto do Tipo I a IV) em várias concentrações. Seguindo a introdução do composto, o lipopolissacarídeo é administrado de forma intravenosa. Níveis de TNF-α no soro são medidos e comparados àquele dos animais de controle. Os compostos preferidos inibem a liberação de TNF-α, reduzindo assim os níveis de TNF-α nas amostras de sangue dos animais testados. O composto exibe preferivelmente um EC_{50} na faixa de cerca de 10 pM a cerca de 5 μM, mais preferivelmente de cerca de 500 pM a cerca de 1 μM, ainda mais preferivelmente de cerca de 500 pM a cerca de 1 μM para inibição da liberação de TNF-α.

O método de identificação de um composto farmaceuticamente ativo pode também incluir a determinação de uma toxidade para mamíferos do composto selecionado. Tais métodos são geralmente conhecidos daqueles habilitados na técnica. O método de identificação de um composto farmaceuticamente ativo pode também incluir administrar o composto selecionado a um indivíduo de teste, ou em conjunção com a determinação da toxidade para mamíferos ou por outras razões. Em uma modalidade, o indivíduo de teste possui ou estar em risco de possuir uma condição inflamatória. Preferivelmente, o indivíduo de teste é um mamífero e pode ser um humano.

Métodos de inibição da MAP quinase p38

Em uma modalidade, os métodos são fornecidos para modular um sistema de SAPK, *in vitro* ou *in vivo*. Os métodos incluem contatar uma concentração de modulação de SAPK de um composto com uma MAPK p38 (por exemplo, contatando-se o

composto com uma célula ou tecido contendo a MAPK p38), onde o composto possui uma potência relativamente alta para inibição da p38γ, correspondendo a uma concentração inibitória relativamente alta para inibição da MAPK p38 pelo composto.

A concentração inibitória (IC) é a concentração que resulta em uma redução na atividade da MAPK p38 por um percentual específico (por exemplo, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%) em uma curva do tipo dose-resposta. Por exemplo, IC_{50}, IC_{40}, IC_{30}, IC_{20} e IC_{10} são determinados como concentrações que resultam em reduções na atividade da MAPK p38 em 50%, 40%, 30%, 20% e 10%, respectivamente, em uma curva do tipo dose-resposta. O IC_{50} do composto de modulação do sistema de MAPK está preferivelmente na faixa de cerca de 10 pm a cerca de 500 μM, preferivelmente de cerca de 10 pM a cerca de 5 μM ou de cerca de 100 nM a cerca de 500 μM, mais preferivelmente de cerca de 50 pM a cerca de 1 μM, ainda preferivelmente de cerca de 50 pM a cerca de 1 μM para inibição da p38γ.

A expressão "contatar uma célula" refere-se a uma condição em que um composto ou outra composição de interessa está em contato direto com uma célula ou tecido, ou está perto o suficiente para induzir um efeito biológico desejado em uma célula ou tecido. Por exemplo, o contato de uma célula ou tecido contendo a MAPK p38 com um composto pode ser conduzido de qualquer maneira que permita uma interação entre a MAPK p38 e o composto, resultando no efeito biológico desejado em uma célula. O contato de um célula ou tecido pode ser executado, por exemplo, pela misturação ou administração de um composto (tal como um

composto do Tipo I a IV; e/ou sal, éster, pró-Fármaco e;ou intermediário deste, e/ou uma composição farmacêutica compreendendo um ou mais dos precedentes).

Alternativamente, o contato de uma célula ou tecido pode ser executado introduzindo-se um composto de uma maneira tal que o composto será objetivado, diretamente ou indiretamente, a uma célula ou tecido contendo a MAPK p38. O contato de uma célula ou tecido pode ser executado sob condições tais que um composto se ligue à MAPK p38. Tais condições podem incluir proximidade do composto e tecido ou célula que contêm a p38, pH, temperatura, ou qualquer condição que afete a ligação de um composto à MAPK p38.

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

Quando a célula é contatada *in vivo*, a concentração efetiva (EC) é uma concentração que resulta em uma redução na atividade da MAPK p38 por um percentual específico (por exemplo, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%) conforme medido por uma resposta fisiológica específica que depende na redução da atividade da MAPK p38. Tal resposta fisiológica, pode ser, por exemplo, a redução na concentração da TNF-α do sangue ou de outro fluido corporal. Por exemplo, a EC_{50}, EC_{40}, EC_{30}, EC_{20} e EC_{10} são determinadas como concentrações que resultam em reduções na atividade da MAPK p38 conforme medido pela redução na concentração da TNF-α em 50%, 40%, 30%, 20% e 10%, respectivamente, em uma curva do tipo dose-resposta. A EC_{50} do composto de modulação do sistema de MAPK está preferivelmente na faixa de cerca de 10 pm a cerca de 500 μM, preferivelmente de cerca de 10 pM a cerca de 5 μM ou de

cerca de 100 nM a cerca de 500 μM, mais preferivelmente de cerca de 500 pM a cerca de 1 μM, ainda preferivelmente de cerca de 500 pM a cerca de 1 μM para inibição da p38γ.

Em certas modalidades, o composto é fornecido na forma de uma composição farmacêutica, junto com um veículo farmaceuticamente aceitável.

Métodos de tratamento e/ou prevenção

Uma outra modalidade fornece métodos para tratar ou prevenir estados de doença, por exemplo, condição(ões) fibrótica(s). Os métodos incluem identificar um indivíduo em risco de ou tendo uma condição fibrótica e administrar um composto ao indivíduo em uma quantidade efetiva para tratar ou prevenir a condição fibrótica. Em modalidades preferidas, o composto exibe preferivelmente um IC_{50} na faixa de cerca de 10 pm a cerca de 500 μM, preferivelmente de cerca de 10 pM a cerca de 5 μM ou de cerca de 100 nM a cerca de 500 μM, mais preferivelmente de cerca de 500 pM a cerca de 1 μM, ainda preferivelmente de cerca de 500 pM a cerca de 1 μM para inibição da p38γ. Nas modalidades preferidas, um valor de IC_{50} contra a p38α do composto é maior que duas vezes seu valor de IC_{50} contra a p38γ. Nas modalidades preferidas, a quantidade efetiva produz um sangue ou soro ou uma outra concentração de fluido corporal que é igual ou menor que um IC_{50} ou um IC_{40}, ou um IC_{30}, ou um IC_{20}, ou um IC_{10} para inibição da p38γ pelo composto e além disso a quantidade efetiva produz uma concentração de sangue ou soro ou outro fluido corporal que é igual ou menor que um IC_{50} ou um IC_{40}, ou um IC_{30}, ou um IC_{20}, ou um IC_{10} para inibição da p38 pelo composto. Nas modalidades preferidas, o composto exibe uma EC_{50} na faixa de cerca de

10 pM a cerca de 5 μM, mais preferivelmente de cerca de 500 pM a cerca de 1 μM, ainda mais preferivelmente de cerca de 500 pM a cerca de 1 μM para inibição da inibição da secreção de TNF-α. Em outras modalidades preferidas, a quantidade efetiva produz uma concentração de sangue ou soro ou um outro fluido corporal que é igual a ou menor que uma EC50, ou uma EC_{40}, ou uma EC_{30}, ou uma EC_{20}, ou uma EC_{10} para inibição da liberação da TNF-α estimulada por LPS em um fluido corporal pelo composto. A quantidade efetiva é preferivelmente cerca de 70% ou menos, mais preferivelmente menor que cerca de 50%, de uma quantidade que causa um efeito colateral indesejável no indivíduo, tal que, mas não limitado à sonolência, distúrbio gastrointestinal e erupções de fotosensibilidade. O composto usado para o tratamento ou prevenção é preferivelmente um composto do Tipo I a IV.

Métodos para identificar um indivíduo em risco de ou possuindo uma condição fibrótica são conhecidos daqueles habilitados na técnica. Exemplos de condições fibróticas que podem ser tratadas ou prevenidas pelos métodos descritos aqui incluem condições associadas à p38, por exemplo, condições associadas com a atividade da citoquina, condições associadas com a modulação de um sistema de SAPK, doenças autoimunes, e doenças associadas com fibrose. A(s) citoquina (ou citoquinas) é (são) preferivelmente selecionada(s) a partir do grupo consistindo de, mas não limitada a IL-1β, IL-6, IL-8 e TNF-α. Em uma modalidade, o composto usado para tratar ou prevenir a condição inflamatória é um composto que inibe uma quinase na via de sinalização da SAPK. exemplos de compostos preferidos

incluem os compostos do Tipo I a IV.

O termo "condição associada com a p38" significa uma doença ou outra condição deletéria em que a via de sinalização da quinase MAP p38 está envolvido, se diretamente ou indiretamente. Exemplos das condições associadas com a p38 incluem as condições causadas pela desregulação superexpressão da IL-1β, TNF-α, IL-6 ou IL-8 resultante dos níveis sustentados, prolongados, aumentados ou elevados da atividade da p38. Tais condições incluem, sem limitação, doenças inflamatórias, doenças autoimunes, doenças fibróticas, distúrbios destrutivos nos ossos, distúrbios proliferativos, doenças infecciosas, doenças neurodegenerativas, isquemia e reperfusão em derrame, ataques do coração, distúrbios angiogênicos, hipóxia de órgão, hiperplasia vascular, hipertrofia cardíaca, agregação de plaqueta induzida por trombina e condições associadas com a prostaglandina ou vias da ciclooxigenase, por exemplo, condições envolvendo a prostaglandina endoperóxido sintase. Uma condição associada com a p38 pode incluir qualquer condição associada com ou mediada por uma isoforma da p38.

Uma "condição fibrótica", "condição fibroproliferativa", "doença fibrótica", "doença fibroproliferativa", "distúrbio fibrótico" e "distúrbio fibroproliferativo" são usados de forma intercambiável para se referir a uma condição, doença ou desordem que é caracterizada pela proliferação ou atividade desregulada dos fibroblastos e/ou acúmulo patológico e/ou excessivo do tecido colágeno. Tipicamente, qualquer tal doença, distúrbio ou condição é receptivo ao tratamento pela

administração de um composto descrito aqui. As desordens fibróticas, incluem, mas não estão limitadas à fibrose pulmonar, incluindo fibrose pulmonar idiopática (IPF) e fibrose pulmonar a partir de uma etiologia conhecida, fibrose do fígado e fibrose real. Outras condições fibróticas exemplares incluem fibrose musculoesquelética, fibrose cardíaca, adesões pós-cirúrgicas, escleroderma, glaucoma e lesões de pele tais como quelóides.

A expressão "modular o sistema da SAPK" significa aumentar ou diminuir a atividade do sistema da proteína quinase ativada por estresse, por exemplo, inibindo a atividade da p38 ou *in vitro* ou *in vivo*. Em certas modalidades, o sistema da SAPK é modulado quando a atividade de p38 em uma célula é inibida em cerca de 50%, em cerca de 40%, em cerca de 30%, em cerca de 20%, ou em cerca de 10% comparada à atividade da p38 de uma célula de controle não tratada.

Uma condição associada com a atividade de citoquina alterada, conforme aqui usado, refere-se a uma condição em que a atividade da citoquina é alterada comparada a um estado não doente. Isto inclui, mas não está limitado às condições causadas pela superprodução ou desregulação da IL-1β, TNF-α, IL-6 ou IL-8 resultando em níveis sustentados, prolongados, aumentados ou elevados da atividade da citoquina, que pode estar associada com a atividade da p38. Tais condições incluem, sem limitação, doenças inflamatórias, doenças autoimunes, doenças fibróticas, distúrbios destrutivos nos ossos, distúrbios proliferativos, doenças infecciosas, doenças neurodegenerativas, reperfusão/isquemia em derrame, ataques

do coração, distúrbios angiogênicos, hipóxia de órgão, hiperplasia vascular, hipertrofia cardíaca, agregação de plaqueta induzida por trombina e condições associadas com as vias de sinalização da ciclooxigenase e lipoxigenase, tais como a prostaglandina endoperóxido sintase. Uma condição associada à citoquina pode incluir qualquer condição associada com ou mediada pela IL-1 (particularmente a IL-1β), TNF-α, IL-6 ou IL-8, ou qualquer outra citoquina que possa ser regulada pela p38. Em modalidades preferidas, a citoquina associada é uma condição associada com a TNF-α.

Os métodos descritos aqui podem também ser usados para tratar as doenças autoimunes e doenças associadas com inflamação crônica e aguda. Estas doenças incluem, mas não estão limitadas a: Doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD), fibrose pulmonar inflamatória (IPF), artrite reumatóide, espondilite reumatóide, osteoartrite, gota, outras condições artríticas, sepse; choque séptico, choque endotóxico, sepse gram-negativa, síndrome de choque tóxico, síndrome da dor miofascial (MPS), siguelose; asma; síndrome de estresse respiratório do adulto, doença inflamatória do intestino, doença de Crohn, psoríase, eczema; colite ulcerativa, nefrite glomerular, escleroderma, tiroidite crônica, doença de Graves, doença de Ormond, gastrite autoimune, miastenia grave, anemia hemolítica autoimune, neutropenia autoimune, trombocitopenia; fibrose pancreática, hepatite crônica ativa incluindo fibrose hepática, doença renal aguda e crônica, fibrose renal, síndrome do intestino irritável, pirese; restenose, malária cerebral, derrame e dano isquêmico, trauma neural, doença

de Alzheimer, doença de Huntington, doença de Parkinson, dor aguta e crônica, alergias incluindo rinite alérgica e conjuntivite alérgica, hipertrofia cardíaca, falência crônica do coração, síndrome coronária aguda, caquexia, malária, lepra; leishimaniose; doença de Lyme, síndrome de Reiter; sinovite aguda, degeneração muscular, bursite, tendinite, tenosinovite, síndrome de disco intervertebral herniado, rompido ou prolapsado, osteopetrose, trombose, silicose, sarcose pulmonar, doenças de reabsorção de ossos, tais como osteoporose ou distúrbios de ossos relacionados a mieloma múltiplo, câncer, incluindo mas não limitado a carcinoma de mama metástatico, carcinoma coloretal, melanoma malígno, câncer gástrico e câncer de pulmão de célula não pequena, reação do enxerto versus hospedeiro, e doenças autoimunes, tais como Esclerose Múltipla, lupus e fibromialgia, AIDS e outras doenças virais tais como Herpes Zoster, Herpes Simplex I ou II, vírus influenza, Síndrome Respiratória Aguda Severa (SARS) e citomegalovírus e diabetes mellitus. Além disso, os métodos das modalidades podem ser usados para tratar os distúrbios proliferativos (incluindo tanto hiperplasia benigna quanto maligna), incluindo leucemia mielogenosa aguda, leucemia mielogenosa crônica, sarcoma de Kaposi, mieloma múltiplo, câncer de mama, incluindo carcinoma de mama metatástico, carcinoma colorretal, metástase em ossos e etc., distúrbios da dor incluindo dor neuromuscular, dor de cabeça, dor de câncer, dor dental e dor de artrite, distúrbios angiogênicos incluindo angiogênese de tumor sólido, neovascularização e hemangioma infantil, condições associadas com as vias de sinalização da ciclooxigenase e lipoxigenase, incluindo

condições associadas com a prostaglandina endoperóxido sintase-2 (incluindo edema, febre, analgesia e dor), hipóxia de órgão, agregação plaquetária induzida por trombina. Além disso, os métodos descritos aqui podem ser úteis para o tratamento de doenças protozoárias em animais, incluindo mamíferos.

Um indivíduo pode incluir uma ou mais células ou tecidos, ou organismos. Um indivíduo preferido é um mamífero. Um mamífero pode incluir qualquer animal. Como um exemplo não limitante, mamíferos preferidos incluem criação de gado, porcos, carneiro, cabra, cavalos, camelos, búfalo, gatos, cachorros, ratos, camundongos e humanos. Um indivíduo mamífero altamente preferido é um humano. O(s) composto(s) pode(m) ser administrado(s) ao indivíduo através de qualquer rota de entrega de Fármaco conhecida na técnica. Rotas de administração exemplares incluem oral, ocular, retal, bucal, tópica, nasal, oftálmica, subcutânea, intramuscular, intravenosa (bolo e infusão), intracerebral, transdérmica e pulmonar.

