



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 362 357**

51 Int. Cl.:  
**A61K 31/495** (2006.01)  
**C07D 295/26** (2006.01)  
**A61P 25/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03781400 .1**  
96 Fecha de presentación : **28.10.2003**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1558259**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.08.2005**

54 Título: **Derivados de urea como antagonistas del receptor de IL-8.**

30 Prioridad: **29.10.2002 US 421956 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**04.07.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**04.07.2011**

73 Titular/es: **GLAXOSMITHKLINE L.L.C.**  
**One Franklin Plaza 200 North 16th Street**  
**Philadelphia, Pennsylvania 19102, US**

72 Inventor/es: **Busch-Petersen, Jakob;**  
**Palovich, Michael, R. y**  
**Widdowson, Katherine, L.**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 362 357 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Derivados de urea como antagonistas del receptor de IL-8

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a nuevos compuestos de difenil urea sustituidos con sulfonamina, en particular N-[4-cloro-2-hidroxi-3-(1-piperazinilsulfonil)fenil]-N'-(2-cloro-3-fluorofenil)urea o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, composiciones farmacéuticas, procedimientos para su preparación y uso de los mismos en el tratamiento de enfermedades mediadas por IL-8, GRO $\alpha$ , GRO $\beta$ , GRO $\gamma$ , NAP-2 y ENA-78.

**Antecedentes de la invención**

10 Se han aplicado muchos nombres diferentes a la Interleucina-8 (IL-8), tales como proteína atrayente/de activación de neutrófilos 1 (NAP-1), factor quimiotáctico de neutrófilos derivado de monocitos (MDNCF), factor activador de neutrófilos (NAF) y factor quimiotáctico de linfocitos T. La interleucina-8 es un quimioatrayente para neutrófilos, basófilos y un subconjunto de linfocitos T. Se produce por una mayoría de células nucleadas, incluyendo macrófagos, fibroblastos, células endoteliales y epiteliales expuestas a TNF, IL-1 $\alpha$ , IL- $\beta$  o LPS y por neutrófilos en sí mismos cuando se exponen a LPS o factores quimiotácticos tales como FMLP. M. Baggiolini y col., J. Clin. Invest. 84, 1045 (1989); J. Schroder y col., J. Immunol. 139, 3474 (1987) y J. Immunol. 144, 2223 (1990); Strieter, y col., Science 243, 1467 (1989) y J. Biol. Chem. 264, 10621 (1989); Cassatella y col., J. Immunol. 148, 3216 (1992).

15 GRO $\alpha$ , GRO $\beta$ , GRO $\gamma$  y NAP-2 también pertenecen a la familia de quimiocinas. Como a IL-8 a estas quimiocinas también se les ha denominado por diferentes nombres. Por ejemplo se ha denominado GRO $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , MGSA $\alpha$ , $\beta$ , y  $\gamma$  respectivamente (Actividad Estimuladora de Crecimiento de Melanomas), véase Richmond y col., J. Cell Physiology 129, 375 (1986) y Chang y col., J. Immunol 148, 451 (1992). Todas las quimiocinas de la familia  $\alpha$  que poseen el motivo ELR precediendo directamente al motivo CXC se unen al receptor de IL-8 B (CXCR2).

20 IL-8, GRO $\alpha$ , GRO $\beta$ , GRO $\gamma$ , NAP-2 y ENA-78 estimulan varias funciones *in vitro*. Se ha mostrado que todas tienen propiedades quimioatrayentes para neutrófilos, mientras que IL-8 y GRO $\alpha$  han demostrado actividad quimiotáctica para linfocitos T y basófilos. Además IL-8 puede inducir liberación de histamina de basófilos de individuos normales y atópicos. GRO- $\alpha$  e IL-8 pueden además inducir la liberación de enzima lisosomal y explosión respiratoria de neutrófilos. También se ha mostrado que IL-8 aumenta la expresión en superficie de Mac-1 (CD 11b/CD18) en neutrófilos sin síntesis de proteína nueva. Esto puede contribuir al aumento de la adhesión de los neutrófilos a células endoteliales vasculares. Muchas enfermedades conocidas se caracterizan por infiltración de neutrófilos masiva. Puesto que IL-8, GRO $\alpha$ , GRO $\beta$ , GRO $\gamma$  y NAP-2 promueven la acumulación y activación de neutrófilos, estas quimiocinas se han implicado en una amplia diversidad de trastornos inflamatorios agudos y crónicos incluyendo psoriasis y artritis reumatoide, Baggiolini y col., FEBS Lett. 307, 97 (1992); Miller y col., Crit. Rev. Immunol. 12, 17 (1992); Oppenheim y col., Annu. Rev. Immunol. 9, 617 (1991); Seitz y col., J. Clin. Invest. 87, 463 (1991); Miller y col., Am. Rev. Respir. Dis. 146, 427 (1992); Donnely y col., Lancet 341, 643 (1993). Además también se ha implicado a las quimiocinas ELR (las que contienen el motivo de aminoácidos ELR justo antes del motivo CXC) en angiostasis, Strieter y col., Science 258, 1798 (1992).

25 *In vitro*, IL-8, GRO $\alpha$ , GRO $\beta$ , GRO $\gamma$  y NAP-2 inducen cambio de forma de los neutrófilos, quimotaxis, liberación de gránulos y explosión respiratoria, uniéndose a y activando receptores de la familia ligada a proteína G de siete transmembranas, en particular uniéndose a receptores de IL-8, más notablemente el receptor IL-8 $\beta$  (CXCR2). Thomas y col., J. Biol. Chem. 266, 14839 (1991); y Holmes y col., Science 253, 1278 (1991). El desarrollo de moléculas no peptídicas antagonistas para miembros de esta familia de receptores tiene precedente. Para una revisión véase R. Freidinger in: Progress in Drug Research, Vol. 40, pág. 33-98, Birkhauser Verlag, Basel 1993. Por ello, el receptor de IL-8 representa una diana prometedor para el desarrollo de nuevos agentes antiinflamatorios.

30 Se han caracterizado dos receptores de IL-8 humana de alta afinidad (77 % de homología): IL-8R $\alpha$ , que se une solamente a IL-8 con alta afinidad e IL-8R $\beta$ , que tiene alta afinidad con IL-8 así como con GRO $\alpha$ , GRO $\beta$ , GRO $\gamma$  y NAP-2. Véase Holmes y col., mencionado anteriormente; Murphy y col., Science 253, 1280 (1991); Lee y col., J. Biol. Chem. 267, 16283 (1992); LaRosa y col., J. Biol. Chem. 267, 25402 (1992); and Gayle y col., J. Biol. Chem. 268, 7283 (1993).

35 Sigue existiendo una necesidad para tratamiento, en este campo, para compuestos, que son capaces de unirse al receptor de IL-8  $\alpha$  o  $\beta$ . Por lo tanto, las afecciones asociadas con un aumento en la producción de IL-8 (que es responsable de quimiotaxis de subconjuntos de neutrófilos y linfocitos T en el sitio inflamatorio) se beneficiarían por compuestos, que son inhibidores de unión a receptor de IL-8.

El documento WO 0036442 desvela derivados de difenil urea de hidroxilo como inhibidores de IL-8.

**Sumario de la invención**

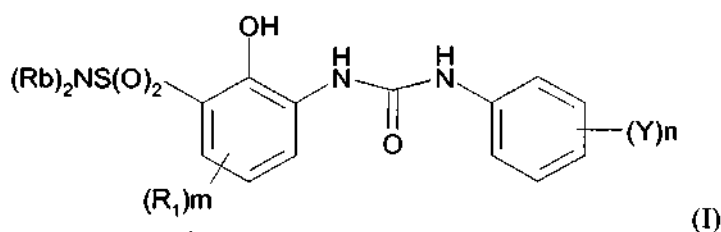
La presente invención proporciona compuestos útiles para el tratamiento de enfermedades mediadas por

quimiocinas, en las que la quimiocina es una que se une a un receptor de IL-8  $\alpha$  o  $\beta$  y cuyo uso comprende administrar una cantidad eficaz de un compuesto de Fórmula (I), en particular un compuesto que es N-[4-cloro-2-hidroxi-3-(1-piperazinilsulfonyl)fenil]-N'-(2-cloro-3-fluorofenil)urea o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma. En particular la quimiocina es IL-8.

- 5 La presente invención también se refiere a un compuesto de Fórmula (I), en particular un compuesto que es N-[4-cloro-2-hidroxi-3-(1-piperazinilsulfonyl)fenil]-N'-(2-cloro-3-fluorofenil)urea o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para su uso en la inhibición de la unión de IL-8 a sus receptores en un mamífero que lo necesite.

- La presente invención proporciona un compuesto de Fórmula (I), en particular un compuesto que es N-[4-cloro-2-hidroxi-3-(1-piperazinilsulfonyl)fenil]-N'-(2-cloro-3-fluorofenil)urea o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de Fórmula (I), en particular un compuesto que es N-[4-cloro-2-hidroxi-3-(1-piperazinilsulfonyl)fenil]-N'-(2-cloro-3-fluorofenil)urea o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y un vehículo o diluyente farmacéutico.