A expressão "quantidade efetiva" conforme usado no contexto de "quantidade terapeuticamente efetiva" e "quantidade profilaticamente efetiva", conforme aqui usadas, refere-se a uma quantidade de um composto suficiente para tratar, melhorar ou prevenir a doença ou condição identificada, ou para exibir um efeito terapêutico, profilático ou inibitório detectável. O efeito pode ser detectável, por exemplo, por ensaios divulgados nos exemplos a seguir. A quantidade efetiva precisa para um indivíduo irá depender do peso do corpo do indivíduo, tamanho e saúde, da natureza e grau da condição, e da

terapêutica ou combinação de terapêuticas selecionadas para administração. Quantidades terapeuticamente e profilaticamente efetivas para uma dada situação podem ser determinadas por experimentação rotineira que faz parte das habilidades e julgamento do clínico. Preferivelmente, a quantidade efetiva do composto das modalidades produz uma concentração de sangue ou soro ou um outro fluido corpóreo que é menor que um IC_{50} , IC_{40}, IC_{30}, IC_{20} ou IC_{10} para inibição da quinase MAP p38. Preferivelmente, a quantidade efetiva do composto das modalidades produz uma concentração de sangue ou soro ou um outro fluido corpóreo que é efetivo para alterar a secreção de TNF-α do sangue total em 10%, 15%, 20%, 30%, 40% ou 50%.

Para qualquer composto, a quantidade terapeuticamente ou profilaticamente efetiva pode ser estimada inicialmente ou nos ensaios de cultura de célula, por exemplo, de células neoplásticas, ou em modelos de animal, frequentemente ratos, camundongos, coelhos, cachorros ou porcos. O modelo animal pode também ser usado para determinar a faixa de concentração e rota de administração apropriadas. Tal informação pode então ser usada para determinar doses e rotas úteis para administração em humanos.

A eficácia terapêutica/profilática e toxidade podem ser determinadas por procedimentos farmacêuticos padrões em culturas de célula ou animais experimentais, por exemplo, ED_{50} (dose terapeuticamente efetiva em 50% da população) e LD_{50} (dose letal para 50% da população). A relação da dose entre os efeitos terapêuticos e tóxicos é o índice terapêutico e pode ser expressado como a relação ED_{50}/LD_{50}.

As composições farmacêuticas que exibem grandes índices terapêuticos são preferidas. Entretanto, as composições farmacêuticas que exibem índices terapêuticos limitados estão também inseridas no escopo das modalidades. Os dados obtidos a partir dos ensaios de cultura de célula e estudos em animais podem ser usados na formulação de uma faixa de dosagem para uso humano. A dosagem contida em tais composições está preferivelmente dentro de uma faixa de concentrações circulatória que incluem um ED_{50} com pouca ou nenhuma toxidade. A dosagem pode variar dentro desta faixa dependendo da forma de dosagem empregada, sensibilidade do paciente e rota de administração.

A dosagem exata será determinada pelo médico, à luz de fatores relacionado ao indivíduo que requer tratamento. A dosagem e administração são ajustadas para fornecer níveis suficientes do(s) agente(s) ativo(s) ou para manter o efeito desejado. Fatores que podem ser lavados em consideração incluem a severidade do estado da doença, saúde geral do indivíduo, idade, peso e gênero do indivíduo, dieta, tempo e frequência de administração, combinação(ões), sensibilidades de reação, e tolerância/resposta à terapia. As composições farmacêuticas de ação prolongada podem ser administradas a cada 3 a 4 dias, a cada semana, ou a cada duas semanas dependendo da meia-vida e taxa de depuração da formulação particular.

Será avaliado que o tratamento conforme descrito aqui inclui a prevenção de uma doença, o melhoramento dos sintomas, a diminuição do progresso da doença, reversão de danos ou cura da doença.

Em um aspecto, o tratamento de uma condição fibrótica

resulta em um aumento no tempo de sobrevivência médio de uma população de indivíduos tratados em comparação a uma população de indivíduos não tratados. Preferivelmente, o tempo de sobrevivência médio é aumentado em mais de cerca de 30 dias, mais preferivelmente em mais de cerca de 60 dias, mais preferivelmente em mais de cerca de 90 dias, e ainda mais preferivelmente em mais de cerca de 120 dias. Um aumento no tempo de sobrevivência de uma população pode ser medido por quaisquer meios reprodutíveis. Em um aspecto preferido, um aumento na taxa de sobrevivência de uma população pode ser medido, por exemplo, calculando-se para uma população a duração de sobrevivência média depois do início do tratamento com um composto ativo. Em um outro aspecto preferido, um aumento no tempo de sobrevivência médio de uma população pode ser medido, por exemplo, calculando-se para uma população a duração de sobrevivência média depois da finalização de um primeiro ciclo de tratamento com um composto ativo.

Em um outro aspecto, o tratamento de uma condição fibrótica resulta em uma diminuição na taxa de mortalidade de uma população de indivíduos tratados em comparação a uma população de indivíduos recebendo veículo apenas. Em um outro aspecto, o tratamento de uma condição fibrótica resulta em uma diminuição na taxa de mortalidade de uma população de indivíduos tratados em comparação a uma população não tratada. Em um aspecto adicional, o tratamento de uma condição fibrótica resulta em uma diminuição na taxa de mortalidade de uma população de indivíduos tratados em comparação a uma população recebendo monoterapia com uma Fármaco que não é um composto das

modalidades, ou um sal farmaceuticamente aceitável, metabólito, análogo ou derivado deste. Preferivelmente, a taxa de mortalidade é diminuída em mais de cerca de 2%, mais preferivelmente em mais de cerca de 5%, mais preferivelmente em mais de cerca de 10%, e mais preferivelmente em mais de cerca de 25%. Em um aspecto preferido, uma diminuição na taxa de mortalidade de uma população de indivíduos tratados pode ser medida por quaisquer meios reprodutíveis. Em um outro aspecto preferido, uma diminuição da taxa de mortalidade de uma população pode ser medida, por exemplo, calculando-se para uma população o número médio de mortes relacionadas à doença por tempo unitário depois do início do tratamento com um composto ativo. Em um outro aspecto preferido, uma diminuição na taxa de mortalidade de uma população pode também ser medida, por exemplo, calculando-se para uma população o número médio de mortes relacionadas à doença por tempo unitário depois da finalização de um primeiro ciclo de tratamento com um composto ativo.

Em um outro aspecto, o tratamento de uma condição fibrótica resulta em uma diminuição da taxa de crescimento de um tumor. Preferivelmente, após o tratamento, a taxa de crescimento do tumor é reduzida em pelo menos cerca de 5% em relação ao tratamento inicial, mais preferivelmente a taxa de crescimento do tumor é reduzida em pelo menos cerca de 10%, mais preferivelmente, reduzida em pelo menos cerca de 20%, mais preferivelmente reduzida em pelo menos cerca de 30%, mais preferivelmente reduzida em pelo menos cerca de 40%, mais preferivelmente reduzida em pelo menos cerca de 50%, ainda mais preferivelmente reduzida em pelo menos

cerca de 60%, e ainda mais preferivelmente reduzida em pelo menos cerca de 75%. A taxa de crescimento do tumor pode ser medida por qualquer meio reprodutível de medição. Em um aspecto preferido, a taxa de crescimento do tumor é medida de acordo com uma mudança no diâmetro do tumor por tempo unitário.

Em um outro aspecto, o tratamento de uma condição fibrótica resulta em uma redução na taxa de proliferação celular. Preferivelmente, após o tratamento, a taxa de proliferação celular é reduzida em pelo menos cerca de 5%, mais preferivelmente em pelo menos cerca de 10%, mais preferivelmente em pelo menos cerca de 20%, mais preferivelmente em pelo menos cerca de 30%, mais preferivelmente em pelo menos cerca de 40%, mais preferivelmente em pelo menos cerca de 50%, ainda mais preferivelmente em pelo menos cerca de 60%, e ainda mais preferivelmente em pelo menos cerca de 75%. A taxa de proliferação celular pode ser medida por qualquer meio reprodutível de medição. Em um aspecto preferido, a taxa de proliferação celular é medida, por exemplo, medindo-se o número de células em divisão em uma amostra de tecido por tempo unitário.

Em um outro aspecto, o tratamento de uma condição fibrótica resulta em uma redução na proporção de proliferação celular. Preferivelmente, após o tratamento, a proporção de proliferação celular é reduzida em pelo menos cerca de 5%, mais preferivelmente em pelo menos cerca de 10%, mais preferivelmente em pelo menos cerca de 20%, mais preferivelmente em pelo menos cerca de 30%, mais preferivelmente em pelo menos cerca de 40%, mais

preferivelmente em pelo menos cerca de 50%, ainda mais preferivelmente em pelo menos cerca de 60%, e ainda mais preferivelmente em pelo menos cerca de 75%. A proporção de células em proliferação pode ser medida por qualquer meio reprodutível de medição. Em um aspecto preferido, a proporção de células em proliferação é medida, por exemplo, quantificando-se o número de células em divisão em relação ao número de células que não estão em divisão em uma amostra do tecido. Em um outro aspecto, a proporção de células em proliferação é equivalente ao índice mitótico.

Em um outro aspecto, o tratamento de uma condição fibrótica resulta em uma redução no tamanho de uma área ou zona de proliferação celular. Preferivelmente, após o tratamento, tamanho de uma área ou zona de proliferação celular é reduzida em pelo menos cerca de 5% em relação a seu tamanho antes do tratamento, mais preferivelmente é reduzida em pelo menos cerca de 10%, mais preferivelmente, reduzida em pelo menos cerca de 20%, mais preferivelmente reduzida em pelo menos cerca de 30%, mais preferivelmente reduzida em pelo menos cerca de 40%, mais preferivelmente reduzida em pelo menos cerca de 50%, ainda mais preferivelmente reduzida em pelo menos cerca de 60%, e ainda mais preferivelmente reduzida em pelo menos cerca de 75%. O tamanho de uma área ou zona de proliferação celular pode ser medida por qualquer meio reprodutível de medição. Em um aspecto preferido, o tamanho de uma área ou zona de proliferação celular pode ser medida como um diâmetro ou largura de uma área ou zona de proliferação celular.

Os métodos descritos aqui podem incluir a identificação de um indivíduo em necessidade de tratamento.

Em uma modalidade preferida, os métodos incluem identificar um mamífero em necessidade de tratamento. Em uma modalidade altamente preferida, os métodos incluem identificar um humano em necessidade de tratamento. A identificação de um indivíduo em necessidade de tratamento pode ser executada por quaisquer meios que indiquem um indivíduo que possa se beneficiar do tratamento. Por exemplo, a identificação de um indivíduo em necessidade de tratamento pode ocorrer através de diagnose clínica, testes de laboratório, ou quaisquer outros meios conhecidos daqueles habilitados na técnica, incluindo qualquer combinação de meios para identificação.

Conforme descritos aqui em outras partes do texto, os compostos descritos aqui podem ser formulados em composições farmacêuticas, se desejado, e podem ser administrados por qualquer rota que permita o tratamento da doença ou condição. Uma rota preferida de administração é a administração oral. A administração pode tomar a forma de uma administração de dose única, ou o composto das modalidades pode ser administrado por um período de tempo, ou em doses divididas ou em uma formulação ou método de administração de liberação contínua (por exemplo, uma bomba). Entretanto, os compostos das modalidades são administrados ao indivíduo, as quantidades do composto administrado e a rota de administração escolhida devem ser selecionadas para permitir o tratamento eficaz da condição da doença.

Os métodos das modalidades também incluem o uso de um composto ou compostos conforme descritos aqui junto com um ou mais agentes terapêuticos adicionais para o tratamento

de condições de doença. Assim, por exemplo, a combinação de ingredientes ativos pode ser: (1) co-formulada e administrada ou entregue simultaneamente em uma formulação combinada; (2) entregue alternadamente ou em paralelo como formulações separadas; (3) por qualquer outro regime de terapia de combinação conhecido na técnica. Quando entregue em terapia alternada, os métodos descritos aqui podem compreender administrar ou entregar os ingredientes ativos seqüencialmente, por exemplo, em solução, emulsão, suspensão, comprimidos, pílulas ou cápsulas separadas ou por injeções diferentes em seringas separadas. Em geral, durante a terapia alternada, uma dosagem efetiva de cada ingrediente ativo é administrada seqüencialmente, isto é, serialmente, enquanto que na terapia simultânea, as dosagens efetivas de dois ou mais ingredientes ativos são administrados juntos. Várias seqüências de terapia de combinação intermitente podem também ser usadas.

Os testes de diagnóstico são considerados como parte dos métodos aqui descritos. Por exemplo, uma amostra para biopsia de tecido pode ser tomada de um indivíduo sofrendo de uma condição fibrótica, por exemplo, uma condição associada à p38 ou associada à citoquina. A amostra para biopsia pode ser testada para determinar o nível de atividade da p38 (ou níveis de citoquinas) presentes na amostra; a amostra pode então ser contatada com um composto selecionado das modalidades, e a atividade da p38 (níveis de citoquina) medida para determinar se o composto possui o efeito desejado (por exemplo, inibição da p38 ou atividade da citoquina com um IC_{50} na faixa de cerca de 10 pM e cerca de 500 pM, preferivelmente de cerca de 10 pM a cerca de 5

μM ou de cerca de 100 nM a cerca de 500 μM, mais preferivelmente de cerca de 50 pM a cerca de 1 μM, ainda mais preferivelmente de cerca de 50 pM a cerca de 1 μM para inibição da p38γ, e com um valor de IC_{50} para inibição da p38α pelo menos duas vezes o valor de IC_{50} para a inibição da p38γ). Tal teste pode ser usado para determinar se o tratamento com tal composto é provavelmente efetivo naquele indivíduo. Alternativamente, a amostra pode ser contatada com um composto marcado (por exemplo, um composto marcado de forma fluorescente, ou um composto marcado com radioatividade) e a amostra é então examinada e o sinal fluorescente ou radioativo é detectado para determinar a distribuição da p38 na amostra do tecido. Amostras para biopsia repetidas tomadas durante um curso do tratamento podem também ser usadas para estudar a eficácia do tratamento. Outros testes de diagnóstico que utilizam os compostos descritos aqui serão aparentes àqueles habilitados na técnica à luz dos ensinamentos desta especificação.

Assim, por exemplo, uma modalidade fornece métodos para determinação da presença, localização e/ou quantidade da proteína p38 em uma célula ou amostra do tecido. Os métodos incluem: a) contatar a célula ou amostra do tecido com um composto das modalidades sob condições tais que o composto possa se ligar a uma MAPK p38; e b) determinar a presença, localização e/ou quantidade do composto na célula ou amostra de tecido, determinando assim a presença, localização e/ou quantidade da MAPK p38 na célula ou amostra de tecido. A determinação da presença, localização e/ou quantidade do composto na célula ou amostra de tecido

pode ser conduzida por qualquer meio que revele a presença, localização e/ou quantidade do composto na célula ou tecido. Por exemplo, conforme descritos previamente, métodos radioativos ou fluorescentes podem ser usados. Métodos adicionais de determinação da presença, localização e/ou quantidade do composto será aparente à aquele habilitado na técnica.

Uma outra modalidade fornece métodos para determinar: (1) se um composto será um agente terapêutico útil para tratamento de um indivíduo sofrendo de uma condição inflamatória, ou (2) a severidade da doença ou (3) o curso da doença durante o tratamento com um agente modificador da doença. Os métodos incluem: a) obter uma célula ou amostra de tecido a partir de um indivíduo antes, durante e após o término do tratamento com um composto conforme aqui descrito ou um outro agente modificador da doença; b) contatar a amostra com o composto; e c) determinar a quantidade do composto que se liga à amostra, onde a ligação à MAPK p38 pelo composto está relacionada à quantidade de MAPK p38 na amostra.

EXEMPLOS ESPECÍFICOS DE DOENÇAS CONSIDERADAS PARA SEREM TRATADAS PELOS COMPOSTOS E MÉTODOS AQUI DESCRITOS

COPD

A doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD) é caracterizada por um processo inflamatório crônico no pulmão que inclui (1) número aumentado de células inflamatórias (neutrófilos, macrófagos e células $SD8^{+}T$) nas vias aéreas e parênquima, (2) expressão de citoquina inflamatória e quimoquina aumentada, e (3) número aumentado de proteases (elastases, catepsinas e metaloproteinases da

matriz, MMPs). Acredita-se que a produção e a ação de muitos dos mediadores potenciais da inflamação das vias aéreas sejam dependentes da MAPK induzida por estresse ou pela cascata da quinase p38. Vários relatos suportam a associação da ativação da quinase pf p38 com um excesso de eventos pulmonares: expressão da molécula-1 de adesão intercelular induzida por TNF-α e LPS em células endoteliais microvascular pulmonar, ativação da MMP-9, estímulo das células arteriais pulmonares induzido por hipóxia, expressão da IL-8 induzida por hiperosmolaridade em células epiteliais brônquicas, e tráfego e sobrevivência de eosinófilo aumentados.

Trifilieff e outros (2005 *Brit J Pharmacol* 144:1002-10) relatou que o CGH2466, um antagonista do receptor de adenosina combinado, MAPK p38 e inibidor da fosfodiesterase tipo 4 mostraram-se potentes em atividades antiinflamatórias *in vitro* e *in vivo* em doenças tais como asma e COPD. Underwood e outros (2000 *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279:L895-L902) demonstrou que o inibidor da MAPK p38 potente e seletivo, SB239063, reduziu a produção de citoquina pró-inflmatória, incluindo IL-1β, TNF-α, IL-6 e IL-8, que foi ligado à fibrose das vias aéreas por causa de sua capacidade de regular a proliferação do fibroblasto e a produção da matriz, que leva ao tráfego de neutrófilo diminuído e ativação no pulmão. Anteriormente, descobriu-se que o mesmo composto foi capaz de alterar as respostas associadas com a fibrose crônica induzida por bleomicina. Esta atividade inibitória era seletiva para as isoformas α e β da p38. Os compostos e métodos descritos aqui são úteis no tratamento de COPD.

Fibrose Pulmonar

A fibrose pulmonar também chamada de fibrose pulmonar idiopática (IPF), fibrose pulmonar difusa intersticial, fibrose pulmonar inflamatória ou alveolite fibrosante, é um distúrbio inflamatório do pulmão e um grupo heterogêneo de condições caracterizado pela formação anormal do tecido fibroso entre os alvéolos causada pela alveolite compreendendo uma infiltração celular inflamatória dentro dos septos alveolares com fibrose resultante. Os efeitos da IPF são crônicos, progressivos e muitas vezes fatais. A ativação da MAPK p38 foi demonstrada no pulmão de pacientes com a fibrose pulmonar. Várias pesquisas sobre a fibrose pulmonar indicaram que a expressão sustentada ou aumentada de algumas citoquinas no pulmão é relevante ao recrutamento das células inflamatórias e acúmulo dos componentes da matriz extracelular seguido pela remodelagem da arquitetura do pulmão. Particularmente, as citoquinas pró-inflamatórias tais como a TNF-α e interleucina IL-1β demonstraram executar as principais funções na formação de pneumonite e fibrose pulmonar. Além disso, as citoquinas pró-fibróticas tais como a TGF-β e CTGF também executam papéis importantes na patogênese da fibrose pulmonar. Matsuoka e outros (2002 *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283:L103-L112) demonstraram que um inibidor da p38, FR-167653, melhora a fibrose pulmonar induzida por murina bleomicina. Além disso, descobriu-se que a pirfenidona (5-metil-1-fenil-2-(1H)-piridona), um composto com efeitos antiinflamatórios, antioxidante e antifibrótico combinados é efetiva em modelos experimentais de fibrose pulmonar assim como em estudos clínicos (Raghu e outros, 1999, *Am J Respir Crit*

Care Med 159:106,1 -1069; Nagai e outros, 2002, *Intern Med* 41:1118-1123; Gahl e outros, 2002, *Mol Genet Metab* 76:234-242; Azuma e outros, 2002, *Am J Respir Crit Care Med* 165:A729). Os compostos e métodos descritos aqui são úteis no tratamento de fibrose pulmonar, tal como IPF.

Fibrose Renal

Independente da natureza do ataque inicial, a fibrose renal é considerada a via final comum pelo qual a doença do rim progride a uma falência renal de estágio final. Stambe e outros (2004 *J Am Soc Nephrol* 15:370-379) testou um inibidor da forma ativa (fosforilada) da p38, NPC 31169, desenvolvida por Scios Inc. (San Francisco, CA) em um modelo de rato de fibrose renal, e relatou uma redução significante na fibrose renal avaliada pelo volume instersticial, doposição de colágeno IV e níveis de mRNA de crescimento de tecido conjuntivo. Os compostos e métodos descritos aqui são úteis no tratamento de fibrose renal.

Leiomioma

Os leiomiomas uterinos ou fibróides são os tumores pélvicos mais comuns em mulheres com nenhuma terapia de Fármaco efetiva a longo prazo disponível. Os leiomiomas são caracterizados por proliferação aumentada de célula e fibrose do tecido. A pirfenidona foi testada em proliferação celular e a expressão do colágeno em células do músculo liso do leiomioma e miometrial em cultura, e descobriu-se que é um inibidor efetivo da proliferação celular miometrial e do leiomioma (Lee e outros, 1998, *J Clin Endocrinol Me tab* 83:219-223). Os compostos e métodos descritos aqui são úteis no tratamento de leiomiomas.

Fibrose endomiocardial

A fibrose endomiocardial (EMF) é um distúrbio caracterizado pelo desenvolvimento da cardiomiopatia restritiva. A EMF é algumas vezes considerada parte de um espectro de um processo de doença único que inclui endocardite de Loffler (fibrose endomiocardial eosinofílica não tropical ou endocardite parietal fibroplástica com eosinofilia). Em EMF, o processo fundamental produz fibrose irregular da superfície endocardial do coração, levando à flexibilidade reduzida e, finalmente, em fisiologia restritiva à medida que a superfície endomiocardial torna-se mais envolvida de maneira geral. A fibrose endocardial envolve principalmente o trato de influxo dos ventrículos direito e esquerdo e pode afetar as válvulas atrioventriculares, levando à regurgitação tricúspide e mitral. A ativação da MAPK mostrou contribuir para a remodelagem estrutural atrial arritmogênica em EMF. Os compostos e métodos descritos aqui são úteis no tratamento e/ou prevenção da fibrose endomiocardial.

Outras doenças inflamatórias

Muitas doenças autoimunes e doenças associadas com a inflamação crônica, assim como respostas agudas, têm sido ligadas à ativação da quinase MAP p38 e superexpressão ou desregulação das citoquinas infalamatórias. Estas doenças incluem, mas não estão limitadas a: artrite reumatóide, espondilite reumatóide, osteoartrite, gota, outras condições artríticas, sepse; choque séptico, choque endotóxico, sepse gram-negativa, síndrome de choque tóxico, asma; síndrome de estresse respiratório do adulto, doença pulmonar obstrutiva crônica, inflamação pulmonar crônica, doença inflamatória do intestino, doença de Crohn,

psoríase, eczema, colite ulcerativa, fibrose pancreática, fibrose hepática, doença renal aguda e crônica, síndrome do intestino irritável, pirese, restenose, malária cerebral, derrame e dano isquêmico, trauma neural, doença de Alzheimer, doença de Huntington, doença de Parkinson, dor aguda e crônica, rinite alérgica, conjuntivite alérgica, falência crônica do coração, síndrome coronária aguda, caquexia, malária, lepra, leishimaniose; doença de Lyme, síndrome de Reiter; sinovite aguda, degeneração muscular, bursite, tendinite, tenosinovite, síndrome de disco intervertebral herniado, rompido ou prolapsado, osteopetrose, trombose, câncer, restenose, silicose, sarcose pulmonar, doenças de reabsorção de ossos, tal como osteoporose, reação do enxerto versus hospedeiro, e doenças autoimunes, tais como Esclerose Múltipla, lupus e fibromialgia, AIDS e outras doenças virais tais como Herpes Zoster, Herpes Simplex I ou II, vírus influenza e citomegalovírus e diabetes mellitus.

Muitos estudos mostraram que a redução da atividade da quinase MAP p38, seus ativadores ou seus efetores, ou através de meios químicos ou genéticos, enfraquecem a resposta inflamatória e previne ou minimiza o dano ao tecido (veja, por exemplo, English e outros, 2002, *Trends Pharmacol Sci* 23:40-45; e Dong e outros, 2002 *Annu Rev Immunol* 20:55-72). Assim, os inibidores da atividade da p38, que também inibem excesso ou desregulam a produção de citoquina e podem inibir mais de uma citoquina pró-inflamatória única, podem ser úteis como agentes antiinflamatórios e terapêuticos. Além disso, o grande número de doenças associadas com as respostas inflamatórias

associadas à quinase MAP p38 indica que há uma necessidade por métodos efetivos para tratar estas condições.

Doença cardiovascular

A inflamação e ativação/infiltração de leucócito executam uma importante função no início e progresso de doenças cardiovasculares incluindo aterosclerose e falência do coração. A inibição da via da proteína quinase p38 ativada por mitógeno (MAPK) atenua o dano do tecido e o acúmulo de leucócito em isquemia miocardial/dano de reperfusão. Os compostos e métodos descritos aqui são úteis para tratar doenças cardiovasculares.

Esclerose múltipla

A inflamação no sistema nervoso central ocorre em doenças tais como esclerose múltipla e leva à disfunção e destruição do axônio. Observações *in vitro* e *in vivo* mostraram um importante papel para o óxido nítrico (NO) na mediação da axonopatia inflamatória. A quinase MAP p38 é ativada pela exposição ao NO e a inibição da sinalização da p38 mostrou levar a efeitos de sobrevivência neuronal e axonal. OCM e IGF-1 reduziram a ativação da p38 em neurônios corticais expostos a NO e melhoraram a sobrevivência do axônio em culturas expostas a NO, um processo dependente da sinalização da proteína quinase ativada por mitógeno/quinase relacionada a sinal extracelular. Os compostos e métodos descritos aqui são úteis para tratar esclerose múltipla.

Disfunção primária de enxerto

A inflamação não específica é associada com a disfunção primária do enxerto (PNF). O dano inflamatório de ilhota é mediado pelo menos parcialmente pelas citoquinas

pró-inflamatórias, tais como interleucina-1β (IL-1β) e fator-α de necrose de tumor (TNF-α) produzidos por macrófagos residentes de ilhota. A via da p38 é conhecido por estar envolvido na produção de citoquina nas células da linhagem monócito-macrófago. A inibição da via da p38 por um inibidor químico da p38, SB203580, suprime a produção de IL-1β e TNF-α em ilhotas humanas expostas a lipopolissacarídeos (LPS) e/ou citoquinas inflamatórias. Embora a IL-1β seja predominantemente produzida por macrófagos residentes, descobriu-se que as células dutais e as células endoteliais vasculares de ilhota são uma outra fonte celular de IL-1β em ilhotas humanas isoladas. SB203580 também inibiu a expressão da sintase de óxido nítrico indutível (iNOS) e ciclooxigenase-2 (COX-2) nas ilhotas tratadas. Além disso, as ilhotas humanas tratadas com SB203580 por 1 hora antes do transplante apresentaram função de enxerto significativamente melhorada. Os compostos e métodos descritos aqui são úteis para melhorar a sobrevivência do enxerto em transplante clínico de ilhota.

Dano renal agudo

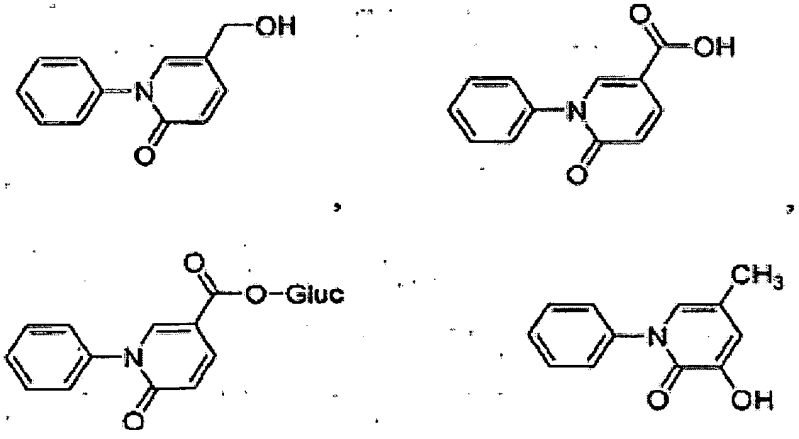
Cisplatina é um agente quimioterapêutico importante mas pode causar dano renal agudo. Parte deste dano renal agudo é mediado através do fator-α de necrose de tumor (TNF-α). A cisplatina ativa a MAPK p38 e induz a apoptose em células de câncer. A ativação da MAPK p38 leva à produção aumentada de TNF-α em dano isquêmico e em macrófagos. *In vitro*, a cisplatina causou uma ativação dependente da dose da MAPK p38 em células tubulares próximas. A inibição da ativação da MAPK p38 leva à

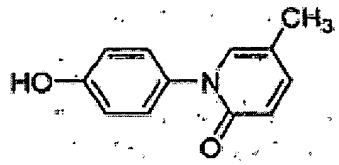
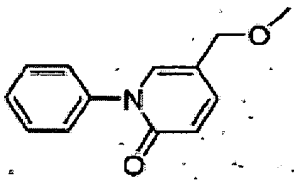
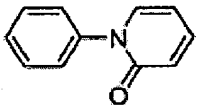
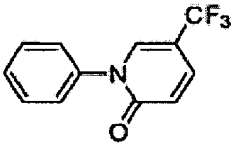
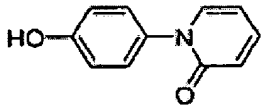
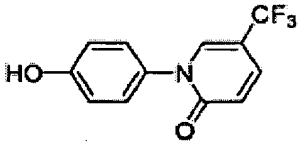
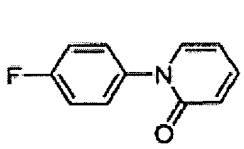
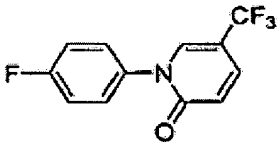
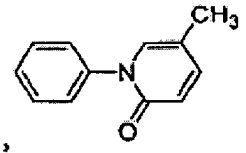
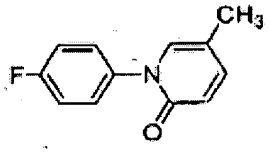
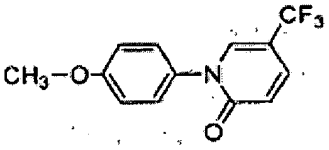
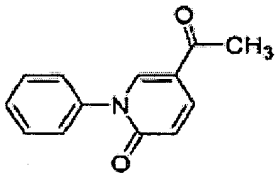
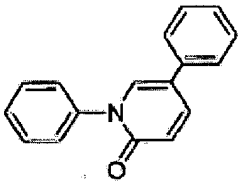
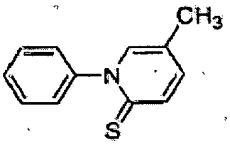
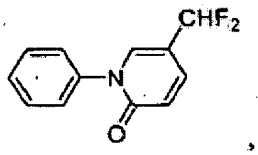
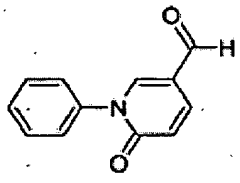
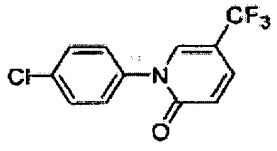
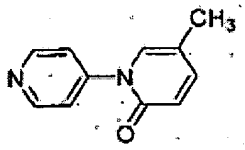
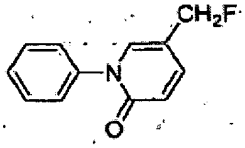
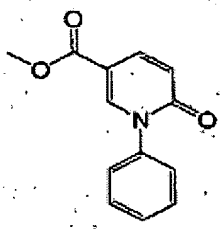
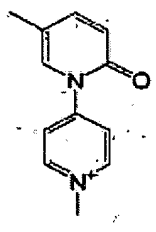
inibição da produção de TNF-α. *In vivo*, camundongos tratados com uma dose única de cisplatina desenvolveu disfunção renal severa, que foi acompanhada por um aumento da atividade da MAPK p38 do rim e um aumento nos leucócitos infiltrantes. Entretanto, os animais tratados com o inibidor da MAPK p38, SKF86002, junto com a cisplatina mostraram menor disfunção renal, menor dano histológico severo e menos leucócitos comparados com os animais tratados com cisplatina+veículo. Os compostos e métodos descritos aqui são úteis para prevenir dano renal agudo.