Los compuestos de Fórmula (I) se representan por la estructura:



- 15 en la que

- R<sub>b</sub> es independientemente hidrógeno, NR<sub>6</sub>R<sub>7</sub>, OH, OR<sub>a</sub>, alquilo C<sub>1-5</sub>, arilo, arilalquilo C<sub>1-4</sub>, arilalquenilo C<sub>2-4</sub>; cicloalquilo, cicloalquil-alquilo C<sub>1-5</sub>, heteroarilo, heteroarilalquilo C<sub>1-4</sub>, heteroarilalquenilo C<sub>2-4</sub>, heterocíclico, alquilo C<sub>1-4</sub> heterocíclico o un resto alqueno C<sub>2-4</sub> heterocíclico, pudiendo estar todos estos restos opcionalmente sustituidos de una a tres veces independientemente con halógeno; nitro; alquilo C<sub>1-4</sub> halosustituido; alquilo C<sub>1-4</sub>; amino, amina sustituida con mono- o di-alquilo C<sub>1-4</sub>; OR<sub>a</sub>; C(O)R<sub>a</sub>; NR<sub>a</sub>C(O)OR<sub>a</sub>; OC(O)NR<sub>6</sub>R<sub>7</sub>; hidroxilo; NR<sub>9</sub>C(O)R<sub>a</sub>; S(O)<sub>m</sub>R<sub>a</sub>; C(O)NR<sub>6</sub>R<sub>7</sub>; C(O)OH; C(O)OR<sub>a</sub>; S(O)<sub>2</sub>NR<sub>6</sub>R<sub>7</sub>; NHS(O)<sub>2</sub>R<sub>a</sub>. Como alternativa, los dos sustituyentes R<sub>b</sub> pueden unirse para formar un anillo de 3-10 miembros, opcionalmente sustituido y que contiene, además de carbono, independientemente, de 1 a 3 restos NR<sub>a</sub>, O, S, SO o SO<sub>2</sub> que pueden estar opcionalmente insaturados.
- R<sub>a</sub> es un alquilo, arilo, arilalquilo C<sub>1-4</sub>, heteroarilo, heteroarilalquilo C<sub>1-4</sub>, heterocíclico, COOR<sub>a</sub> o un resto alquilo C<sub>1</sub> heterocíclico, pudiendo estar todos estos restos opcionalmente sustituidos;
- m es un número entero que tiene un valor de 1 a 3; m' es 0 o un número entero que tiene un valor de 1 ó 2;
- n es un número entero que tiene un valor de 1 a 3;
- q es 0, o un número entero que tiene un valor de 1 a 10;
- 20 t es 0, o un número entero que tiene un valor de 1 ó 2;
- s es un número entero que tiene un valor de 1 a 3;
- R<sub>1</sub> se selecciona independientemente entre hidrógeno; halógeno; nitro; ciano; alquilo C<sub>1-10</sub>; alquilo C<sub>1-10</sub> halosustituido; alqueno C<sub>2-10</sub>; alcoxi C<sub>1-10</sub>; alcoxi C<sub>1-1</sub> halosustituido; azida; S(O)tR<sub>4</sub>; (CR<sub>8</sub>R<sub>8</sub>)qS(O)tR<sub>4</sub>; hidroxilo; alquilo C<sub>1-4</sub> hidroxilo-sustituido; arilo; arilalquilo C<sub>1-4</sub>; arilalquenilo C<sub>2-10</sub>; ariloxi; aril-alquil C<sub>1-4</sub>-oxi; heteroarilo; heteroarilalquilo; heteroarilalquenilo C<sub>2-10</sub>; heteroaril-alquil C<sub>1-4</sub>-oxi; heterocíclico, alquilo C<sub>1-4</sub> heterocíclico; alquil C<sub>1-4</sub>-oxi heterocíclico; heterocíclicalquenilo C<sub>2-10</sub>; (CR<sub>8</sub>R<sub>8</sub>)qNR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>; (CR<sub>8</sub>R<sub>8</sub>)qC(O)<sub>5</sub>; alqueno C<sub>2-10</sub>-C(O)NR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>; (CR<sub>8</sub>R<sub>8</sub>)qC(O)NR<sub>4</sub>R<sub>10</sub>; S(O)<sub>3</sub>R<sub>8</sub>; (CR<sub>8</sub>R<sub>8</sub>)qC(O)R<sub>11</sub>; alqueno C<sub>2-10</sub>-C(O)R<sub>11</sub>; alqueno C<sub>2-10</sub>-C(O)OR<sub>11</sub>; (CR<sub>8</sub>R<sub>8</sub>)qC(O)OR<sub>11</sub>; (CR<sub>8</sub>R<sub>8</sub>)qOC(O)R<sub>11</sub>; (CR<sub>8</sub>R<sub>8</sub>)qNR<sub>4</sub>C(O)R<sub>11</sub>; (CR<sub>8</sub>R<sub>8</sub>)qC(NR<sub>4</sub>)NR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>; (CR<sub>8</sub>R<sub>8</sub>)qNR<sub>4</sub>C(NR<sub>5</sub>)R<sub>11</sub>; (CR<sub>8</sub>R<sub>8</sub>)qNHS(O)<sub>2</sub>R<sub>13</sub>; (CR<sub>8</sub>R<sub>8</sub>)qS(O)<sub>2</sub>NR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>; o dos restos R<sub>1</sub> juntos pueden formar O-(CH<sub>2</sub>)<sub>s</sub>O o un anillo saturado o insaturado, de 5 a 6 miembros, y en el que los restos alquilo, arilo, arilalquilo, heteroarilo y heterocíclico pueden estar opcionalmente sustituidos;
- R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son independientemente hidrógeno, alquilo C<sub>1-4</sub> opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, arilalquilo C<sub>1-4</sub> opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, heteroarilalquilo C<sub>1-4</sub> opcionalmente sustituido, heterocíclico, alquilo C<sub>1-4</sub> heterocíclico, o R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> junto con el nitrógeno al que están unidos forman un anillo de 5 a 7 miembros que puede comprender opcionalmente un heteroátomo adicional seleccionado entre O/N/S;
- R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> son independientemente hidrógeno, o un alquilo C<sub>1-4</sub>, heteroarilo, arilo, alquilarilo, alquil-heteroalquilo C<sub>1-4</sub> o R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> junto con el nitrógeno al que están unidos forman un anillo de 5 a 7 miembros, pudiendo contener opcionalmente dicho anillo un heteroátomo adicional seleccionado entre oxígeno, nitrógeno o azufre, y donde dicho anillo puede estar opcionalmente sustituido;
- 50 Y es hidrógeno; halógeno; nitro; ciano; alquilo C<sub>1-10</sub> halosustituido; alquilo C<sub>1-10</sub>; alqueno C<sub>2-10</sub>; alcoxi C<sub>1-10</sub>;

- alcoxi C<sub>1-10</sub> halosustituido; azida; (CR<sub>8</sub>R<sub>8</sub>)qS(O)<sub>t</sub>R<sub>a</sub>, (CR<sub>8</sub>R<sub>8</sub>)qOR<sub>a</sub>; hidroxi; alquilo C<sub>1-4</sub> hidroxi-sustituido; arilo; arilalquilo C<sub>1-4</sub>; ariloxi; arilalquil C<sub>1-4</sub>-oxi; arilalquenilo C<sub>2-10</sub>; heteroarilo; heteroarilalquilo; heteroarilalquil C<sub>1-4</sub>-oxi; heteroarilalquenilo C<sub>2-10</sub>; heterocíclico; alquilo C<sub>1-4</sub> heterocíclico; heterocíclicalquenilo C<sub>2-10</sub>; (CR<sub>8</sub>R<sub>8</sub>)qNR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>; alquenil C<sub>2-10</sub>-C(O)NR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>; (CR<sub>8</sub>R<sub>8</sub>)qC(O)NR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>; (CR<sub>8</sub>R<sub>8</sub>)qC(O)NR<sub>4</sub>R<sub>10</sub>; S(O)<sub>3</sub>R<sub>8</sub>; (CR<sub>8</sub>R<sub>8</sub>)qC(O)R<sub>11</sub>; alquenil C<sub>2-10</sub>-C(O)R<sub>11</sub>; (CR<sub>8</sub>R<sub>8</sub>)qC(O)OR<sub>11</sub>; alquenil C<sub>2-10</sub>-C(O)OR<sub>1</sub>; (CR<sub>8</sub>R<sub>8</sub>)qOC(O)R<sub>11</sub>; (CR<sub>8</sub>R<sub>8</sub>)qNR<sub>4</sub>C(O)R<sub>11</sub>; (CR<sub>8</sub>R<sub>8</sub>)qNHS(O)<sub>2</sub>R<sub>13</sub>; (CR<sub>8</sub>R<sub>8</sub>)qS(O)<sub>2</sub>NR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>; (CR<sub>8</sub>R<sub>8</sub>)qC(NR<sub>4</sub>)NR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>; (CR<sub>8</sub>R<sub>8</sub>)qNR<sub>4</sub>C(NR<sub>5</sub>)R<sub>11</sub>; o dos restos Y juntos pueden formar O-(CH<sub>2</sub>)<sub>s</sub>-O o un anillo saturado o insaturado, de 5 a 6 miembros; y en el que los grupos alquilo, arilo, arilalquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo, heterocíclico, alquilo heterocíclico pueden estar opcionalmente sustituidos;
- 10 R<sub>8</sub> es hidrógeno o alquilo C<sub>1-4</sub>;  
R<sub>9</sub> es hidrógeno o un alquilo C<sub>1-4</sub>;  
R<sub>10</sub> es alquil C<sub>1-10</sub>-C(O)<sub>2</sub>R<sub>8</sub>;  
R<sub>11</sub> es hidrógeno, alquilo C<sub>1-4</sub> opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, arilalquilo C<sub>1-4</sub> opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, heteroarilalquilo C<sub>1-4</sub> opcionalmente sustituido, heterocíclico opcionalmente sustituido o alquilo C<sub>1-4</sub> heterocíclico opcionalmente sustituido;
- 15 R<sub>13</sub> es adecuadamente alquilo C<sub>1-4</sub>, arilo, arilalquilo C<sub>1-4</sub>, heteroarilo, heteroarilalquilo C<sub>1-4</sub>, heterocíclico o alquilo C<sub>1-4</sub> heterocíclico;