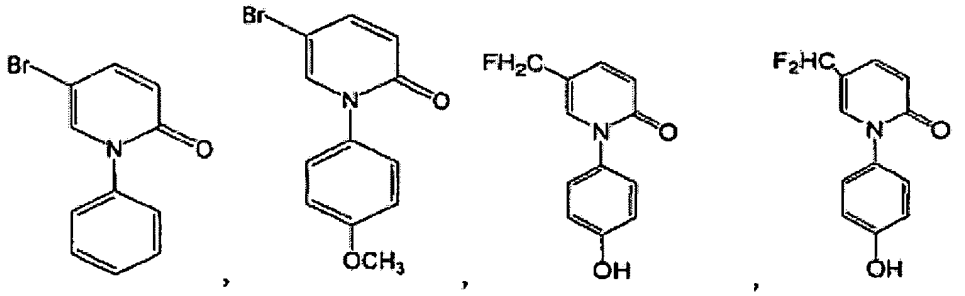
Periodontite

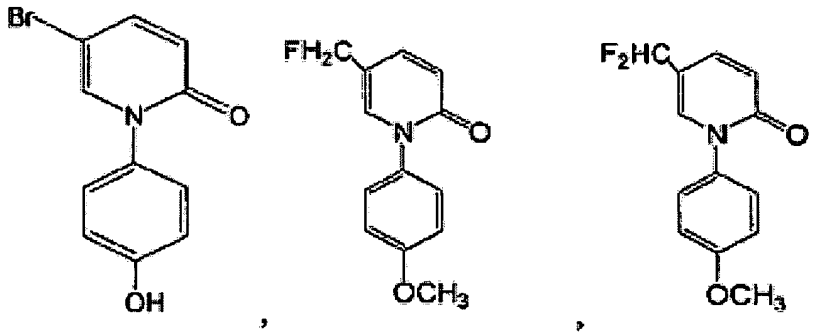
A bradiquinina mediadora pró-inflamatória (BK) estimula a produção de interleucina-8 (IL-8) em fibroblastos gengivais humanos *in vitro* e executa uma função importante na patogênese de várias doenças inflamatórias incluindo periodontite. O inibidor da proteína quinase p38 ativada por mitógeno (MAPK), SB203580, reduziu a produção de IL-8 estimulada pela combinação de BK e IL-1β assim como a produção de IL-8 estimulada por IL-1β. Os compostos e métodos descritos aqui são úteis para tratar ou prevenir periodontite.

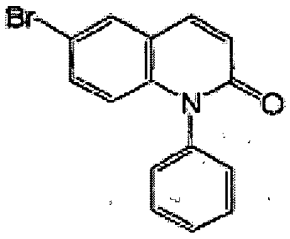
Em algumas modalidades, os inibidores da p38 para qualquer um dos usos descritos acima, não são selecionados a partir do grupo consistindo de:









, e pirfenidona.

Composições Farmacêuticas

Embora seja possível para os compostos aqui descritos serem administrados sozinhos, pode ser preferível formular os compostos como composições farmacêuticas. Como tal, em ainda um outro aspecto, são fornecidas as composições farmacêuticas úteis nos métodos da invenção. Mais particularmente, as composições farmacêuticas descritas aqui podem ser úteis, *inter alia*, para tratar ou prevenir condições inflamatórias, por exemplo, condições associadas com a atividade da p38 ou atividade da citoquina ou qualquer combinação destas. Uma composição farmacêutica é qualquer composição que pode ser administrada *in vitro* ou *in vivo* ou ambos a um indivíduo a fim de tratar ou melhorar uma condição. Em uma modalidade preferida, uma composição

farmacêutica pode ser administrada *in vivo*. Um indivíduo pode incluir uma ou mais células ou tecidos, ou organismos. Um indivíduo preferido é um mamífero. Um mamífero inclui qualquer mamífero, tal como por meio de exemplo não limitante, criação de gado, porcos, carneiro, cabras, cavalos, camelos, búfalo, gatos, cachorros, ratos, camundongos e humanos. Um mamífero altamente preferido é um humano.

Em uma modalidade, as composições farmacêuticas podem ser formuladas com excipientes farmaceuticamente aceitáveis tais como veículos, solventes, estabilizadores, adjuvantes, diluentes, etc., dependendo do modo particular de administração e forma de dosagem. As composições farmacêuticas devem geralmente ser formuladas para alcançar um pH fisiologicamente compatível, e pode variar de um ph de cerca de 3 a cerca de 11, preferivelmente de cerca de 3 a cerca de 7, dependendo da formulação e da rota de administração. Em modalidades alternativas, pode ser preferido que o pH seja ajustado a uma faixa de cerca de 5 a cerca de 8. Mais particularmente, as composições farmacêuticas podem compreender uma quantidade terapeuticamente ou profilaticamente efetiva de pelo menos um composto conforme descrito aqui, junto com um ou mais excipientes farmaceuticamente aceitáveis. Opcionalmente, as composições farmacêuticas podem compreender uma combinação dos compostos descritos aqui, ou podem incluir um segundo ingrediente ativo útil no tratamento ou prevenção de infecção bacteriana (por exemplo, agentes antibacterianos ou antimicrobianos).

As formulações, por exemplo, para administração

parenteral ou oral, são mais tipicamente sólidas, soluções líquidas, emulsões ou suspensões, enquanto que as formulações inaláveis para administração pulmonar são geralmente líquidas e pós, com as formulações em pó sendo geralmente preferidas. Uma composição farmacêutica preferida pode também ser formulada como um sólido liofilizado que é reconstituído com um solvente fisiologicamente compatível antes da administração. Composições farmacêuticas alternativas podem ser formuladas como xaropes, cremes, pomadas, comprimidos e etc.

A expressão "excipiente farmaceuticamente aceitável" refere-se a um excipiente para administração de um agente farmacêutico, tal como os compostos descritos aqui. O termo refere-se a qualquer excipiente farmacêutico que pode ser administrado sem a toxidade indevida.

Os excipientes farmaceuticamente aceitáveis são determinados em parte pela composição particular que está sendo administrada, assim como pelo método particular usado para administrar a composição. Consequentemente, existe uma ampla variedade de formulações adequadas de composições farmacêuticas (ver, por exemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences).

Excipientes adequados podem ser moléculas de veículo que incluem grandes macromoléculas lentamente metabolizadas tais como proteínas, polissacarídeos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, ácidos aminopoliméricos, copolímeros de aminoácido e partículas de vírus inativo. Outros excipientes exemplares incluem antioxidantes tais como ácido ascórbico; agentes quelantes tais como EDTA; carboidratos tais como dextrina, hidroxialquilcelulose,

hidroxialquilmetilcelulose, ácido esteárico, líquidos tais como óleos, água, solução salina, glicerol e etanol, agentes umectantes ou emulsificantes; substâncias de tamponamento de pH, e etc. Os lipossomos estão também inclusos dentro da definição de excipientes farmaceuticamente aceitáveis.

As composições farmacêuticas descritas aqui podem ser formuladas de qualquer forma adequada para os métodos objetivados de administração. Quando objetivados para uso oral, por exemplo, comprimidos, pastilhas, lozangos, suspensões aquosas ou oleosas, soluções não aquosas, pós ou grânulos dispersíveis (incluindo partículas micronizadas ou nanopartículas), emulsões, cápsulas duras ou macias, xaropes ou elixíres podem ser preparados. As composições objetivadas para uso oral podem ser preparadas de acordo com qualquer método conhecido na técnica para a produção de composições farmacêuticas e tais composições podem conter um ou mais agentes incluindo agentes adoçantes, agentes flavorizantes, agentes colorantes e agentes de preservação a fim de fornecer preparações palatáveis.

Excipientes farmaceuticamente aceitáveis particularmente adequados para uso em conjunto com comprimidos incluem, por exemplo, diluentes inertes, tais como celulose, cálcio ou carbonato de sódio, lactose, cálcio ou fosfato de sódio, agentes desintegrantes, tais como povidona entrecruzada, amido de milho, ou ácido algínico, agentes de ligação, tais como povidona, amido, gelatina ou acácia; e agentes lubrificantes, tais como estearato de magnésio.

Os comprimidos podem ser não revestidos ou podem ser

revestidos por técnicas conhecidas incluindo microencapsulação para retardar a desintegração e adsorção no trato gastrointestinal e assim fornecer uma ação prolongada por um período mais longo. Por exemplo, um material de retardo de tempo tal como monoestearato de glicerila ou diestearato de glicerila sozinho ou com uma cera podem ser empregados.

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

Em uma outra modalidade, as composições farmacêuticas podem ser formuladas como suspensões compreendendo um composto das modalidades em uma mistura com pelo menos um excipiente farmaceuticamente aceitável adequado para a produção de uma suspensão.

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

Excipientes adequados para uso em conexão com as suspensões incluem agentes de suspensão, tais como carboximetilcelulose de sódio, metilcelulose, hidroxipropil metilcelulose, alginato de sódio, polivinilpirrolidona, goma tragacanto, goma acácia, agentes dispersantes ou

umectantes tal como um fosfatídeo que ocorre naturalmente (por exemplo, lecitina), um produto da condensação de um óxido de alquileno com um ácido graxo (por exemplo, estearato de polioxietileno), um produto de condensação do óxido de etileno com um álcool alifático de cadeia longa (por exemplo, heptadecaetilenooxicetanol), um produto de condensação de óxido de etileno com um éster parcial derivado de um ácido graxo e um anidrido de hexitol (por exemplo, monooleato de polioxietileno sorbitano) e agentes de espessamento, tais como carbômero, cera de abelha, parafina dura ou álcool cetílico. As suspensões podem também conter um ou mais preservativos, tais como, ácido acético, metil e/ou n-propil, p-hidroxi-benzoato, um ou mais agentes de coloração, um ou mais agentes flavorizantes, e um ou mais agentes adoçantes, tais como sacarose, sacarina.

As composições farmacêuticas podem também estar na forma de uma emulsão de óleo em água. A fase oleosa pode ser um óleo vegetal, tal como, óleo de oliva ou óleo de amendoim, um óleo mineral, tal como, ou uma mistura destes. Agentes emulsificantes adequados incluem gomas que ocorrem naturalmente, tais como goma acácia e goma tragacanto; fosfatídeos que ocorrem naturalmente, tal como lecitina de soja, ésteres ou ésteres parciais derivados de ácidos graxos; anidridos de hexitol, tais como monooleato de sorbitano; e produtos de condensação destes ésteres parciais com óxido de etileno, tal como monooleato de polioxietileno sorbitano. A emulsão pode também conter agentes adoçantes e flavorizantes. Xaropes e elixíres podem ser formulados com agentes adoçantes, tal como glicerol,

sorbitol ou sacarose. Tais formulações podem também conter um emoliente, um preservativo, um agente flavorizantes ou colorante.

Adicionalmente, as composições farmacêuticas podem estar na forma de uma preparação injetável estéril, tal como uma emulsão aquosa injetável estéril ou suspensão oleaginosa. Esta emulsão ou suspensão pode ser formulada de acordo com a técnica conhecida usando-se aqueles agentes de dispersão ou umectantes adequados e agentes de suspensão que foram mencionados acima. A preparação estéril injetável pode também ser uma solução ou suspensão estéril injetável em um diluente ou solvente aceitável parenteralmente atóxico, tal como, como uma solução em 1,2-propanodiol.

A preparação injetável estéril pode também ser preparada como um pó liofilizado. Entre os veículos e solventes aceitáveis que podem ser empregados estão água, solução de Ringer e solução de cloreto de sódio isotônica. Além disso, óleos fixos estéreis podem ser empregados como um solvente ou meio de suspensão. Para este propósito qualquer óleo fixo suave pode ser empregado incluindo mono- ou diglicerídeos sintéticos. Além disso, ácidos graxos tais como ácido oleico podem também ser usados na preparação de injetáveis.

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

co-solvente ou combinação de co-solventes. Exemplos de co-solventes adequados incluem álcool, propileno glicol, polietileno glicol 300, polissorbato 80, glicerina e etc. em concentrações variando de cerca de 0 a cerca de 60% do volume total. Em uma modalidade, o composto ativo é dissolvido em DMSO e diluído com água.

A composição farmacêutica pode também estar na forma de uma solução, na forma de um sal do ingrediente ativo em um veículo aquoso apropriado, tal como água ou solução salina isotônica ou solução de dextrose. São também considerados os compostos que foram modificados por substituições ou adições de metades químicas ou bioquímicas que os tornam mais adequados para entrega (por exemplo, solubilidade, bioatividade, palatabilidade aumentadas, reações adversas diminuídas, etc.), por exemplo, por esterificação, glicosilação, "PEGilação", etc.

Em uma modalidade preferida, os compostos descritos aqui podem ser formulados para administração oral em uma formulação baseada em lipídeo adequada para compostos de baixa solubilidade. As formulações baseadas em lipídeo podem geralmente aumentar a biodisponibilidade oral de tais compostos.

Como tal, uma composição farmacêutica preferida compreende uma quantidade terapeuticamente ou profilaticamente efetiva de um composto descrito aqui, junto com pelo menos um excipiente farmaceuticamente aceitável selecionado a partir do grupo consistindo de ácidos graxos de cadeia média ou ésteres de propileno glicol destes (por exemplo, ésteres de propileno glicol de ácidos graxos comestíveis tais como ácidos graxos caprílico

e cáprico) e tensoativos farmaceuticamente aceitáveis tais como óleo de rícino hidrogenado polioxil 40.

Em uma modalidade preferida alternativa, ciclodextrinas podem ser adicionadas como melhoradores de solubilidade aquosos. As ciclodextrinas preferidas incluem derivados de hidroxipropil, hidroxietil, glucosil, maltosil e maltotriosil de α-, β- e γ-ciclodextrina. Um melhorador de solubilidade de ciclodextrina particularmente preferido é o hidroxipropil-*o*-ciclodextrina (BPBC), que pode ser adicionado a qualquer uma das composições acima descritas para também melhorar as características de solubilidade aquosa dos compostos das modalidades. Em uma modalidade, a composição compreende cerca de 0,1% a cerca de 20% de hidroxipropil-*o*-ciclodextrina, mais preferivelmente cerca de 1% a cerca de 15% de hidroxipropil-*o*-ciclodextrina, ainda mais preferivelmente de cerca de 2,5% a cerca de 10% de hidroxipropil-*o*-ciclodextrina. A quantidade do melhorador de solubilidade empregada irá depender da quantidade do composto das modalidades na composição.

Uma composição farmacêutica contém uma quantidade total do(s) ingrediente(s) ativo(s) suficiente para alcançar um efeito terapêutico objetivado. Mais especificamente, em algumas modalidades, a composição farmacêutica contém uma quantidade terapeuticamente efetiva (por exemplo, uma quantidade de um composto de modulação de SAPK que é efetiva na prevenção ou tratamento dos sintomas de uma doença ou condição inflamatória, onde o composto exibe um IC50 na faixa de cerca de 100 μM a cerca de 1000 μM, preferivelmente de cerca de 200 μM a cerca de 800 μM, para inibição da MAPK p38). As quantidades totais do

composto que podem ser combinadas com os materiais do veículo para produzir uma forma de dosagem unitária irão variar dependendo do hospedeiro tratado e do modo particular de administração. Preferivelmente, as composições são formuladas de forma que uma dose entre 0,01 a 100 mg/kg de peso corpóreo/dia de um composto de modulação da SAPK seja administrada a um paciente recebendo as composições.

EXEMPLO 1

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

Todas as quinases e o substrato ATF2 são adquiridos de Upstate (Charlottesville, VA). As quinases MAP p38 são proteínas de comprimento total humanas recombinantes com uma fusão GST no terminal amino, expressadas em e purificadas a partir de *E. coli*. ATF2 é uma proteína de fusão GST contendo de 19 a 96 aminoácidos de ATF2 humano expressada em *E. coli*. Todas as proteínas são separadas em alíquotas e armazenadas e armazenadas a -80°C.

Os ensaios com a quinase MAP p38 são executados usando-se um tampão de ensaio contendo HEPES 25 mM, pH = 7,5, $MgCl_2$ 10 mM, DTT 2 mM, β-glicerofosfato 20 mM, Na_3VO_4

0,1 mM, ATP 40 μM e 1,25 μM de ATF2, junto com 6 ng de proteína p38α, 12 ng de proteína p38β, 1,5 ng de p38γ ou 0,4 ng de JNK2α2. Os compostos são serialmente diluídos em DMSO e 2 μL do composto de teste em várias concentrações é usado. O controle de veículo recebe DMSO apenas.