o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

### Descripción detallada de la invención

- 20 Los compuestos de Fórmula (I), incluyendo N-[4-cloro-2-hidroxi-3-(1-piperazinilsulfonil)fenil]-N'-(2-cloro-3-fluorofenil)urea también pueden usarse junto con el tratamiento veterinario de mamíferos, distintos de seres humanos, que necesitan inhibición de IL-8 u otras quimioquinas que se unen a los receptores α y β de IL-8. Las enfermedades mediadas por quimioquinas para el tratamiento, terapéutica o profilácticamente, en animales, incluyen patologías tales como las indicadas en el presente documento en la sección Procedimientos de Tratamiento.
- 25 Adecuadamente, R<sub>b</sub> es independientemente hidrógeno, NR<sub>6</sub>R<sub>7</sub>, OH, OR<sub>a</sub>, alquilo C<sub>1-4</sub>, arilo, arilalquilo C<sub>1-4</sub>, arilalquenilo C<sub>2-4</sub>, heteroarilo, heteroarilalquilo C<sub>1-4</sub>, heteroarilalquenilo C<sub>2-4</sub>, heterocíclico, alquilo C<sub>1-4</sub> heterocíclico o un resto alquenil C<sub>2-4</sub> heterocíclico, pudiendo estar todos estos restos opcionalmente sustituidos de una a tres veces independientemente con halógeno; nitro; alquilo C<sub>1-4</sub> halo-sustituido; alquilo C<sub>1-4</sub>; amino, amina sustituida con mono-o di-alquilo C<sub>1-4</sub>; cicloalquilo, cicloalquil-alquilo C<sub>1-5</sub>, OR<sub>a</sub>; C(O)R<sub>a</sub>; NR<sub>a</sub>C(O)OR<sub>a</sub>; OC(O)NR<sub>6</sub>R<sub>7</sub>; ariloxi; aril C<sub>1-4</sub>-oxi; hidroxi; alcoxi C<sub>1-4</sub>; NR<sub>9</sub>C(O)R<sub>a</sub>; S(O)<sub>m</sub>R<sub>a</sub>; C(O)NR<sub>6</sub>R<sub>7</sub>; C(O)OH; C(O)OR<sub>a</sub>; S(O)<sub>2</sub>NRR<sub>6</sub>R; NHS(O)<sub>2</sub>R<sub>a</sub>;
- 30

Como alternativa, los dos sustituyentes R<sub>b</sub> pueden unirse para formar un anillo de 3-10 miembros, opcionalmente sustituido y que contiene, además de carbono, independientemente, de 1 a 3 restos NR<sub>9</sub>, O, S, SO o SO<sub>2</sub> que pueden estar opcionalmente sustituidos.

- 35 Adecuadamente, R<sub>a</sub> es un alquilo, arilo, arilalquilo C<sub>1-4</sub>, heteroarilo, heteroarilalquilo C<sub>1-4</sub>, heterocíclico o un resto alquilo C<sub>1-4</sub> heterocíclico, pudiendo estar todos estos restos opcionalmente sustituidos.

- Adecuadamente, R<sub>1</sub> se selecciona independientemente entre hidrógeno; halógeno; nitro; ciano; alquilo C<sub>1-10</sub> halosustituido, tal como CF<sub>3</sub>; alquilo C<sub>1-10</sub>, tal como metilo, etilo, isopropilo, o n-propilo; alquenilo C<sub>2-10</sub>; alcoxi C<sub>1-10</sub>, tal como metoxi o etoxi; alcoxi C<sub>1-10</sub> halosustituido, tal como trifluorometoxi; azida; (CR<sub>8</sub>R<sub>8</sub>)qS(O)<sub>t</sub>R<sub>4</sub>, en el que t es 0, 1 ó 2; hidroxi; hidroxi-alquilo C<sub>1-4</sub>, tal como metanol o etanol; arilo, tal como fenilo o naftilo; arilalquilo C<sub>1-4</sub>, tal como bencilo; ariloxi, tal como fenoxi; aril-alquil C<sub>1-4</sub>-oxi, tal como benciloxi; heteroarilo; heteroarilalquilo; heteroarilalquil C<sub>1-4</sub>-oxi; arilalquenilo C<sub>2-10</sub>; heteroarilalquenilo C<sub>2-10</sub>; alquenilo C<sub>2-10</sub> heterocíclico; (CR<sub>8</sub>R<sub>8</sub>)qNR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>; alquenil C<sub>2-10</sub>-C(O)NR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>; (CR<sub>8</sub>R<sub>8</sub>)qC(O)NR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>; (CR<sub>8</sub>R<sub>8</sub>)qC(O)NR<sub>4</sub>R<sub>10</sub>; S(O)<sub>3</sub>H; S(O)<sub>3</sub>R<sub>8</sub>; (CR<sub>8</sub>R<sub>8</sub>)qC(O)R<sub>11</sub>; alquenil C<sub>2-10</sub>-C(O)R<sub>11</sub>; alquenil C<sub>2-10</sub>-C(O)OR<sub>11</sub>; (CR<sub>8</sub>R<sub>8</sub>)qC(O)R<sub>11</sub>; (CR<sub>8</sub>R<sub>8</sub>)qC(O)OR<sub>11</sub>; (CR<sub>8</sub>R<sub>8</sub>)qOC(O)R<sub>11</sub>; (CR<sub>8</sub>R<sub>8</sub>)qNR<sub>4</sub>C(O)R<sub>11</sub>; (CR<sub>8</sub>R<sub>8</sub>)qC(NR<sub>4</sub>)NR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>; (CR<sub>8</sub>R<sub>8</sub>)qNR<sub>4</sub>C(NR<sub>5</sub>)R<sub>11</sub>; (CR<sub>8</sub>R<sub>8</sub>)qNHS(O)<sub>2</sub>R<sub>13</sub>; (CR<sub>8</sub>R<sub>8</sub>)qS(O)<sub>2</sub>NR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>. Todos los restos que contienen arilo, heteroarilo y heterocíclico pueden estar opcionalmente sustituidos como se define a continuación en el presente documento.
- 40
- 45

- Para su uso en el presente documento, la expresión "los restos que contienen arilo, heteroarilo y heterocíclico" se refiere tanto al anillo como al alquilo, o si se incluyen, los anillos alquenilo, tales como anillos arilo, arilalquilo y arilalquenilo. Los términos "restos" y "anillos" pueden usarse indistintamente a lo largo de toda la memoria descriptiva.
- 50

- Adecuadamente, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son independientemente hidrógeno, alquilo C<sub>1-4</sub> opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, arilalquilo C<sub>1-4</sub> opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, heteroarilalquilo C<sub>1-4</sub> opcionalmente sustituido, heterocíclico, alquilo C<sub>1-4</sub> heterocíclico, o R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> junto con el nitrógeno al que están unidos forman un anillo de 5 a 7 miembros que puede comprender opcionalmente un heteroátomo adicional seleccionado entre O/N/S.
- 55

Adecuadamente, R<sub>8</sub> es independientemente hidrógeno o alquilo C<sub>1-4</sub>. Adecuadamente, R<sub>9</sub> es hidrógeno o un alquilo C<sub>1-4</sub>;

Adecuadamente, q es 0 o un número entero que tiene un valor de 1 a 10. Adecuadamente; R<sub>10</sub> es alquilo C<sub>1-10</sub>-C(O)<sub>2</sub>R<sub>8</sub>, tal como CH<sub>2</sub>C(O)<sub>2</sub>H o CH<sub>2</sub>C(O)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>.

Adecuadamente, R<sub>11</sub> es hidrógeno, C<sub>1-4</sub> alquilo, arilo, arilalquilo C<sub>1-4</sub>, heteroarilo, heteroarilalquilo C<sub>1-4</sub>, heterocíclico, o alquilo C<sub>1-4</sub> heterocíclico.