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

As placas são lavadas três vezes com também de lavagem antes da incubação com 50 μL de anticorpo anti-coelho de cabra conjugado com HRP (Cell Signaling, 7074, 1:500) por 30 minutos a 37°C. As placas são então lavadas três vezes com tampão de lavegem antes da incubação com 50 μL de Ultra TMB-Elise (Pierce, 34028) por 8 minutos à temperatura ambiente. Finalmente, 50 μL de ácido fosfórico (1 M) é

adicionado para interromper as reações e a absorbância da placa é lida a 450 nm em um leitor de placa SpectraMax 250.

Os compostos inibem a fosforilação de ATF2 neste ensaio *in vitro*. Os compostos preferidos exibem os valores de IC_{50} de menos de cerca de 100 μM, preferivelmente, menos de cerca de 1 μM.

EXEMPLO 2

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

As células THP-1 a partir de ATCC (TIB202) são mantidas a 37°C, 5% de CO_2 em meio RPMI 1640 (MediaTech, Herndon, VA) contento 4,5 g/L de glicose, suplementado com soro bovino fetal 10%, penicilina/estreptomicina 1% e β-mercaptoetanol 50 μM.

Os compostos de teste são inicialmente dissolvidos em meio RPMI com DMSO 1% (v/v). Os compostos são então serialmente diluídos em meio RPMI para todas as diluições subseqüentes. O ensaio é executado sob condições estéreis. As células THP-1 em uma densidade de cultura de 6-8 c 10^5 células/mL são coletadas e ressuspensas no meio RPMI a 10^6 células/mL. 100 μL de células ressuspensas são adicionadas a cada cavidade, as quais contém 100 μL de um composto de teste. Os compostos de teste são preparados com o dobro da

concentração final. A concentração de DMSO final não é maior que 0,5% (v/v). As células são pré-incubadas com o composto por 60 minutos a 37°C, CO_2 5% antes da estimulação com lipopolissacarídeo (LPS) (Sigma L-2880, 4 mg/mL de solução mãe em PBS). A concentração final de LPS em cada cavidade e 10 ou 30 µg/mL para liberação de TNF-α e IL-1β, respectivamente. As suspensões de célula de controle não estimuladas recebem veículo PBS apenas. As misturas de célula são incubadas por 18 ou 48 horas para liberação de TNF-α e IL-1β, respectivamente. 150 µL de sobrenadantes são tomados e transferidos a uma placa nova e armazenados a -20°C até análise posterior. Os níveis de TNF-α e IL-1β são medidos usando-se kits ELISA. Luminescência é usada como o leito de placa. A análise é executada por regressão não linear para gerar uma curva de resposta à dose. O valor de IC_{50} calculado é a concentração do composto de teste que causa um decréscimo de 50% nos níveis de TNF-α ou IL-1β.

Os compostos inibem a liberação da TNF-α, IL-1β ou de ambas neste ensaio *in vitro*. Os compostos preferidos exibem valores de IC_{50} para TNF-α e/ou IL-1β de menos de cerca de 100 µM, preferivelmente, menos de cerca de 1 µM.

EXEMPLO 3

Os compostos são selecionados para a capacidade de inibir a liberação de TNF-α a partir de, principalmente, células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC) estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS) *in vitro*. A capacidade dos compostos de inibir a liberação da TNF-α neste ensaio *in vitro* está relacionada com a inibição da atividade da p38 e é portanto um indicador da atividade terapêutica *in vivo* potencial (2002, *Osteoarthritis &*

Cartilage 10:961-967; e Laufer, S.A. e Wagner, G.K. 2002 *J. Med. Chem.* 45: 2733-2740).

Células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC) são isoladas por centrifugação diferencial através de um gradiente de densidade Ficoll-HyPaque de soro unido de 3 a 8 doadores de sangue individuais. As PBMC isoladas contêm aproximadamente 10% de monócitos positivos CD-14, 90% de linfócitos e < 1% de granulócitos e plaquetas. As PBMC (10^6/mL) são colocadas em cultura em placas de poliestireno e estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS, 50 ng/mL, Sigma, St. Louis, MO) na presença e ausência do composto de teste em diluições em série, em duplicata, por 24 h a 37°C em meio RPM1 GIBCO™ (Invitrogen, Carlsbad, CaMV 35S) sem soro. O nível de TNF-α em sobrenadantes de célula é determinado por ELISA usando-se um kit comercialmente disponível (MDS Panlabs #309700).

Os compostos preferidos inibem a liberação de TNF-α neste ensaio com um valor de IC_{50} de menos de cerca de 100 μM, preferivelmente, menos de cerca de 1 μM.

EXEMPLO 4

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

Sem estar preso por qualquer teoria particular,

acredita-se que a inibição da TNF-α neste modelo é devido à inibição da quinase MAP p38 pelo composto.

Ratos machos Sprague-Dawley (0,2 a 0,35 kg) são aleatoriamente divididos em grupos de seis ou mais e recebem doses de forma intravenosa por infusão ou injeção de bolo, ou recebem doses oralmente com compostos de teste em uma formulação adequada em cada caso. Trinta minutos depois do final da infusão ou da injeção de bolo, e 1 a 2 horas depois da administração oral, lipopolissacarídeo de *E. coli*/0127:B8 (0,8 mg/kg) é administrado de forma intravenosa (IV). Amostras de sangue são coletadas em 1,5 hora pós-tratamento com LPS. Os níveis de TNF-α no soro são determinados usando-se o kit ELISA de Biosource (KRC3011C) e comparados àqueles do controle tratado com veículo.

Compostos preferidos inibem a liberação de TNF-α neste ensaio *in vivo*. Compostos preferidos exibem um valor de ED_{50} de menos de 500 mg/kg, preferivelmente menos de 400 mg/kg, preferivelmente menos de 200 mg/kg, preferivelmente menos de 100 mg/kg, mais preferivelmente, menos de 50 mg/kg, mais preferivelmente, menos de 40 mg/kg, mais preferivelmente, menos de 30 mg/kg, mais preferivelmente, menos de 20 mg/kg, mais preferivelmente, menos de 10 mg/kg.

Os métodos de determinação do IC_{50} da inibição da p38 por um composto inclui quaisquer métodos conhecidos na técnica que permitam a detecção quantitativa de qualquer um dos substratos da MAPK p38 conforme descrito acima. Portanto, estes métodos incluem adicionalmente mas estão limitados à detecção da expressão de genes conhecidos para serem regulados pela p38 ou individualmente ou por grupos de genes.

EXEMPLO 5

Ensaio de Quinase

A atividade das isoformas da quinase p38, p38γ e p38α, é determinada pela fosforilação de ATF-2 na presença de ^{32}P-γ-ATP. A incorporação da ^{32}P em ATF-2 na presença ou ausência de inibidores é determinada. Os compostos descritos aqui são testados para a inibição da atividade da quinase p38α neste ensaio bioquímico. Os compostos são solubilizados em água ou DMSO e testados em diferentes concentrações de 0 a 10 mM usando-se o solvente apropriado para diluições e como controle de veículo. As enzimas p38γ e p38α são obtidas como proteína recombinante ativada e purificada (Upstate, Charlottesville, VA). A enzima ativada é usada a 24,8 nM na reação final. As enzimas são diluídas antes da reação no seguinte tampão (1M HEPES, pH = 7,4, 500mM DTT, 1% Triton X-100 e 10 mg/mL BSA). A reação é executada na seguinte solução que é preparada como uma diluição de 2 vezes da solução mãe (1M HEPES, pH = 7,4, 500mM DTT e 1% Triton X-100) e ATP não radioativo está presente na reação a 6,25 μM de ATP (Cell Signaling, Beverly, MA). Para determinar a fosforilação de ATF-2, ^{32}P-γ-ATP 3000Ci/mmol é adicionado a cada reação a uma concentração de 7,5 μM. ATF-2 (Cell Signaling, Beverly, MA) como um substrato de quinase é usado a 3 μM. Como uma primeira etapa na montagem da reação de enzima, a quinase ativada e o inibidor ou o controle de veículo apropriado são adicionados ao tampão de reação e são incubados por 30 minutos à temperatura ambiente. A reação de quinase é iniciada pela adição de ATF-2 e mistura de ATP. O volume final para cada reação é 20 μL e executada à temperatura

ambiente por 30 minutos. Após os 30 minutos de incubação, 80 µL de tampão Laemmlie são adicionados. Subsequentemente, 20% da reação é separada em um SDS -Page (BioRad, Hercules, CA) sob condições redutoras. Após a eletroforese, o gel é exposto a uma tela de intensificação de ^{32}P durante a noite à temperatura ambiente e analisado usando-se um leitor fosforradioativo, Phosphoimager®, Storm System (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). O sinal obtido é quantificado após a correção de base e calculado como o percentual de inibição usando-se a atividade da quinase não inibida com o controle de veículo como 0% de inibição. A atividade da quinase, na presença de concentrações de inibidor diferentes, é colocada em gráfico usando-se Kaleidagraph (Synergy Software, Reading, PA) para se determinar a EC_{50} para cada composto e testou-se a quinase p38.

Inibição da indução de TNF-α.

THP-1 (ATCC, Rockville, MD) é desenvolvida sob condições de cultura de tecido regular conforme recomendado por ATCC. 18 horas antes do experimento, as células foram colocadas em placas em um formato de 96 cavidades em meio de cultura regular contendo 1% de soro e 0,25 mL de volume de cultura a uma densidade de 500.000 células por cavidade. O composto é adicionado a cada cavidade em triplicatas e o controle de solvente apropriado é incluído em cada ensaio. O inibidor da p38, SB203850, a 1 µM/mL (Upstate, Waltham, MA) é incluído como um controle positivo em cada ensaio. Para a indução da expressão da TNF-α, 1 µg/mL de LPS é adicionado a cada cavidade 30 minutos após a adição do composto. Depois de uma incubação de 4 horas sob condições de cultura de tecidos, as células são sedimentas por

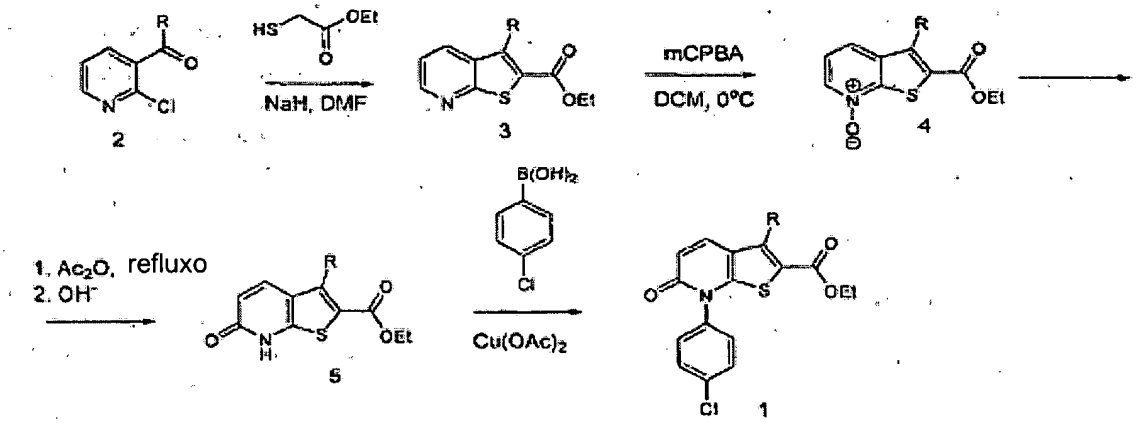
centrifugação (10 minérios, 1000 rpm, centrífuga de bancada Beckman) e uma fração do sobrenadante livre de célula é coletada e usada em uma diluição de 10 vezes para a quantificação no ELISA específico a TNF-α (R&D Systems, Minneapolis, MN). O ELISA do TNF-α é executado de acordo com as direções fornecidas pelo fabricante. O TNF-α é detectado em pg/mL e colocado em gráfico como a atividade fracionária normalizada pela expressão de TNF-α no controle de solvente.

Teste de toxidade do composto em um ensaido baseado em célula

A liberação de LDH como resultado de uma membrana celular rompida é aplicada como uma medida da toxidade de célula. LDH é detectado por sua atividade enzimática usando-se um kit de diagnóstico disponível comercialmente (Roche Diagnostics, Cat# 1 644 793). As células THP-1 são usadas para determinação de toxidade de célula para consistência com a expressão de TNF-α induzida no experimento prévio. Conforme previamente descrito para testar a inibição da indução de TNF-α, as células foram colocadas em cultura em um formato de 96 cavidades sob condições de cultura de tecido regulares e 1% de soro. Os compostos são adicionados a diferentes concentrações em triplicata. O controle de solvente apropriado é usado em cada ensaio. Após a adição do composto, as células são colocadas em cultura 18 horas sob condições de cultura de tecido regulares. Após este período de incubação, o controle positivo é iniciado adicionando-se Triton-x-100 (2% v/v) a células não tratadas e incubadas por um adicional de 10 minutos para lise completa da célula.

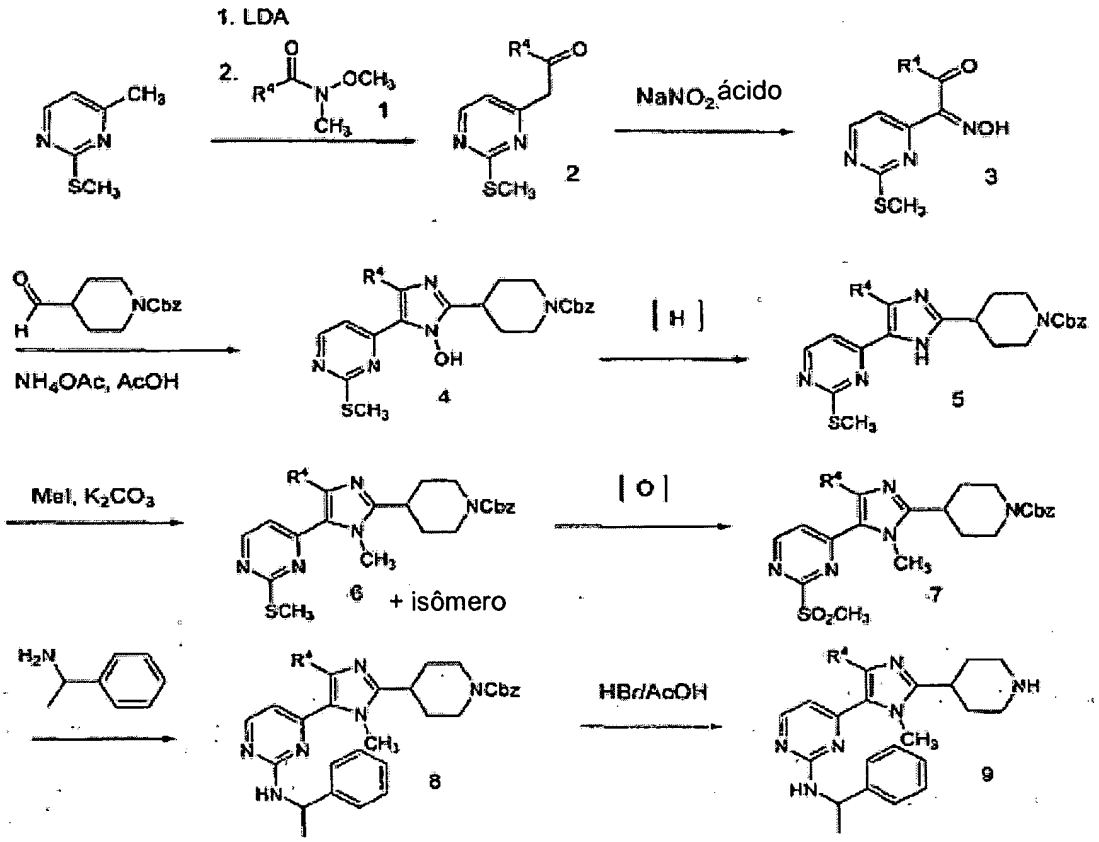
Subsequentemente, as células são sedimentadas por centrifugação e uma fração do sobrenadante é removida e analisada para atividade de enzima LDH de acordo com as instruções do fabricante. Os dados são mostrados como % de toxidade de célula normalizada às células lisadas com Triton-X-100 como 100% de toxidade de célula.