- 5 Adecuadamente, R<sub>12</sub> es hidrógeno, alquilo C<sub>1-10</sub>, arilo opcionalmente sustituido o arilalquilo opcionalmente sustituido. Adecuadamente, R<sub>13</sub> es alquilo C<sub>1-4</sub>, arilo, arilalquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo C<sub>1-4</sub>, heterocíclico o alquilo heterocíclico C<sub>1-4</sub>, en los que todos los restos que contienen arilo, heteroarilo y heterocíclico pueden estar opcionalmente sustituidos.

- 10 Adecuadamente, Y se selecciona independientemente entre hidrógeno; halógeno; nitro; ciano; alquilo C<sub>1-10</sub> halosustituido; alquilo C<sub>1-10</sub>; alquenilo C<sub>2-10</sub>; alcoxi C<sub>1-10</sub>; alcoxi C<sub>1-10</sub> halosustituido; azida; (CR<sub>8</sub>R<sub>8</sub>)qS(O)<sub>t</sub>R<sub>a</sub>; hidroxil; hidroxialquilo C<sub>1-4</sub>; arilo; arilalquilo C<sub>1-4</sub>; ariloxi; arilalquil C<sub>1-4</sub>-oxi; heteroarilo; heteroarilalquilo; heteroaril-alquil C<sub>1-4</sub>-oxi; heterocíclico, alquilo C<sub>1-4</sub> heterocíclico; arilalquenilo C<sub>2-10</sub>; heteroarilalquenilo C<sub>2-10</sub>; alquenilo C<sub>2-10</sub> heterocíclico; (CR<sub>8</sub>R<sub>8</sub>)qNR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>; alquenil C<sub>2-10</sub>-C(O)NR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>; (CR<sub>8</sub>R<sub>8</sub>)qC(O)NR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>; (CR<sub>8</sub>R<sub>8</sub>)qC(O)NR<sub>4</sub>R<sub>10</sub>; S(O)<sub>3</sub>H; S(O)<sub>3</sub>R<sub>8</sub>; (CR<sub>8</sub>R<sub>8</sub>)qC(O)R<sub>11</sub>; alquenil C<sub>2-10</sub>-C(O)R<sub>11</sub>; alquenil C<sub>2-10</sub>-C(O)OR<sub>11</sub>; C(CR<sub>8</sub>R<sub>8</sub>)qC(O)OR<sub>12</sub>; (CR<sub>8</sub>R<sub>8</sub>)qOC(O)R<sub>11</sub>; (CR<sub>8</sub>R<sub>8</sub>)qC(NR<sub>4</sub>)NR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>; (CR<sub>8</sub>R<sub>8</sub>)qNR<sub>4</sub>C(NR<sub>5</sub>)R<sub>11</sub>; (CR<sub>8</sub>R<sub>8</sub>)qNR<sub>4</sub>C(O)R<sub>11</sub>; (CR<sub>8</sub>R<sub>8</sub>)qNHS(O)<sub>2</sub>R<sub>13</sub>; o (CR<sub>8</sub>R<sub>8</sub>)qS(O)<sub>2</sub>NR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>; o dos restos Y juntos pueden formar O-(CH<sub>2</sub>)<sub>s</sub>-O o un anillo saturado o insaturado, de 5 a 6 miembros. Todos los restos que contienen arilo, heteroarilo y heterocíclico indicados anteriormente pueden estar opcionalmente sustituidos como se define en el presente documento. Adecuadamente, s es un número entero que tiene un valor de 1 a 3.

- 20 Cuando Y forma un puente dioxi, s es preferentemente 1. Cuando Y forma un anillo insaturado adicional, es preferentemente de 6 miembros, dando como resultado un sistema de anillos naftileno. Estos sistemas de anillo pueden estar sustituidos de 1 a 3 veces con otros restos Y como se ha definido anteriormente.

Adecuadamente, R<sub>a</sub> es un alquilo, arilalquilo C<sub>1-4</sub>, heteroarilo, heteroaril-alquilo C<sub>1-4</sub>, heterocíclico o un alquilo C<sub>1-4</sub> heterocíclico, pudiendo estar todos estos restos opcionalmente sustituidos.

- 25 Y es preferentemente a halógeno, alcoxi C<sub>1-4</sub>, arilo opcionalmente sustituido, ariloxi opcionalmente sustituido o arilalcoxi, metilendioxo, NR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>, tionalquilo C<sub>1-4</sub>, tioarilo, alcoxi halosustituido, alquilo C<sub>1-4</sub> opcionalmente sustituido o hidroxialquilo. Y es más preferentemente halógeno mono-sustituido, halógeno disustituido, alcoxi mono-sustituido, alcoxi disustituido, metilendioxo, arilo o alquilo, más preferentemente estos grupos están mono o di-sustituidos en la posición 2' o en la posición 2', 3'.
- 30 Mientras Y puede estar sustituido en cualquiera de las posiciones del anillo, n es preferentemente uno. Mientras R<sub>1</sub> e Y pueden ser los dos hidrógeno, se prefiere que al menos uno de los anillos esté sustituido, preferentemente que los dos anillos están sustituidos.

- 35 Como se usa en el presente documento, "opcionalmente sustituido", a menos que se defina específicamente otra cosa, significará grupos tales como halógeno, tales como flúor, cloro, bromo o yodo; hidroxil; alquilo C<sub>1-10</sub> hidroxil-; alcoxi C<sub>1-10</sub>, tal como metoxi o etoxi; S(O)<sub>m</sub> alquilo C<sub>1-10</sub>, en el que m' es 0, 1 ó 2, tal como metililo, metilsulfonilo o metilsulfonilo; amino, amino mono y di-sustituido, tal como en el grupo NR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>; NHC(O)R<sub>4</sub>; C(O)NR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>; C(O)OH; S(O)<sub>2</sub>NR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>; NHS(O)<sub>2</sub>R<sub>20</sub>, alquilo C<sub>1-10</sub>, tal como metilo, etilo, propilo, isopropilo o t-butilo; alquilo C<sub>1-10</sub> halosustituido, tal como CF<sub>3</sub>; un arilo opcionalmente sustituido, tal como fenilo, o un arilalquilo opcionalmente sustituido, tal como bencilo o fenetilo, heterocíclico opcionalmente sustituido, alquilo heterocíclico opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, heteroarilalquilo opcionalmente sustituido, en los que estos restos arilo, heteroarilo o heterocíclico pueden estar sustituidos de una a dos veces con halógeno; hidroxil; alquilo hidroxil-sustituido; alcoxi C<sub>1-10</sub>; S(O)<sub>m</sub> alquilo C<sub>1-10</sub>; amino, alquilamino mono y di-sustituido, tal como en el grupo NR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>; alquilo C<sub>1-10</sub> o alquilo C<sub>1-10</sub> halosustituido, tal como CF<sub>3</sub>.

- 45 R<sub>20</sub> es adecuadamente alquilo C<sub>1-4</sub>, arilo, arilalquilo C<sub>1-4</sub>, heteroarilo, heteroarilalquilo C<sub>1-4</sub>, heterocíclico o alquilo C<sub>1-4</sub> heterocíclico.

- 50 Las sales farmacéuticamente aceptables adecuadas son bien conocidas por los expertos en la materia e incluyen sales básicas de ácidos inorgánicos y orgánicos, tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, metano ácido sulfónico, ácido etanosulfónico, ácido acético, ácido málico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido láctico, ácido oxálico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido benzoico, ácido salicílico, ácido fenilacético y ácido mandélico. Además, también pueden formarse sales farmacéuticamente aceptables de compuestos de Fórmula (I) con un catión farmacéuticamente aceptable. Los cationes farmacéuticamente aceptables adecuados son bien conocidos por los expertos en la materia e incluyen cationes alcalinos, alcalinotérreos, de amonio y de amonio cuaternario.

Los siguientes términos, como se usan en el presente documento, se refieren a:

- 55
- "halo" - todos halógenos, que son cloro, flúor, bromo y yodo.
  - "alquilo C<sub>1-10</sub>" o "alquilo" - ambos restos de cadena lineal y ramificada de 1 a 10 átomos de carbono, a menos que

la longitud de la cadena se limite de otra forma, incluyendo, pero sin limitación, metilo, etilo, *n*-propilo, *iso*-propilo, *n*-butilo, *sec*-butilo, *iso*-butilo, *terc*-butilo, *n*-pentilo y similares.