EXEMPLO 6



O composto de fórmula (1) é sintetizado conforme descrito imediatamente acima. A 3-acilpiridina substituída em R (composto 2), que é obtida a partir de fontes comerciais ou preparada através de procedimentos conhecidos, é reagida com o ânion acetato de mercapto etil para formar o derivado tieno[2,3-b]piridina (composto 3). O composto 3 é oxidado ao N-óxido (composto 4), que é convertido à piridinona (composto 5) sob tratamento com anidrido acético seguido por hidrólise subsequente. O composto 5 é N-arilado usando-se procedimentos conhecidos, tal como mostrado no esquema 1 usando-se o ácido 4-clorofenil borônico na presença de acetato de cobre. O composto 1 é um exemplo de um composto do Tipo I. Outros compostos do Tipo I podem ser sintetizados de uma forma similar.

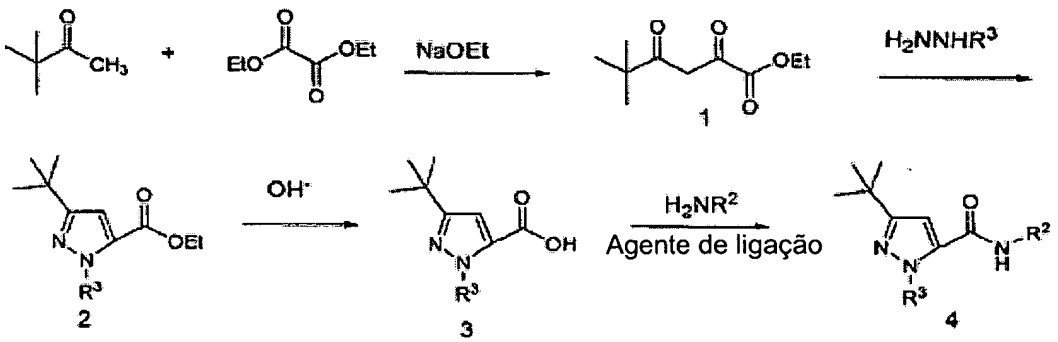
EXEMPLO 7



O composto de fórmula (9) é sintetizado conforme descrito imediatamente acima. A desprotonação da 2-tiometil-4-metilpirimidina com diisopropilamida de lítio seguida por um tratamento com N,O-dimetilhidroxamida (composto 1) fornece a cetona correspondente (composto 2). O último é convertido à alfa-oximocetona (composto 3) por reação com nitrito de sódio em ácido acético. A condensação do composto 3 com N-benziloxicarbonil (Cbz)-protegido piperidina-4-carbaldeído fornece o N-hidroxiimidazol (composto 4), que é transformado ao N-metil-imidazol (composto 6) pela redução para formar o intermediário imidazol (composto 5) sob condições usuais seguido por metilação. Após a oxidação para formar a sulfona (composto 7), o grupo metilsulfonil é deslocado com amina para fornecer o derivado aminopirimidina (composto 8). A

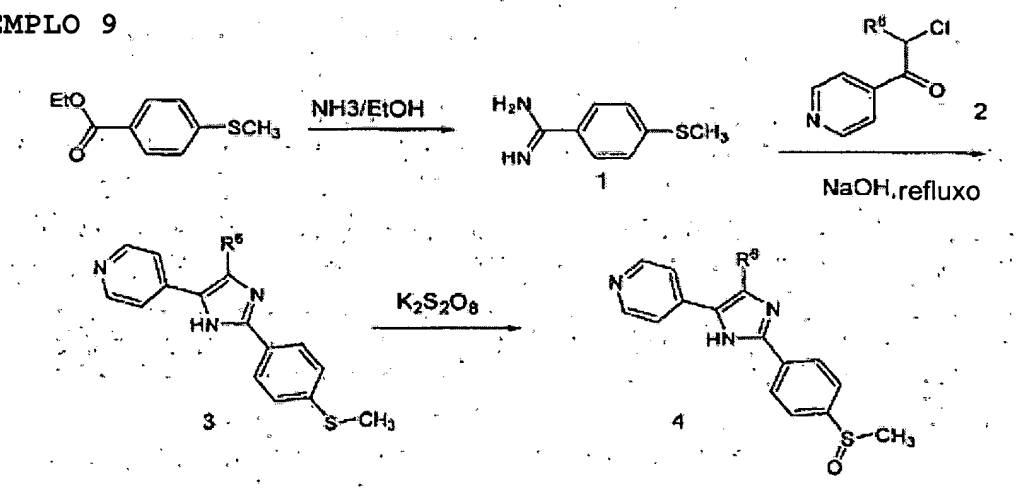
desproteção final do piperidina nitrogênio sob condições padrões, tal como HBr em ácido acético, fornece o imidazol substituído objetivado (composto 9). O composto 9 é um exemplo de um composto do Tipo II. Outros compostos do Tipo II podem ser sintetizados de uma forma similar.

EXEMPLO 8



O composto de fórmula (4) é sintetizado conforme descrito imediatamente acima, de acordo com métodos conhecidos (ver, J. Org. Chem., 62, 17, 5908-5919). O ânion pinacolona é reagido com oxalato de etila para fornecer o éster etílico do ácido 5,5-dimetil-2,4-dioxohexanóico (composto 1). A reação do composto 1 com a hidrazina parcialmente substituída fornece o pirazol (composto 2), que é convertido ao composto 4 objetivado pelos procedimentos usuais. O composto 4 é um exemplo de um composto do Tipo III. Outros compostos do Tipo III podem ser sintetizados de uma forma similar.

EXEMPLO 9



O composto de fórmula (4) é sintetizado conforme descrito imediatamente acima. Uma benzamidina (composto 1), preparada pelo tratamento de etil 4-metiltoimetilbezoato com amônia etanólica, é reagida com alfa-clorocetona (composto 2) para fornecer o imidazol (composto 3). O composto 4 objetivado é obtido após oxidação do intermediário 3 sob condições padrões, por exemplo, com persulfato de potássio conforme descrito. O composto 4 é um exemplo de um composto do Tipo IV. Outros compostos do Tipo IV podem ser sintetizados de uma forma similar.

EXEMPLO 10

Introdução de RNAs curtos tipo grampo de cabelo (shRNAs) que têm como alvo a p38α ou p38γ em células em cultura. Partículas lentivirais de shRNA MISSION ™ TRC foram obtidas a partir de Sigma Aldrich (St. Louis, MO). Estas partículas virais incompetentes de replicação auto-inativantes são projetadas para expressar shRNAs de um promotor U6 e permitir a seleção de puromicina de células infectadas. Os shRNAs usados neste estudo são projetados para ter como alvo a p38γ humana (partículas lentivirais contendo regiões codificadoras com Ids. de Seq. n°^{s}: 1-4), p38α humana (partículas lentivirais contendo regiões codificadoras com Ids. de Seq. n°^{s}: 5-8). Uma primeira partícula lentiviral de controle codifica um shRNA que porta pelo menos 5 desemparelhamentos para todos os genes humanos e de camundongo conhecidos e não tem como alvo qualquer gene humano ou de camundongo conhecido. Uma segunda partícula lentiviral de controle não expressa um shRNA. Uma terceira partícula lentiviral de controle projetada para expressa a proteína fluorescente verde (GFP)

foi usada para otimizar as condições de infecção.

Células HFL1 (ATCC, Rockville, MD) foram mantidas a 37°C e 5% de CO_2 em meio F12K (MediaTech, Herndon, VA) suplementado com L-glutamato, 10% de soro fetal de bezerro, bicarbonato de sódio (1,5 g/L) e penicilina/estreptomicina. As células foram colocadas em placas de 24 cavidades 1 dia antes da infecção e foram aproximadamente 2/3 confluentes no momento da infecção. para infecção, o meio foi removido e substituído com meio novo contendo 0-12 µg/mL de brometo de hexadimetrina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) seguida pela adição de partículas lentivirais em uma multiplicidade de infecção (MOI) 1-5. Vinte e quatro horas depois, o meio de infecção foi removido e substituído com meio novo. Para todas as etapas pós-infecção, as células foram passadas conforme necessário para manter a solução mãe entre 5 e confluência total. Entre 1 e 3 dias pós-infecção das células foram colocadas sob seleção com puromicina com uma concentração final de 0,25-1 µg/mL, que foi definida com base na sensibilidade à puromicina das células não infectadas. A seleção foi mantida por 5-10 dias e o progresso da seleção foi avaliado observando-se as células transfectadas com um lentivírus projetado para expressar GFP assim como a perda de viabilidade em células não infectadas. Células HFL1 foram falsamente infectadas (nenhum vírus) ou infectadas com um lentivírus projetado para conferir resistência à puromicina e expressam um dos seguintes: um shRNA que tem como alvo p38α humana (Id. de Seq. n°^{s}:5-8) um shRNA que tem como alvo p38γ humana (Id. de Seq. n°^{s}:1-4), um shRNA que não tem como alvo um gene humano ou de camundongo conhecido, nada (vírus de controle)

ou proteína fluorescente verde.

Células NIH3T3 (ATCC, Rockville, MD) foram mantidas em meio DMEM (MediaTech, Herndon, VA) suplementado com L-glutamato, 10% de soro fetal de bezerro, bicarbonato de sódio (1,5 g/L) e penicilina/estreptomicina. As células foram infectadas e sujeitadas à seleção com puromicina conforme descrito acima. Células NIH3T3 foram falsamente infectadas (nenhum vírus) ou infectadas com um lentivírus projetado para conferir resistência à puromicina e expressam um dos seguintes: um shRNA que tem como alvo p38α de camundongo (Id. de Seq. n°s:5-8) um shRNA que tem como alvo p38γ de camundongo (Id. de Seq. n°s:1-4), um shRNA que não tem como alvo um gene humano ou de camundongo conhecido, nada (vírus de controle) ou proteína fluorescente verde.

EXEMPLO 11

Isolamento de mRNA e determinação dos níveis de mRNA usando-se PCR quantitativo. RNA de ~15.000 a 150.000 células foi obtido usando-se o kit de isolamento de RNA Rnaqueous 96 (Ambion, Austin, TX) de acordo com as instruções do fabricante. RNA foi convertido a cDNA usando-se TaqMan® Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems, Branchburg, NJ) utilizando-se iniciadores de hexâmero aleatório de acordo com as instruções do fabricante. Reações por PCR quantitativas foram executadas em triplicata em um Applied Biosystems 7900 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, Branchburg, NJ) usando-se o cDNA obtido acima, um conjunto de iniciador marcador disponível comercialmente (TaqMan® Gene Expression Arrays, Applied Biosystems) e TaqMan® Universal PCR Master

Mix (Applied Biosystems, Branchburg, NJ) de acordo com as instruções do fabricante. Três placas foram testadas para células HFL1 usando-se conjuntos de marcador/iniciador projetados para amplificar gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase humano (GAPDH, controle endógeno), p38α humana e p38γ humana. Três placas foram testadas para células NIH3T3 usando-se conjuntos de marcador/iniciador projetados para amplificar gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de camundongo (GAPDH, controle endógeno), p38α de camundongo e p38γ de camundongo. Os dados foram analisados usando-se um método de ΔΔCt onde o nível de entrada de RNA foi normalizado usando-se gliceraldeídos-3-fosfato desidrogenase como um controle endógeno. Valores de ciclo limite (Ct) foram obtidos da fase geométrica de um gráfico de amplificação. Os níveis relativos de expressão de gene foram determinados usando-se a seguinte equação:

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{analito GAPDH}}\ \textbf{médio} - Ct_{\text{controle GAPDH}}\ \textbf{médio}) - (Ct_{\text{analito p38}}\ \textbf{médio} - Ct_{\text{controle p38}}\ \textbf{médio})$$

Onde:

$Ct_{\text{analito GAPDH}}$ médio é a média do valor de Ct para uma linha de célula do analito (lentiviral tratado) com um conjunto iniciador marcador GAPDH.

$Ct_{\text{controle GAPDH}}$ médio é a média do valor de Ct para células de controle (não tratado) com um conjunto iniciador marcador GAPDH.

$Ct_{\text{analito p38}}$ médio é a média do valor de Ct para uma linha de célula do analito (lentiviral tratado) com um conjunto iniciador marcador da p38 (α ou γ).

$Ct_{\text{controle p38}}$ médio é a média do valor de Ct para células de controle (não tratado) com um conjunto iniciador

marcador da p38.

Os dados são relatados como o nível de mRNA da p38 relativo nas células tratadas lentivirais comparada com células não tratadas quando os níveis de RNA de entrada são corrigidos usando-se o controle endógeno GAPDH. Os níveis de mRNA da p38 observados para construções de shRNA selecionada são fornecidos na Tabela 1 no Exemplo 12 abaixo.

EXEMPLO 12

Ensaio dos níveis de colágeno

Células HFL1 normais ou células infectadas com lentivírus e selecionadas com puromicina foram desenvolvidas para confluência a 37°C e 5% de CO_2 em meio F12K (MediaTech, Herndon, VA) suplementado com L-glutamato, 10% de soro fetal de bezerro, bicarbonato de sódio (1,5 g/L) e penicilina/estreptomicina. Para os ensaios de colágeno, as células foram colocadas em placas de 6 cavidades a uma densidade de ~$6x10^5$ células por cavidade em 2 mL/cavidade de meio de inanição (meio F12K suplementado com L-glutamato, 0,1% de soro fetal de bezerro, bicarbonato de sódio (1,5 g/L) e penicilina/estreptomicina). De 16 a 20 horas depois, o meio é removido e substituído com meio de inanição novo suplementado com 20 µg/mL de ácido ascórbico (EM Science, Gibbstown, NJ) e 10 µM de L-prolina (Calbiochem, L Jolla, CA). Uma hora depois desta mudança de meio, as células foram tratadas com 5 ng/mL (10 ng/cavidade) de fator-β1 de transformação do crescimento (TGF-β; Chemicon/Millipore, Billerica, MA ou Sigma Aldrich, St. Louis, MO). De 40 a 48 horas após a adição de TGF-β, o meio de célula foi removido e as células foram levadas à

lise em 250 µL solução salina tamponada com fosfato (PBS) suplementada com Triton X-100 1,25% (Fisher, Fair Lawn, NJ) e coquetel inibidor de proteinase completo (Roche, Mannheim, Germany). As células foram raspadas da placa usando-se um raspador de célula ou ponta de pipeta e o lisato foi congelado a -20°C.

As células NIH3T3 e as células NIH3T3 infectadas com lentivírus e selecionadas com puromicina foram tratadas de uma maneira similar exceto que o meio F12K foi substituído por DMEM (Mediatech, Herndon, VA). O meio DMEM foi suplementado com componentes adicionais da mesma maneira do F12K acima.

As células colhidas foram descongeladas. 200 µL da amostra foram misturados com um volume igual de ácido acético 0,5M em um tubo de microcentrífuga de 1,7 mL. As concentrações de colágeno foram determinadas usando-se o Sircol Soluble Collagen Assay (Biocolor Ltd, Newtonabbey, Northern Ireland) usando-se uma variação do protocolo do fabricante. Resumidamente, um mililitro de reagente corante Sircol foi adicionado e a amostra foi agitada por 30-60 minutos (a duração de tempo foi constante para todas as amostras em um experimento). A amostra foi então centrifugada por 30 minutos a ~10.000 x em uma microcentrífuga de bancada. O corante não ligado foi removido da pelota com a ponta de uma pipeta com cuidado para evitar destruir a pelota. A amostra foi centrifugada por 4 minutos adicionais e o corante não ligado residual foi cuidadosamente removido da pelota com uma ponta de pipeta. 200 µL do reagente alcalino do fabricante foram então adicionados e as amostras foram agitadas até o

precipitado estivesse dissolvido. Uma curva padrão foi criada usando-se quantidades conhecidas do padrão de colágeno (Biocolor Ltd, Newtonabbey, Northern Ireland) no protocolo acima. 100 µL de padrão ou amostra foram adicionados a uma placa de 96 cavidades limpas e a absorbância da amostra a 540 nm foi determinada usando-se um espectrofotômetro µQuant (Bio-Tek, Winooski, VT).