- 5 • "cicloalquilo" se usa en el presente documento para indicar un resto cíclico, preferentemente de 3 a 8 carbonos, incluyendo, pero sin limitación, ciclopropilo, ciclopentilo, ciclohexilo y similares.
- "alquenilo" se usa en el presente documento cada vez que aparece para indicar un resto de cadena lineal o ramificada de 2-10 átomos de carbono, a menos que la longitud de la cadena se limite de otra forma, incluyendo, pero sin limitación etenilo, 1-propenilo, 2-propenilo, 2-metil-1-propenilo, 1-butenilo, 2-butenilo y similares.
- 10 • "arilo" - fenilo y naftilo;
- "heteroarilo" (por sí mismo o en cualquier combinación, tal como "heteroariloxi" o "heteroarilalquilo") - un sistema de anillos aromático de 5-10 miembros en el que uno o más anillos contienen uno o más heteroátomos seleccionados entre el grupo que consiste en N, O o S, tal como, pero sin limitación, pirrol, pirazol, furano, tiofeno, quinolina, isoquinolina, quinazolinilo, piridina, pirimidina, oxazol, tetrazol, tiazol, tiadiazol, triazol, imidazol o benzoimidazol.
- 15 • "heterocíclico" (por sí mismo o en cualquier combinación, tal como "alquilo heterocíclico") - un sistema de anillos saturado o parcialmente saturado, de 4-10 miembros, en el que uno o más anillos contienen uno o más heteroátomos seleccionados entre el grupo que consiste en N, O, o S; tal como, pero sin limitación, pirrolidina, piperidina, piperazina, morfolina, tetrahidropirano, tiomorfolina o imidazolidina. Además, el azufre puede estar opcionalmente oxidado en la sulfona o el sulfóxido.
- 20 • "arilalquilo" o "heteroarilalquilo" o "alquilo heterocíclico" se usa en el presente documento para indicar alquilo C<sub>1-10</sub>, como se ha definido anteriormente, unido a un resto arilo, heteroarilo o heterocíclico, como también se define en el presente documento, a menos que se indique otra cosa.
- "sulfonilo" - el óxido S(O) del sulfuro correspondiente, el término "tio" se refiere al sulfuro, y el término "sulfonilo" se refiere al resto S(O)<sub>2</sub> completamente oxidado.
- 25 • "en el que dos restos R<sub>1</sub> (o dos restos Y) pueden formar juntos un anillo saturado o insaturado de 5 ó 6 miembros" se usa en el presente documento para indicar la formación de un sistema de anillos aromático, tal como naftaleno, o es un resto fenilo que tiene unido un anillo parcialmente saturado o insaturado, de 6 miembros, tal como un cicloalquenilo C<sub>6</sub>, es decir, hexeno, o un resto cicloalquenilo C<sub>5</sub>, tal como ciclopenteno.

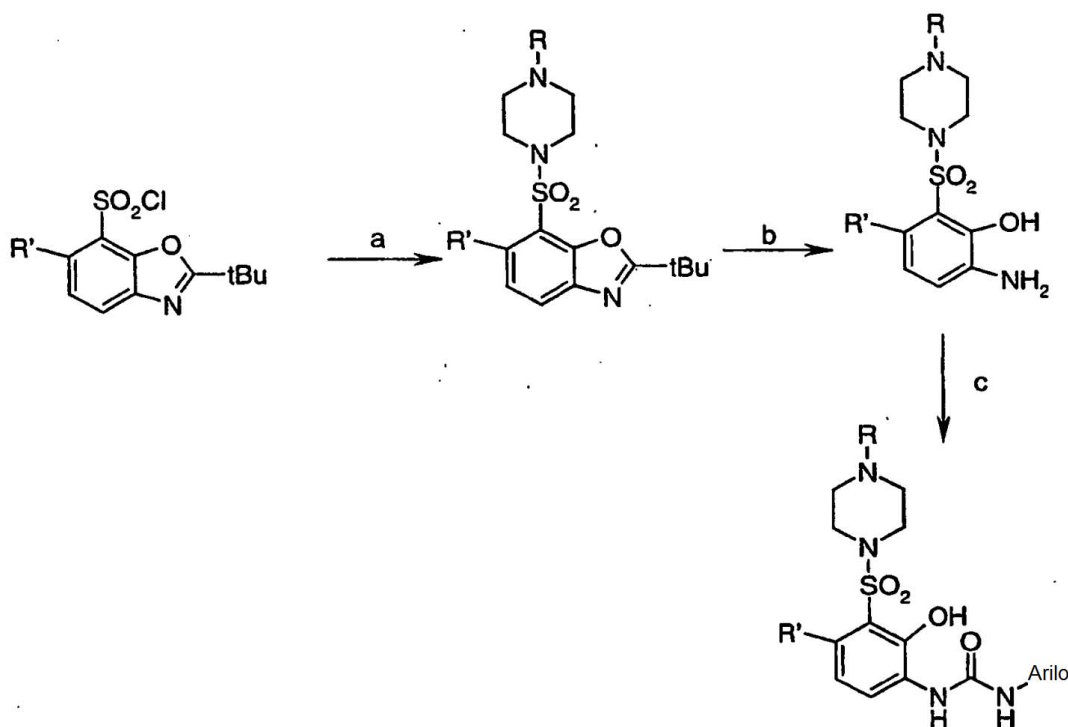
Los compuestos ilustrativos de Fórmula (I) incluyen:


- 30 N-[4-cloro-2-hidroxi-3-(4-metil-piperazin-1-sulfonil)-fenil]-N'-(2-cloro-3-fluorofenil)urea;
- N-[4-cloro-2-hidroxi-3-(4-(2-hidroxi-etil)-piperazin-1-sulfonil)fenil]-N'-(2-cloro-3-fluorofenil)urea;
- N-[4-cloro-2-hidroxi-3-(1-piperazinisulfonil)fenil]-N'-(2-cloro-3-fluorofenil)urea o una sal farmacéuticamente aceptable de las mismas.

Los compuestos mencionados anteriormente tienen características de desarrollabilidad mejorada con respecto a sus contrapartes más íntimamente relacionadas que se han reivindicado previamente. Además, la potencia hacia la diana terapéutica se ha mantenido o mejorado.

### **Procedimientos de preparación**

Los compuestos de Fórmula (I) pueden obtenerse aplicando procedimientos sintéticos, algunos de los cuales se ilustran en el siguiente Esquema 1. La síntesis proporcionada en estos Esquemas es aplicable para la producción de compuestos de Fórmula (I) que tienen una diversidad de grupos R, R' y Arilo diferentes (opcionalmente sustituidos) que se hacen reaccionar, empleando sustituyentes opcionales que están adecuadamente protegidos, para conseguir compatibilidad con las reacciones resumidas en el presente documento. La desprotección posterior, en esos casos, proporciona después compuestos de la naturaleza desvelada de forma general. Cuando se ha establecido el núcleo de urea, compuestos adicionales de estas fórmulas pueden prepararse aplicando técnicas convencionales para la interconversión de grupos funcionales, bien conocidas en la técnica.

**Esquema 1**

- a) , Et<sub>3</sub>N b) i) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>O, ii) NaOH, (Boc)<sub>2</sub>O (si R = Boc únicamente)  
 c) i) *sec*-BuLi, TMEDA ii) Cl<sub>3</sub>CCl<sub>3</sub> d) i) cloruro de oxalilo, ii) azida sódica  
 c) Aril- CON<sub>3</sub>

**Ejemplo 1****1a) ácido 2-cloro-3-fluorobenzoico**

5 Una solución de ácido 3-fluorobenzoico (4,02 g, 28,71 mmol) en 20 ml de THF se añadió gota a gota a una suspensión de TMEDA (10,00 ml, 66,3 mmol) y *sec*-BuLi 1,3 M (48 ml, 62,4 mmol) en 50 ml de THF a -90 °C. La mezcla se agitó a -90 °C durante 35 min. La mezcla se calentó a -78 °C, momento en el que se añadió una solución de hexacloroetano (27,0 g, 113,9 mmol) en 50 ml de THF. Después de 20 h, la reacción se interrumpió con agua y se diluyó con éter dietílico. La bifase se ajustó a pH ~1-2 con HCl conc. La fase orgánica se lavó con agua y salmuera, se secó y se concentró, dando 30,4 g en bruto en forma de un sólido de color castaño, que se lavó con hexano, dando 3,728 g (74%) del producto deseado **1a** (sólido de color castaño claro). EM (m/z) 175,2 (M+H).

**1b) 3-cloro-2-fluoro-benzoil azida**

Una suspensión de ácido 2-cloro-3-fluorobenzoico (ejemplo 1a) (2,704 g, 15,54 mmol) en 25 ml de cloruro de oxalilo se calentó a reflujo durante 2 h. La solución se enfrió y se concentró para dar el cloruro de ácido en bruto, 3,13 g en forma de un líquido de color pardo que se usó directamente en la siguiente etapa.

15 Una solución de NaN<sub>3</sub> (2,79 g, 43 mmol) en 10 ml de agua se añadió gota a gota a una solución del cloruro de ácido en bruto (3,13 g) en 20 ml de acetona a 0 °C. Después de 15 min, la solución se diluyó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se lavó con agua y salmuera. La fase orgánica se secó y se concentró, dando un líquido de color pardo que se filtró a través de gel de sílice usando acetato de etilo/hexano (5/95, v/v), produciendo 2,97 g (96%) de **1b** (líquido incoloro). El compuesto se usó sin purificación adicional.