Como pode ser visto na Tabela 1 abaixo e Figuras 1 e 2, a expressão diminuída da p38α ou p38γ resultou em níveis diminuídos de colágeno e níveis aumentados de p38α e p38γ resultou em níveis aumentados de colágeno. Assim, estes dados confirmam que a inibição, por exemplo, da p38γ, pode resultar em níveis diminuídos de colágeno, e, portanto, fibrose diminuída.

Tabela 1

Expressão do mRNA da p38 e colágeno com construções diferentes de shRNA

Sequência	**Multiplicidade de infecção (MOI)**	**colágeno (µg) não induzido**	**Desvio padrão**	**colágeno (µg) induzido por TGF-β**	**Desvio padrão**	**p38γ relativo**	**p38α relativo**
Id. de Seq. n°:1	5	9,91	2,61	19,76	2,42	0,5	1,15
Id. de Seq. n°:1	2	10,60	2,36	22,91	1,18	0,52	1,36
Id. de Seq. n°:6	2	12,87	0,72	13,18	1,09	1,37	0,59
Controle com vetor vazio	5	19,75	3,15	29,33	2,45	1,35	1,39
Controle sem alvo	2	21,11	1,68	31,18	2,78	1,04	1,2

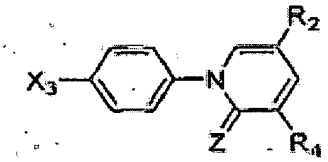
Controle sem alvo	5	20,56	1,85	34,67	4,95	1,19	1,19
Id. de Seq. n°:4	5	22,59	1,35	26,73	2,31	1,15	1,28
Id. de Seq. n°:2	2	25,61	2,54	46,74	2,73	1,38	1,58
Id. de Seq. n°:7	5	26,47	1,57	53,20	7,00	0,96	2,27
Id. de Seq. n°:7	2	34,49	3,92	60,04	5,45	1,38	1,14

EXEMPLO 13

Vários compostos foram avaliados para inibição nas isoformas de MAPK p38α e p38γ. Os valores de IC_{50} foram determinados usando-se os ensaios descritos no Exemplo 5 de WO 2006/122154, que está aqui incorporada por referência integralmente. Os resultados estão listados nas Tabela 2.

Tabela 2

Efeito inibitório dos compostos selecionados

				**IC_{50} da p38α (μM)**	**IC_{50} da p38α (μM)**
X_3	R_2	R_4	Z		
-H	-H	-H	O	4000	140
-OH	$-CH_3$	-H	O	500	127
-H	-glucuronida	-H	O	5000	1600
-H	$-CH_2OCH_3$	-H	O	NC	NC
-H	$-CH_3$	-OH	O	200	800
-F	$-CH_3$	-H	O	NC	410
$-OCH_3$	$-CF_3$	-H	O	6000	220
$-COCH_3$	-H	-H	O	3300	1200
-H	$-CH_3$	-H	S	200	700
Veja nota 1	$-CH_3$	-H	O	NC	NC
-H	-Br	-H	O	2600	90

$-OCH_3$	-Br	-H	O	2100	31
$-OCH_3$	$-CH_2F$	-H	O	1200	15
$-OCH_3$	$-CHF_2$	-H	O	5000	270
-H	Veja nota 2	-H	O	3800	46
-H	CO_2CH_3	-H	O	8700	900
pirfenidona				1800	630

[1]O grupo aril ligado ao 2-piridona nitrogênio é uma metade N-metilpiridínio

[2]Um grupo bromoaril é fundido às posições 5 e 6 de um anel 2-piridona.

NC (não calculado) refere-se a um valor além do limite superior de quantificação, e portanto muito grande para determinar com segurança.

Embora a presente invenção tenha sido descrita em alguns detalhes para propósitos de clareza e compreensão, aqueles habilitados na técnica avaliarão que várias mudanças na forma e detalhes podem ser feitas sem se afastar do verdadeiro escopo da invenção. Todas as figuras, apêndices, patentes, pedidos de patente e publicações, referidos acima, estão aqui incorporados por referência.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> InterMune, Inc.

<120> MÉTODO PARA MODULAR SISTEMA DA PROTEÍNA QUINASE ATIVADA POR ESTRESSE

<130> INTMU.028VPC

<150> 60/793,526

<151> 20/04/2006

<150> 60/775,823

<151> 21/02/2006

<150> 60/739,315

<151> 23/11/2005

<160> 8

<170> FastSEQ para Windows Versãp 4.0

<210> 1

<211> 57

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sintetizado Quimicamente

<400> 1

ccggctggat gacttcacgg actttctcga gaaagtccgt gaagtcatcc agttttt 57

<210> 2

<211> 57

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sintetizado Quimicamente

<400> 2

ccggcatctt gaattggatg cgctactcga gtagcgcatc caattcaaga tgttttt 57

<210> 3

<211> 57

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sintetizado Quimicamente

<400> 3

ccggccaggt ccagaagtat gatgactcga gtcatcatac ttctggacct ggttttt 57

<210> 4

<211> 57

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sintetizado Quimicamente

<400> 4

ccgggccctt ccagtccgag ctgttctcga gaacagctcg gactggaagg gcttttt 57

<210> 5

<211> 57

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sintetizado Quimicamente

<400> 5

ccgggttacg tgtggcagtg aagaactcga gttcttcact gccacacgta acttttt 57

<210> 6

<211> 57

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sintetizado Quimicamente

<400> 6

ccgggttcag ttccttatct accaactcga gttggtagat aaggaactga acttttt 57

<210> 7

<211> 57

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sintetizado Quimicamente

<400> 7

ccgggacata attcacaggg acctactcga gtaggtccct gtgaattatg tcttttt 57

<210> 8

<211> 57

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sintetizado Quimicamente

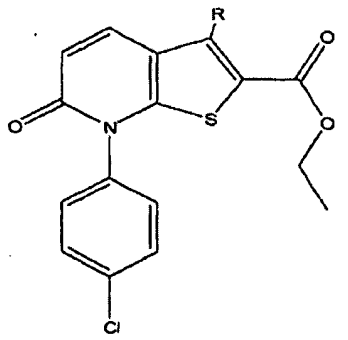
<400> 8

ccggctcggc acacagatga tgaaactcga gtttcatcat ctgtgtgccg agttttt 57

2009010884 6
PI0618939-3

REIVINDICAÇÕES

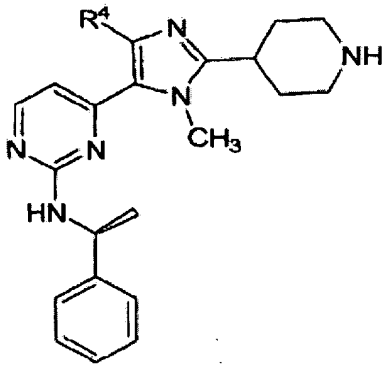
1. Composto **caracterizado** pelo fato de possuir a fórmula:



onde R é selecionado a partir do grupo consistindo de H, halo, ciano, nitro, hidroxi, alquil C_{1-6} opcionalmente substituído, cicloalquil C_{3-7} opcionalmente substituído, alquilcicloalquil C_{4-10} opcionalmente substituído, alquenil C_{2-6} opcionalmente substituído, alcoxi C_{1-6} opcionalmente substituído, aril C_6 ou C_{10} opcionalmente substituído, piridinil opcionalmente substituído, pirimidinil opcionalmente substituído, tienil opcionalmente substituído, furanil opcionalmente substituído, tiazolil opcionalmente substituído, oxazolil opcionalmente substituído, fenoxi opcionalmente substituído, tiofenoxi opcionalmente substituído, sulfoamido opcionalmente substituído, uréia opcionalmente substituída, tiouréia opcionalmente substituída, amido opcionalmente substituído, ceto opcionalmente substituído, carboxil opcionalmente substituído, carbamil opcionalmente substituído, sulfeto opcionalmente substituído, sulfóxido opcionalmente substituído, sulfona opcionalmente substituída, amino opcionalmente substituído, alcoxiamino opcionalmente substituído, alquiloxiheterociclil opcionalmente substituído, alquilamino opcionalmente substituído,

alquilcarboxi opcionalmente substituído, carbonil opcionalmente substituído, cicloalquil espirocíclico opcionalmente substituído, pirazinil opcionalmente substituído, piridazinil opcionalmente substituído, pirrolil opcionalmente substituído, tiofenil opcionalmente substituído, tiazolil opcionalmente substituído, oxazolil opcionalmente substituído, imidazolil opcionalmente substituído, isoxazolil opcionalmente substituído, pirazolil opcionalmente substituído, isotiazolil opcionalmente substituído, naftil opcionalmente substituído, quinolinil opcionalmente substituído, isoquinolinil opcionalmente substituído, quinoxalinil opcionalmente substituído, benzotiazolil opcionalmente substituído, benzotiofenil opcionalmente substituído, benzofuranil opcionalmente substituído, indolil opcionalmente substituído e benzimidazolil opcionalmente substituído.

2. Composto **caracterizado** pelo fato de possuir a fórmula:

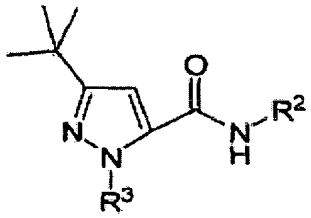


R^4 é selecionado a partir do grupo consistindo de H, halo, ciano, nitro, hidroxi, alquil C_{1-6} opcionalmente substituído, cicloalquil C_{3-7} opcionalmente substituído, alquilcicloalquil C_{4-10} opcionalmente substituído, alquenil

C_{2-6} opcionalmente substituído, alcoxi C_{1-6} opcionalmente substituído, aril C_6 ou C_{10} opcionalmente substituído, piridinil opcionalmente substituído, pirimidinil opcionalmente substituído, tienil opcionalmente substituído, furanil opcionalmente substituído, tiazolil opcionalmente substituído, oxazolil opcionalmente substituído, fenoxi opcionalmente substituído, tiofenoxi opcionalmente substituído, sulfoamido opcionalmente substituído, uréia opcionalmente substituída, tiouréia opcionalmente substituída, amido opcionalmente substituído, ceto opcionalmente substituído, carboxil opcionalmente substituído, carbamil opcionalmente substituído, sulfeto opcionalmente substituído, sulfóxido opcionalmente substituído, sulfona opcionalmente substituída, amino opcionalmente substituído, alcoxiamino opcionalmente substituído, alquiloxiheterociclil opcionalmente substituído, alquilamino opcionalmente substituído, alquilcarboxi opcionalmente substituído, carbonil opcionalmente substituído, cicloalquil espirocíclico opcionalmente substituído, pirazinil opcionalmente substituído, piridazinil opcionalmente substituído, pirrolil opcionalmente substituído, tiofenil opcionalmente substituído, tiazolil opcionalmente substituído, oxazolil opcionalmente substituído, imidazolil opcionalmente substituído, isoxazolil opcionalmente substituído, pirazolil opcionalmente substituído, isotiazolil opcionalmente substituído, naftil opcionalmente substituído, quinolinil opcionalmente substituído, isoquinolinil opcionalmente substituído, quinoxalinil opcionalmente substituído, benzotiazolil opcionalmente

substituído, benzotiofenil opcionalmente substituído, benzofuranil opcionalmente substituído, indolil opcionalmente substituído e benzimidazolil opcionalmente substituído.

3. Composto **caracterizado** pelo fato de possuir a fórmula:

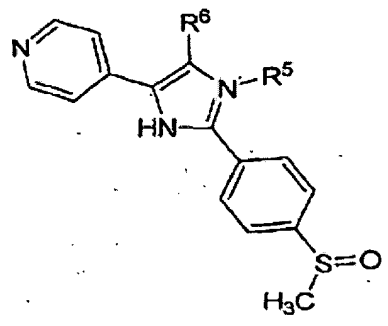


R^2 e R^3 são, cada um, individualmente, selecionados a partir do grupo consistindo de H, halo, ciano, nitro, hidroxi, alquil C_{1-6} opcionalmente substituído, cicloalquil C_{3-7} opcionalmente substituído, alquilcicloalquil C_{4-10} opcionalmente substituído, alquenil C_{2-6} opcionalmente substituído, alcoxi C_{1-6} opcionalmente substituído, aril C_6 ou C_{10} opcionalmente substituído, piridinil opcionalmente substituído, pirimidinil opcionalmente substituído, tienil opcionalmente substituído, furanil opcionalmente substituído, tiazolil opcionalmente substituído, oxazolil opcionalmente substituído, fenoxi opcionalmente substituído, tiofenoxi opcionalmente substituído, sulfonamido opcionalmente substituído, uréia opcionalmente substituída, tiouréia opcionalmente substituída, amido opcionalmente substituído, ceto opcionalmente substituído, carboxil opcionalmente substituído, carbamil opcionalmente substituído, sulfeto opcionalmente substituído, sulfóxido opcionalmente substituído, sulfona opcionalmente substituída, amino opcionalmente substituído, alcoxiamino opcionalmente substituído, alquiloxiheterociclil

opcionalmente substituído, alquilamino opcionalmente substituído, alquilcarboxi opcionalmente substituído, carbonil opcionalmente substituído, cicloalquil espirocíclico opcionalmente substituído, pirazinil opcionalmente substituído, piridazinil opcionalmente substituído, pirrolil opcionalmente substituído, tiofenil opcionalmente substituído, tiazolil opcionalmente substituído, oxazolil opcionalmente substituído, imidazolil opcionalmente substituído, isoxazolil opcionalmente substituído, pirazolil opcionalmente substituído, isotiazolil opcionalmente substituído, naftil opcionalmente substituído, quinolinil opcionalmente substituído, isoquinolinil opcionalmente substituído, quinoxalinil opcionalmente substituído, benzotiazolil opcionalmente substituído, benzotiofenil opcionalmente substituído, benzofuranil opcionalmente substituído, indolil opcionalmente substituído e benzimidazolil opcionalmente substituído;

onde o composto não é 1-(5-terc-butil-2-p-tolil-2H-pirazol-3-il)-3-[4-(2-morfolin-4-il-etoxi)naftalen-1-il] uréia (BIRB 796).

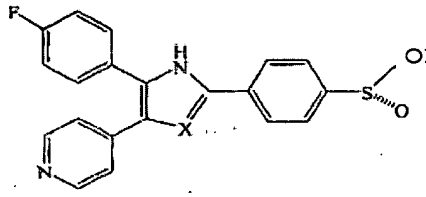
4. Composto **caracterizado** pelo fato de possuir a fórmula:



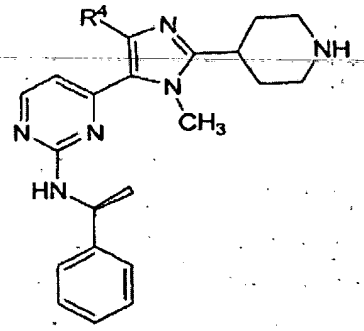
R^5 e R^6 são, cada um, individualmente, selecionados a

partir do grupo consistindo de H, halo, ciano, nitro, hidroxi, alquil C_{1-6} opcionalmente substituído, cicloalquil C_{3-7} opcionalmente substituído, alquilcicloalquil C_{4-10} opcionalmente substituído, alquenil C_{2-6} opcionalmente substituído, alcoxi C_{1-6} opcionalmente substituído, aril C_6 ou C_{10} opcionalmente substituído, piridinil opcionalmente substituído, pirimidinil opcionalmente substituído, tienil opcionalmente substituído, furanil opcionalmente substituído, tiazolil opcionalmente substituído, oxazolil opcionalmente substituído, fenoxi opcionalmente substituído, tiofenoxi opcionalmente substituído, sulfonamido opcionalmente substituído, uréia opcionalmente substituída, tiouréia opcionalmente substituída, amido opcionalmente substituído, ceto opcionalmente substituído, carboxil opcionalmente substituído, carbamil opcionalmente substituído, sulfeto opcionalmente substituído, sulfóxido opcionalmente substituído, sulfona opcionalmente substituída, amino opcionalmente substituído, alcoxiamino opcionalmente substituído, alquiloxiheterociclil opcionalmente substituído, alquilamino opcionalmente substituído, alquilcarboxi opcionalmente substituído, carbonil opcionalmente substituído, cicloalquil espirocíclico opcionalmente substituído, pirazinil opcionalmente substituído, piridazinil opcionalmente substituído, pirrolil opcionalmente substituído, tiofenil opcionalmente substituído, tiazolil opcionalmente substituído, oxazolil opcionalmente substituído, imidazolil opcionalmente substituído, isoxazolil opcionalmente substituído, pirazolil opcionalmente substituído, isotiazolil opcionalmente substituído, naftil opcionalmente

substituído, quinolinil opcionalmente substituído, isoquinolinil opcionalmente substituído, quinoxalinil opcionalmente substituído, benzotiazolil opcionalmente substituído, benzotiofenil opcionalmente substituído, benzofuranil opcionalmente substituído, indolil opcionalmente substituído e benzimidazolil opcionalmente substituído;

onde o composto não é  onde X é N.