**20 1c) Éster terc-butílico del ácido 2-(2-terc-butil-6-cloro-benzooxazol-7-sulfonil)-piperazin-1-carboxílico**

25 La solución de cloruro de 2-terc-butil-6-cloro-benzooxazol-7-sulfonilo (10,75 g, 34,9 mmol) en 100 ml de THF se enfrió a 0 °C y se añadieron Et<sub>3</sub>N (3,47 ml, 24,9 mmol) y después Boc-piperazina (5,0 g, 26,8 mmol). La mezcla resultante se agitó durante 20 h, calentando a temperatura ambiente. La mezcla se vertió en agua, se extrajo con EtOAc y se lavó con otra porción de agua; las fases orgánicas se secaron y se concentraron. La purificación por cromatografía en columna sobre gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo/hexano (30/70, v/v), produjo 11,12 g (91%) del producto deseado **1c**. CL-EM (m/z) 458,2 (M+H).

1d) Éster terc-butílico del ácido 4-(3-amino-6-cloro-2-hidroxi-bencenosulfonil-piperazin-1-carboxílico).

La solución del material de partida **1c** (11,12 g) en dioxano (20 ml) se trató con agua (11 ml) y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> conc. (11 ml). La mezcla se calentó a reflujo durante 12 h. La mezcla de reacción se concentró y después el residuo se basificó a pH ~14 con NaOH ac. al 50%. Se añadieron (Boc)<sub>2</sub>O (5,6 g, 1,05 equiv.) y 100 ml de EtOAc y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. La mezcla se separó, la fase de agua se extrajo con EtOAc y las fases orgánicas se combinaron, se secaron y se concentraron. La purificación por cromatografía en columna sobre gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo/hexano (30/70, v/v), produjo 8,18 g (85%) del producto deseado 1d. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): δ 6,85 (m, 2H), 3,48 (t, 4H), 3,25 (t, 4H), 1,47 (s, 9H).

10) 1e) Éster terc-butílico del ácido 4-(6-cloro-3-[3-(2-cloro-3-fluorofenil)-ureido]-2-hidroxi-bencenosulfonil-piperazin-1-carboxílico

Una solución de **1d** (3,8 g, 9,7 mmol) y 3-cloro-2-fluorobenzoi azida (**1b**) (2,9 g, 14,5 mmol) en 5 ml de N,N-dimetilformamida se agitó a temperatura ambiente durante 18 h. La mezcla se diluyó con acetato de etilo y se lavó con agua, dando el material en bruto. La purificación por cromatografía en columna sobre gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo/hexano (20/80, v/v), dio 3,6 g (66%) de 1e. CL-EM (m/z) 562,8 (M+H).

15) 1f) Clorhidrato de 1-(2-cloro-3-fluorofenil)-3-[4-cloro-2-hidroxi-3-(piperazin-1-sulfonil)-fenil]-urea (también denominada en el presente documento N-[4-cloro-2-hidroxi-3-(1-piperazinilsulfonil)fenil]-N'-(2-cloro-3-fluorofenil)urea)

Una solución de 3,6 g del producto Boc en 20 ml de HCl 4 N en dioxano se agitó a temperatura ambiente durante 2 h y el disolvente se evaporó. El residuo se recristalizó en metanol y acetato de etilo, dando el producto del título 2,9 g, (60%). CL-EM (m/z) 463,0 (M+H).

20) Ejemplo de referencia 2

2a) terc-Butil-6-cloro-7-(4-(2-metoxietil)-piperazin-1-sulfonil)-benzooxazol

Siguiendo el procedimiento general descrito en el Ejemplo 1c, se acopló cloruro de 2-terc-butil-6-cloro-benzooxazol-7-sulfonilo con 2-metoxi-etil-piperazina, dando el producto deseado **2a**, 1,11 g (82%). CL-EM (m/z) 416,2 (M+H).

2b) 6-Amino-3-cloro-2-[4-(2-metoxietil)-piperazin-1-sulfonil]-fenol

25) Siguiendo el procedimiento general descrito en el Ejemplo 1d, se hidrolizó terc-butil-6-cloro-7-(4-(2-metoxi-etil)-piperazin-1-sulfonil)-benzooxazol, dando **2b** en bruto, que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

2c) 1-(2-Cloro-3-fluoro-fenil)-3-[4-cloro-2-hidroxi-3-[4-(2-metoxietil)-piperazin-1-sulfonil]-fenil]-urea

30) Siguiendo el procedimiento general descrito en el Ejemplo 1e, se acoplaron 6-amino-3-cloro-2-[4-(2-metoxi-etil)-piperazin-1-sulfonil]-fenol y 3-cloro-2-fluorobenzoi azida, dando 168 mg (20% de **2a**) del producto **2c** (aislado en forma de la sal del ácido trifluoroacético seguido de purificación por RP-HPLC). CL-EM (m/z) 521,2 (M+H).

2d) 1-(2-Cloro-3-fluorofenil)-3-[4-cloro-2-hidroxi-3-[4-(2-hidroxi-etil)-piperazin-1-sulfonil]-fenil]-urea

35) En una atmósfera de Ar, a la suspensión de la sal del ácido trifluoroacético **2c** (100 mg, 0,16 mmol) en 3 ml de diclorometano se le añadió tribromuro de boro (0,63 ml, 0,63 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una noche. Después de inactivar con metanol, se produjo un sólido. La mezcla se filtró y se recogió un sólido. La purificación por HPLC Gilson, eluyendo con acetonitrilo/agua/TFA al 0,1% (10/90, v/v a 90/10, v/v, durante 10 min), produciendo 66 mg (76%) del compuesto del título **2d**. CL-EM (m/z) 507,2 (M+H).

Ejemplo de referencia 3

3a) 2-terc-Butil-6-cloro-7-(4-metilpiperazin-1-sulfonil)-benzooxazol

40) Siguiendo el procedimiento general descrito en el Ejemplo 1c, se acopló cloruro de 2-terc-butil-6-cloro-benzooxazol-7-sulfonilo con metil-piperazina, dando el producto deseado **3a**, 600 mg (53%). CL-EM (m/z) 372,0 (M+H).

3b) 6-Amino-3-cloro-2-(4-metilpiperazin-1-sulfonil)-fenol

Siguiendo el procedimiento general descrito en el Ejemplo 1d, se hidrolizó 2-terc-Butil-6-cloro-7-(4-metil-piperazin-1-sulfonil)-benzooxazol, dando **3b**, 441 mg (89%). CL-EM (m/z) 306,2 (M+H).

3c) 1-(2-Cloro-3-fluorofenil)-3-[4-cloro-2-hidroxi-3-(4-metilpiperazin-1-sulfonil)-fenil]-urea

45) Siguiendo el procedimiento general descrito en el Ejemplo 1e, se acoplaron 6-amino-3-cloro-2-(4-metil-piperazin-1-sulfonil)-fenol y 3-cloro-2-fluoro-benzoi azida (**1b**), dando 203 mg (30%) del producto del título **3c**. CL-EM (m/z) 477,0 (M+H).



**Procedimiento de tratamiento**

Los compuestos de Fórmula (I), incluyendo N-[4-cloro-2-hidroxi-3-(1-piperazinilsulfonil)fenil]-N'-(2-cloro-3-fluorofenil)urea o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma pueden usarse en la fabricación de una medicina para el tratamiento profiláctico o terapéutico de cualquier enfermedad en un ser humano u otro mamífero, que está exacerbada o causada por una producción excesiva o desregulada de citocina IL-8 por tales células del mamífero, tales como pero sin limitación monocitos y/o macrófagos u otras quimiocinas que se unen al receptor de IL-8 $\alpha$  o  $\beta$ , también denominado el receptor de tipo I o tipo II.

En consecuencia, la presente invención proporciona un compuesto de Fórmula (I), en particular un compuesto que es N-[4-cloro-2-hidroxi-3-(1-piperazinilsulfonil)fenil]-N'-(2-cloro-3-fluorofenil)urea o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para el tratamiento de una enfermedad mediada por quimiocinas, en la que la quimiocina es una que se une a un receptor de IL-8  $\alpha$  o  $\beta$ . En particular, las quimiocinas son IL-8, GRO $\alpha$ , GRO $\beta$ , GRO $\gamma$ , NAP-2 o ENA-78.

Los compuestos de Fórmula (I), incluyendo N-[4-cloro-2-hidroxi-3-(1-piperazinilsulfonil)fenil]-N'-(2-cloro-3-fluorofenil)urea, se administran en una cantidad suficiente para inhibir la función de citocinas, en particular IL-8, GRO $\alpha$ , GRO $\beta$ , GRO $\gamma$ , NAP-2 o ENA-78, de modo que estén regulados biológicamente de forma negativa a niveles normales de función fisiológica o en algunos casos a niveles por debajo de lo normal, para aliviar la patología. Los niveles anómalos de IL-8, GRO $\alpha$ , GRO $\beta$ , GRO $\gamma$ , NAP-2 o ENA-78 por ejemplo en el contexto de la presente invención, constituyen: (i) niveles de IL-8 libre mayores o iguales a 1 picogramo por ml; (ii) cualquier IL-8, GRO $\alpha$ , GRO $\beta$ , GRO $\gamma$ , NAP-2 o ENA-78 asociada a células por encima de los niveles fisiológicos normales; o (iii) la presencia de IL-8, GRO $\alpha$ , GRO $\beta$ , GRO $\gamma$ , NAP-2 o ENA-78 por encima de niveles basales en células o tejidos en los que se produce IL-8, GRO $\alpha$ , GRO $\beta$ , GRO $\gamma$ , NAP-2 o ENA-78 respectivamente.

Se ha mostrado que los compuestos de Fórmula (I), generalmente, tienen un  $t_{1/2}$  más largo y una biodisponibilidad oral por encima de los compuestos desvelados en el documento WO 96/251157 y el documento WO 97/29743 cuyas divulgaciones se incorporan en el presente documento por referencia.

Existen muchas patologías en las que la producción de IL-8 desregulada o excesiva está implicada en exacerbar y/o causar la enfermedad. Las enfermedades mediadas por quimiocinas incluyen psoriasis, dermatitis atópica, artritis (osteo o reumatoide), asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, síndrome de distrés respiratorio adulto, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, apoplejía, choque séptico, choque endotóxico, sepsis gram negativa, síndrome de choque tóxico, lesión por reperfusión cardíaca y renal, glomerulonefritis, trombosis, reacción de injerto contra huésped, enfermedad de Alzheimer, rechazos de alotransplantes, malaria, reestenosis, angiogénesis, aterosclerosis, osteoporosis, gingivitis, enfermedades virales tales como rinovirus o liberación de células madre hematopoyéticas no deseadas.

Estas enfermedades están caracterizadas principalmente por infiltración de neutrófilos masiva, infiltración de linfocitos T o crecimiento neovascular y están asociadas con aumento de la producción de IL-8, GRO $\alpha$ , GRO $\beta$ , GRO $\gamma$ , NAP-2 o ENA-78 que es responsable de la quimiotaxis de neutrófilos al sitio inflamatorio o el crecimiento direccional de las células endoteliales. A diferencia de otras citocinas inflamatorias (IL-1, TNF e IL-6), IL-8, GRO $\alpha$ , GRO $\beta$ , GRO $\gamma$ , NAP-2 o ENA-78 tienen la propiedad única de promover la quimiotaxis de neutrófilos, liberación de enzimas incluyendo pero sin limitación liberación de elastasa así como producción y activación de superóxidos. Las  $\alpha$ -quimiocinas pero particularmente GRO $\alpha$ , GRO $\beta$ , GRO $\gamma$ , NAP-2 o ENA-78, funcionando a través del receptor de IL-8 tipo I o tipo II pueden promover la neovascularización de tumores promoviendo el crecimiento direccional de células endoteliales. Por lo tanto, la inhibición de quimiotaxis o activación inducida por IL-8 conduciría a una reducción directa en la infiltración de neutrófilos.

Las pruebas recientes también implican el papel de las quimiocinas en el tratamiento de infecciones por VIH Littleman y col., Nature 381, pág. 661 (1996) y Koup y col., Nature 381, pág. 667 (1996).

Las pruebas presentes también indican el uso de inhibidores de IL-8 en el tratamiento de aterosclerosis. La primera referencia, Boisvert y col., J. Clin. Invest, 1998, 101: 353-363 muestra, a través del trasplante de médula ósea, que la ausencia de receptores de IL-8 en células madre (y, por lo tanto, en monocitos/macrófagos) conduce a una reducción en el desarrollo de placas ateroscleróticas en ratones deficientes en receptor de LDL. Son referencias de apoyo adicionales: Apostolopoulos, y col., Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 1996, 16:1007-1012; Liu, y col., Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol, 1997, 17:317-323; Rus, y col., Atherosclerosis. 1996, 127:263-271.; Wang y col., J. Biol. Chem. 1996, 271:8837-8842; Yue, y col., Eur. J. Pharmacol. 1993, 240:81-84; Koch, y col., Am. J. Pathol., 1993, 142:1423-1431.; Lee, y col., Immunol. Lett., 1996, 53, 109-113.; y Terkeltaub y col., Arterioscler. Thromb., 1994, 14:47-53.

La presente invención también proporciona un medio para tratar, en una situación aguda, así como prevenir, en los individuos considerados susceptibles a lesiones de SNC por los compuestos antagonistas del receptor de quimiocinas de Fórmula (I), en particular un compuesto que es N-[4-cloro-2-hidroxi-3-(1-piperazinilsulfonil)fenil]-N'-(2-cloro-3-fluorofenil)urea o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

Las lesiones de SNC como se definen en el presente documento incluyen traumatismos craneales tanto abiertos como penetrantes, tales como por cirugía o una lesión de traumatismo craneal cerrada, tal como por una lesión en la región craneal. También se incluyen dentro de esta definición apoplejía isquémica, particularmente en el área del cerebro.

5 La apoplejía isquémica puede definirse como un trastorno neurológico focal que resulta de un aporte de sangre insuficiente a un área del cerebro particular, habitualmente como una consecuencia de un émbolo, trombo o cierre ateromatoso local del vaso sanguíneo. El papel de las citocinas inflamatorias en esta área ha estado emergiendo y la presente invención proporciona un medio para el tratamiento potencial de estas lesiones. Ha estado disponible relativamente poco tratamiento, para una lesión aguda tal como estas.

10 TNF- $\alpha$  es una citocina con actividades proinflamatorias, incluyendo expresión de moléculas de adhesión de leucocitos endoteliales. Los leucocitos se infiltran en lesiones cerebrales isquémicas y de este modo los compuestos que inhiben o reducen los niveles de TNF serían útiles para el tratamiento de lesión cerebral isquémica. Véase Liu y col., Stroke, Vol. 25., Nº. 7, pág. 1481-88 (1994) cuya divulgación se incorpora en el presente documento por referencia.

15 Se analizan modelos de lesiones craneales cerradas y tratamiento con agentes mezclados 5-LO/CO en Shohami y col., J. of Vasc & Clinical Physiology and Pharmacology, Vol. 3, Nº. 2, pág. 99-107 (1992) cuya divulgación se incorpora en el presente documento por referencia. Se descubrió que el tratamiento que reducía la formación de edema mejoraba el resultado funcional en los animales tratados.

20 Los compuestos de Fórmula (I) se administran en una cantidad suficiente para inhibir que IL-8, que se une a los receptores de IL-8 alfa o beta, se una a estos receptores, tal como se muestra por una reducción en la quimiotaxis y activación de neutrófilos. El descubrimiento de que los compuestos de Fórmula (I) son inhibidores de unión de IL-8 se basa en los efectos de los compuestos de Fórmula (I) en los ensayos de unión a receptor *in vitro* que se describen en el presente documento. Se ha mostrado que los compuestos de Fórmula (I) son inhibidores de receptores de IL-8 de tipo II.

25 Como se usa en el presente documento, la expresión “enfermedad o patología mediada por IL-8” se refiere a todas y cada una de las patologías en las que IL-8, GRO $\alpha$ , GRO $\beta$ , GRO $\gamma$ , NAP-2 o ENA-78 desempeñan un papel, por producción de IL-8, GRO $\alpha$ , GRO $\beta$ , GRO $\gamma$ , NAP-2 o ENA-78 en sí mismos o provocando IL-8, GRO $\alpha$ , GRO $\beta$ , GRO $\gamma$ , NAP-2 o ENA-78 que se liberen otra monocina, tal como pero sin limitación IL-1, IL-6 o TNF. Una patología en la que, por ejemplo, IL-1 es un componente principal y cuya producción o acción, se exagera o secreta en respuesta a IL-8, se consideraría por lo tanto una patología mediada por IL-8.

30 Como se usa en el presente documento, la expresión “enfermedad o patología mediada por quimiocina” se refiere a todas y cada una de las patologías en las que una quimiocina que se une a un receptor de IL-8  $\alpha$  o  $\beta$  desempeña un papel, tales como pero sin limitación IL-8, GRO- $\alpha$ , GRO- $\beta$ , GRO $\gamma$ , NAP-2 o ENA-78. Esto incluiría una patología en la que IL-8 desempeñe un papel, por producción de IL-8 en sí misma o provocando IL-8 que se libere otra monocina, tal como pero sin limitación IL-1, IL-6 o TNF. Una patología en la que, por ejemplo, IL-1 es un componente principal y cuya producción o acción, se exagera o secreta en respuesta a IL-8, se consideraría por lo tanto una patología mediada por IL-8.

35 Como se usa en el presente documento el término “citocina” se refiere a cualquier polipéptido secretado que afecte a las funciones de las células y es una molécula que modula las interacciones entre células en la respuesta inmune, inflamatoria o hematopoyética. Una citocina incluye, pero sin limitación, monocinas y linfocinas, independientemente de qué células las produzcan. Por ejemplo, generalmente se indica que una monocina se produce y secreta por una célula mononuclear, tal como un macrófago y/o monocito. Muchas otras células sin embargo también producen monocinas, tales como células citolíticas, fibroblastos, basófilos, neutrófilos, células endoteliales, astrocitos cerebrales, células del estroma de médula ósea, queratinocitos epidérmicos y linfocitos B. Generalmente se indica que las linfocinas se producen por células linfocíticas. Los ejemplos de citocinas incluyen, pero sin limitación, Interleucina-1 (IL-1), Interleucina-6 (IL-6), Interleucina-8 (IL-8), Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y Factor de Necrosis Tumoral beta (TNF- $\beta$ ).