5. Composto **caracterizado** pelo fato de possuir a fórmula:



onde, sob ligação do composto à p38γ, R^4 é um grupo posicionado a não menos que 5 Å e não mais que 25 Å distante de uma metade Met109 sulfidril p38γ.

6. Composto, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado** pelo fato de que R^4 é selecionado a partir do grupo consistindo de H, halo, ciano, nitro, hidroxi, alquil C_{1-6} opcionalmente substituído, cicloalquil C_{3-7} opcionalmente substituído, alquilcicloalquil C_{4-10} opcionalmente substituído, alquenil C_{2-6} opcionalmente substituído, alcoxi C_{1-6} opcionalmente substituído, aril C_6 ou C_{10} opcionalmente substituído, piridinil opcionalmente substituído, pirimidinil opcionalmente substituído, tienil opcionalmente substituído, furanil opcionalmente

substituído, tiazolil opcionalmente substituído, oxazolil opcionalmente substituído, fenoxi opcionalmente substituído, tiofenoxi opcionalmente substituído, sulfonamido opcionalmente substituído, uréia opcionalmente substituída, tiouréia opcionalmente substituída, amido opcionalmente substituído, ceto opcionalmente substituído, carboxil opcionalmente substituído, carbamil opcionalmente substituído, sulfeto opcionalmente substituído, sulfóxido opcionalmente substituído, sulfona opcionalmente substituída, amino opcionalmente substituído, alcoxiamino opcionalmente substituído, alquiloxiheterociclil opcionalmente substituído, alquilamino opcionalmente substituído, alquilcarboxi opcionalmente substituído, carbonil opcionalmente substituído, cicloalquil espirocíclico opcionalmente substituído, pirazinil opcionalmente substituído, piridazinil opcionalmente substituído, pirrolil opcionalmente substituído, tiofenil opcionalmente substituído, tiazolil opcionalmente substituído, oxazolil opcionalmente substituído, imidazolil opcionalmente substituído, isoxazolil opcionalmente substituído, pirazolil opcionalmente substituído, isotiazolil opcionalmente substituído, naftil opcionalmente substituído, quinolinil opcionalmente substituído, isoquinolinil opcionalmente substituído, quinoxalinil opcionalmente substituído, benzotiazolil opcionalmente substituído, benzotiofenil opcionalmente substituído, benzofuranil opcionalmente substituído, indolil opcionalmente substituído e benzimidazolil opcionalmente substituído.

7. Uso de um composto conforme definido na

reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de ser para preparar um medicamento para tratamento ou prevenção de uma doença inflamatória ou fibrótica em um indivíduo.

8. Uso de um composto conforme definido na reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de ser para preparar um medicamento para tratamento ou prevenção de uma doença inflamatória ou fibrótica em um indivíduo.

9. Uso de um composto conforme definido na reivindicação 3, **caracterizado** pelo fato de ser para preparar um medicamento para tratamento ou prevenção de uma doença inflamatória ou fibrótica em um indivíduo.

10. Uso de um composto conforme definido na reivindicação 4, **caracterizado** pelo fato de ser para preparar um medicamento para tratamento ou prevenção de uma doença inflamatória ou fibrótica em um indivíduo.

11. Uso de um composto conforme definido na reivindicação 5, **caracterizado** pelo fato de ser para preparar um medicamento para tratamento ou prevenção de uma doença inflamatória ou fibrótica em um indivíduo.

12. Uso de um composto conforme definido na reivindicação 6, **caracterizado** pelo fato de ser para preparar um medicamento para tratamento ou prevenção de uma doença inflamatória ou fibrótica em um indivíduo.

13. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 7, 8, 9, 10, 11 ou 12, **caracterizado** pelo fato de que a condição inflamatória ou fibrótica é selecionada a partir do grupo consistindo de fibrose, fibrose pulmonar idiopática, doença pulmonar obstrutiva crônica, fibrose pulmonar inflamatória artrite reumatóide, espondilite reumatóide, osteoartrite, gota, sepse, choque

séptico, choque endotóxico, sepse gram-negativa, síndrome de choque tóxico, síndrome da dor miofascial (MPS), siguelose, asma, síndrome de estresse respiratório do adulto, doença inflamatória do intestino, doença de Crohn, psoríase, eczema; colite ulcerativa, nefrite glomerular, escleroderma, tiroidite crônica, doença de Graves, doença de Ormond, gastrite autoimune, miastenia grave, anemia hemolítica autoimune, neutropenia autoimune, trombocitopenia, fibrose pancreática, hepatite crônica ativa, fibrose hepática, doença renal, fibrose renal, síndrome do intestino irritável, pirese, restenose, malária cerebral, derrame e dano isquêmico, trauma neural, doença de Alzheimer, doença de Huntington, doença de Parkinson, dor aguda e crônica, alergias, hipertrofia cardíaca, falência crônica do coração, síndrome coronária aguda, caquexia, malária, lepra, leishimaniose, doença de Lyme, síndrome de Reiter; sinovite aguda, degeneração muscular, bursite, tendinite, tenosinovite, síndrome de disco intervertebral herniado, rompido ou prolapsado, osteopetrose, trombose, silicose, sarcose pulmonar, doenças de reabsorção de ossos, câncer, esclerose múltipla, lúpus e fibromialgia, AIDS, infecção viral por Herpes zoster, infecção viral por Herpes simplex, vírus influenza, Síndrome Respiratória Aguda Severa (SARS) e infecção por citomegalovírus e diabetes mellitus.

14. Composição farmacêutica **caracterizada** pelo fato de compreender:

a) o composto da reivindicação 1 ou reivindicação 2 ou reivindicação 3 ou reivindicação 4 ou reivindicação 5 ou reivindicação 6; e

b) um veículo farmaceuticamente aceitável.

15. Uso de um composto conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5 ou 6, **caracterizado** pelo fato de ser para preparar um medicamento para tratamento ou prevenção de uma doença ou condição descrita acima.

Fig. 1

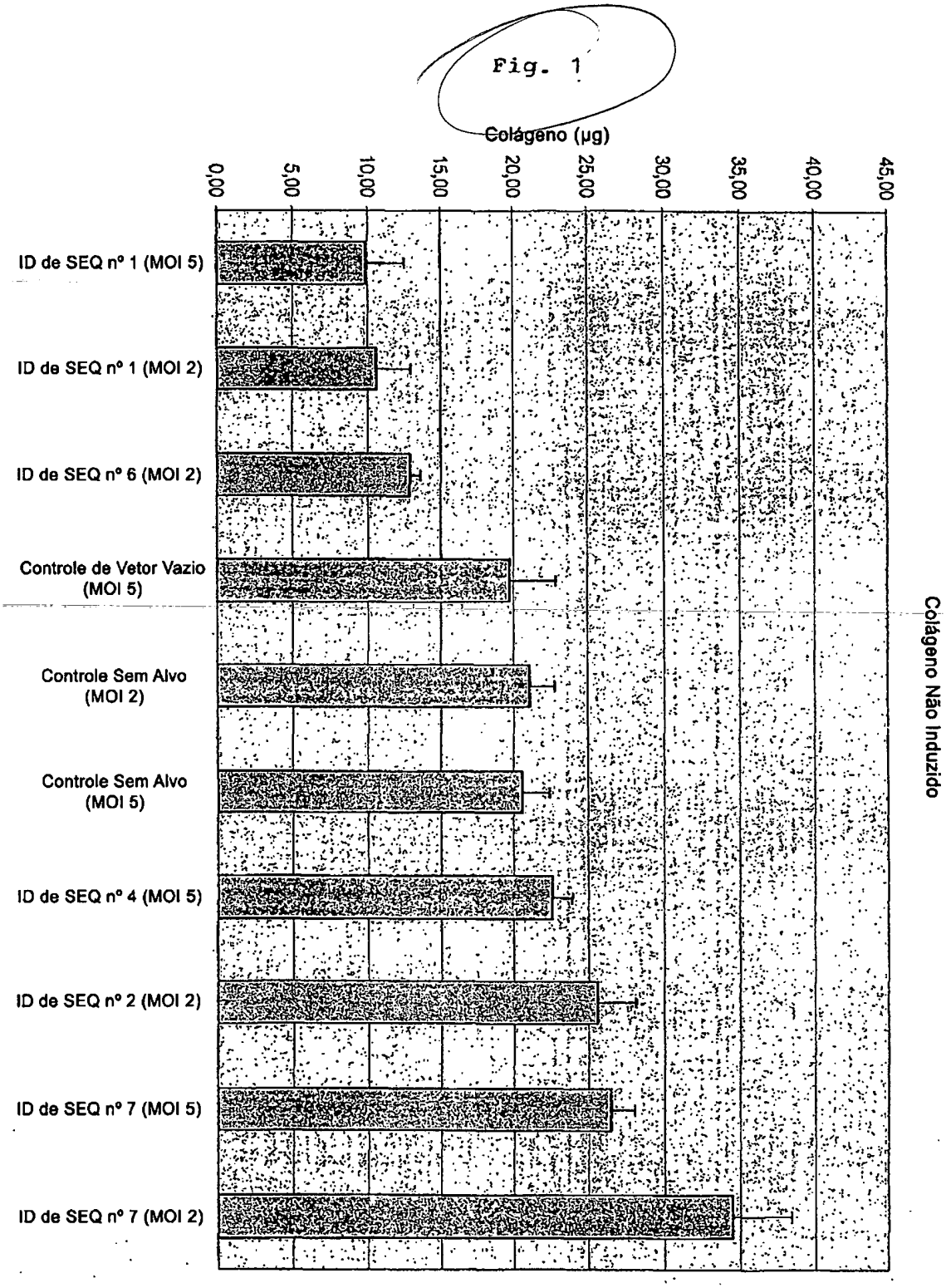
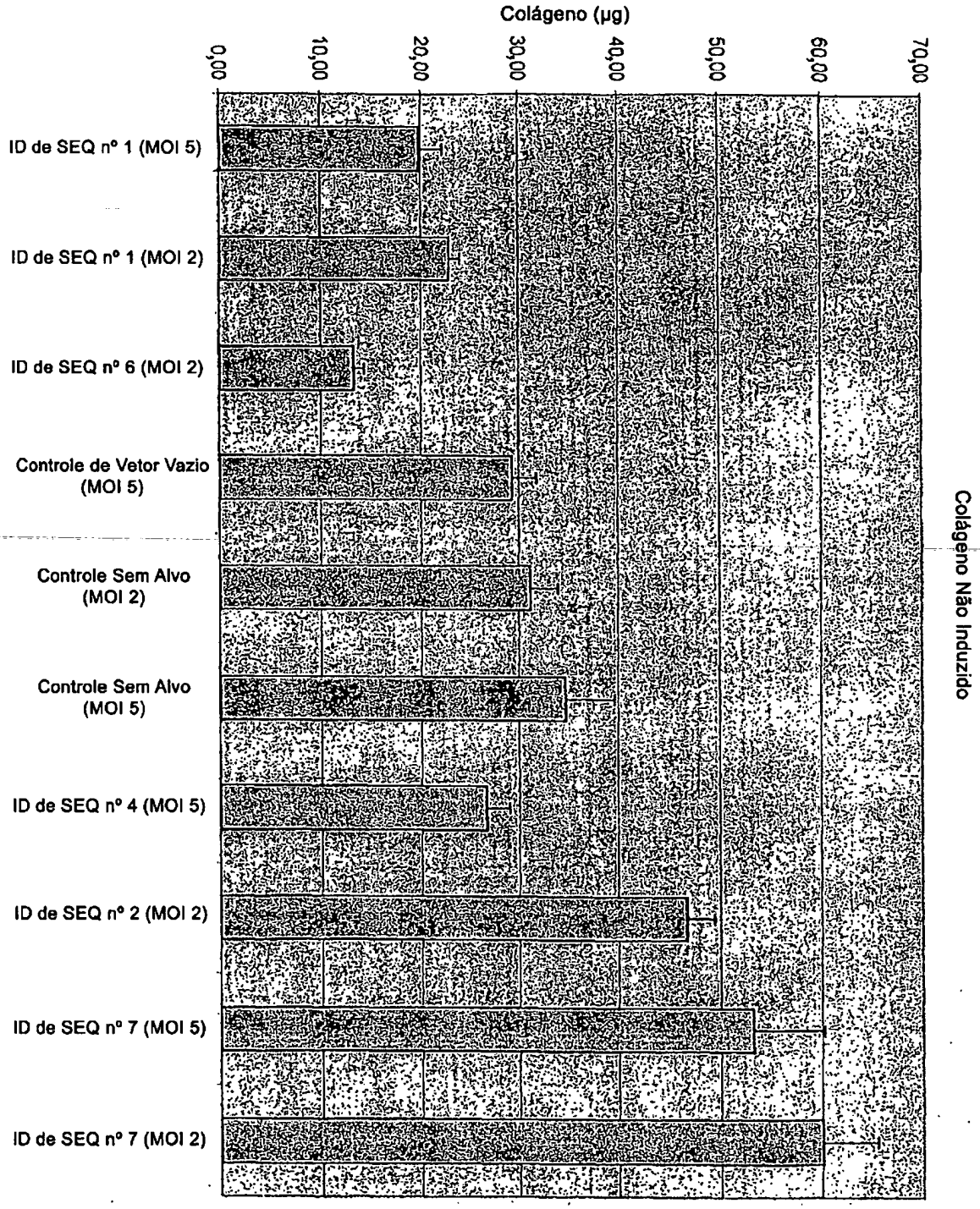

Colágeno (µg)
0,00
5,00
10,00
15,00
20,00
25,00
30,00
35,00
40,00
45,00
ID de SEQ nº 1 (MOI 5)
ID de SEQ nº 1 (MOI 2)
ID de SEQ nº 6 (MOI 2)
Controle de Vetor Vazio (MOI 5)
Controle Sem Alvo (MOI 2)
Controle Sem Alvo (MOI 5)
ID de SEQ nº 4 (MOI 5)
ID de SEQ nº 2 (MOI 2)
ID de SEQ nº 7 (MOI 5)
ID de SEQ nº 7 (MOI 2)
Colágeno Não Induzido

Fig. 2


Colágeno (µg)
0,00
10,00
20,00
30,00
40,00
50,00
60,00
70,00
ID de SEQ nº 1 (MOI 5)
ID de SEQ nº 1 (MOI 2)
ID de SEQ nº 6 (MOI 2)
Controle de Vetor Vazio (MOI 5)
Controle Sem Alvo (MOI 2)
Controle Sem Alvo (MOI 5)
ID de SEQ nº 4 (MOI 5)
ID de SEQ nº 2 (MOI 2)
ID de SEQ nº 7 (MOI 5)
ID de SEQ nº 7 (MOI 2)
Colágeno Não Induzido

MÉTODO PARA MODULAÇÃO DE SISTEMA DE PROTEÍNA QUINASE ATIVADA POR ESTRESSE

Foi recentemente descoberto que um efeito terapêutico alto no tratamento de várias doenças associadas com atividade aumentada da quinase p38 pode ser alcançado utilizando-se um potente composto inibidor da quinase p38? que também possua atividade inibidora contra a p38?. Além disso, descobriu-se que a redução das atividades tanto da quinase p38? quanto da quinase p38? sem reduzir a atividade de uma quinase p38? a um grau em que efeitos colaterais indesejados são observados sob administração a um indivíduo possuindo uma doença associada com atividade aumentada da quinase p38 é alcançável pela modificação dos inibidores da p38? de forma que a modificação gere atividade inibidora contra a p38?. São descritos compostos com atividade contra a p38? E p38?. São divulgados métodos de uso dos compostos e composições descritos para modular um sistema de proteína quinada ativada por estresse (SAPK) com um composto ativo, onde o composto ativo exibe inibição das MAPKs p38? e p38?. São também divulgados métodos para identificação de compostos que inibem as MAPKs p38? e p38? e que podem modular um sistema de proteína quinase ativada por estresse (SAPK).