40 Como se usa en el presente documento el término “quimiocina” se refiere a cualquier polipéptido secretado que afecte a las funciones de células y es una molécula que modula las interacciones entre células en la respuesta inmune, inflamatoria o hematopoyética, de forma similar al término “citocina” anteriormente. Una quimiocina se secreta principalmente a través de transmembranas celulares y provoca la quimiotaxis y activación de glóbulos blancos específicos y leucocitos, neutrófilos, monocitos, macrófagos, linfocitos T, linfocitos B, células endoteliales y células de músculo liso. Los ejemplos de quimiocinas incluyen, pero sin limitación IL-8, GRO- $\alpha$ , GRO- $\beta$ , GRO- $\gamma$ , NAP-2, ENA-78, IP-10, MIP-1 $\alpha$ , MIP- $\beta$ , PF4 y MCP 1, 2 y 3.

45 Para usar un compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en terapia, normalmente se formulará en una composición farmacéutica de acuerdo con la práctica farmacéutica convencional. Esta invención, por lo tanto, también se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz, no tóxica de un compuesto de Fórmula (I), en particular un compuesto que es N-[4-cloro-2-hidroxi-3-(1-

piperazinilsulfonil]fenil]-N'-(2-cloro-3-fluorofenil)urea o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

- Los compuestos de Fórmula (I), sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y composiciones farmacéuticas que los incorporan pueden administrarse convenientemente por cualquiera de las rutas habitualmente usadas para administración de fármacos, por ejemplo, por vía oral, vía tópica, vía parenteral o por inhalación. Los compuestos de Fórmula (I) pueden administrarse en formas farmacéuticas convencionales preparadas por combinación de un compuesto de Fórmula (I) con vehículos farmacéuticos convencionales de acuerdo con procedimientos convencionales. Los compuestos de Fórmula (I) también pueden administrarse en dosificaciones convencionales en combinación con un segundo compuesto terapéuticamente activo conocido. Estos procedimientos pueden implicar mezclar, granular y comprimir o disolver los ingredientes según sea apropiado para la preparación deseada. Se apreciará que la forma y carácter del carácter o diluyente farmacéuticamente aceptable se dicta por la cantidad de principio activo con la que se combina, la vía de administración y otras variables bien conocidas. El vehículo o vehículos debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación y no perjudicial al receptor del mismo.
- El vehículo farmacéutico empleado puede ser, por ejemplo, un sólido o líquido. Son ejemplos de vehículos sólidos lactosa, terra alba, sacarosa, talco, gelatina, agar, pectina, goma arábiga, estearato de magnesio, ácido esteárico y similares. Son ejemplos de vehículos líquidos jarabe, aceite de cacahuete, aceite de oliva, agua y similares. De forma similar el vehículo o diluyente puede incluir material de retardo temporal bien conocido en la técnica, tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo solo o con una cera.
- Puede emplearse una amplia diversidad de formas farmacéuticas. Por lo tanto, si se usa un vehículo sólido la preparación puede comprimirse, colocarse en una cápsula de gelatina dura en forma de gránulo o polvo o en forma de un trocisco o pastilla. La cantidad de vehículo sólido variará ampliamente pero preferentemente será de aproximadamente 25 mg a aproximadamente 1 g. Cuando se usa un vehículo líquido, la preparación estará en forma de un jarabe, emulsión, cápsula de gelatina blanda, líquido inyectable estéril tal como una ampolla o suspensión líquida no acuosa.
- Los compuestos de Fórmula (I) pueden administrarse por vía tópica, es decir por administración no sistémica. Esto incluye la aplicación de un compuesto de Fórmula (I) externo a la epidermis o la cavidad bucal y la instilación de un compuesto tal en el oído, ojo y nariz, de modo que el compuesto no entre significativamente en el torrente sanguíneo. Por el contrario, la administración sistémica se refiere a administración oral, intravenosa, intraperitoneal e intramuscular.
- Las formulaciones adecuadas para administración tópica incluyen preparaciones líquidas o semilíquidas adecuadas para penetración a través de la piel al sitio de inflamación tales como linimentos, lociones, cremas, pomadas o pastas y gotas adecuadas para la administración al ojo, oído o nariz. El principio activo puede comprender, para administración tópica, de 0,001 % a 10 % p/p, por ejemplo de 1 % a 2 % de la Formulación.
- Puede comprender sin embargo hasta 10 % p/p pero preferentemente comprenderá menos de 5 % p/p, más preferentemente de 0,1 % a 1 % p/p de la Formulación.
- Las lociones de acuerdo con la presente invención incluyen las adecuadas para la aplicación a la piel o al ojo. Una loción ocular puede comprender una solución acuosa estéril que contiene opcionalmente un bactericida y puede prepararse por procedimientos similares a los de la preparación de gotas. Las lociones o linimentos para aplicación a la piel pueden incluir un agente para acelerar el secado y para enfriar la piel, tales como un alcohol o acetona y/o un hidratante tal como glicerol o un aceite tal como aceite de ricino o aceite de cacahuete.
- Las cremas, pomadas o pastas de acuerdo con la presente invención son formulaciones semisólidas del principio activo para aplicación externa. Pueden prepararse mezclando el principio activo en forma de polvo o finamente dividida, solo o en solución o en suspensión en un fluido acuoso o no acuoso con la ayuda de maquinaria adecuada, con una base grasa o no grasa. La base puede comprender hidrocarburos tales como parafina dura, blanda o líquida, glicerol, cera de abeja, un jabón metálico; un mucílago; un aceite de origen natural tal como aceite de almendra, maíz, cacahuete, ricino u oliva; lanolina o sus derivados o un ácido graso tal como ácido estérico u oleico junto con un alcohol tal como propilenglicol o un macrogel. La formulación puede incorporar cualquier agente tensioactivo adecuado tales como un tensioactivo aniónico, catiónico o no iónico tal como éster de sorbitán o un derivado de polioxietileno del mismo. Los agentes de suspensión tales como gomas naturales, derivados de celulosa o materiales inorgánicos tales como sílices silíceos y otros ingredientes tales como lanolina también pueden incluirse.
- Las gotas de acuerdo con la presente invención pueden comprender soluciones o suspensiones acuosas u oleosas estériles y pueden prepararse disolviendo el principio activo en una solución acuosa adecuada de un agente bactericida y/o fungicida y/o cualquier otro conservante adecuado y preferentemente incluyendo un agente tensioactivo. La solución resultante puede clarificarse después por filtración, transferirse a un depósito adecuado, que se sella después y se esteriliza por autoclave o se mantiene a 98-100 °C durante media hora. Como alternativa, la solución puede esterilizarse por filtración y transferirse al depósito por una técnica aséptica. Los ejemplos de

agentes bactericidas y fungicidas adecuados para inclusión en las gotas son nitrato o acetato fenilmercúrico (0,002 %), cloruro de benzalconio (0,01 %) y acetato de clorhexidina (0,01 %). Los disolventes adecuados para la preparación de una solución oleosa incluyen glicerol, alcohol diluido y propilenglicol.

5 Los compuestos de fórmula (I) pueden administrarse por vía parenteral, es decir por administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, intranasal, intrarrectal, intravaginal o intraperitoneal. Generalmente se prefieren las formas subcutánea e intramuscular de administración parenteral. Las formas farmacéuticas apropiadas para dicha administración pueden prepararse por técnicas convencionales. Los compuestos de Fórmula (I) también pueden administrarse por inhalación, es decir por administración intranasal o inhalación oral. Las formas farmacéuticas apropiadas para dicha administración, tales como una formulación de aerosol o un inhalador de dosis medida  
10 pueden prepararse por técnicas convencionales.

Para todos los procedimientos de uso desvelados en el presente documento para los compuestos de Fórmula (I) el régimen de dosificación oral diario preferentemente será de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 80 mg/kg del peso corporal total. El régimen de dosificación parenteral diario de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 80 mg/kg del peso corporal total. El régimen de dosificación tópica diario será preferentemente de  
15 0,1 mg a 150 mg, administrado de 1 a 4, preferentemente de 2 a 3 veces diarias. El régimen de dosificación de inhalación diario preferentemente será de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg por día. También se reconocerá por un experto en la materia que la cantidad óptima y la separación de dosificaciones individuales de un compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se determinará por la naturaleza y alcance de la afección que se trata, la forma, vía y sitio de administración y el paciente particular que  
20 se trata y que tales óptimos pueden determinarse por técnicas convencionales. También se apreciará por un experto en la materia que el ciclo óptimo de tratamiento, es decir, el número de dosis de un compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo proporcionado por día para un número definido de días, puede determinarse por los expertos en la materia usando ensayos de determinación de ciclo de tratamiento convencionales.

25 La invención se describirá ahora por referencia a los siguientes ejemplos biológicos, que son meramente ilustrativos y no deben interpretarse como una limitación del alcance de la presente invención.

### Ejemplos biológicos

Los efectos inhibidores de quimiocinas IL-8 y GRO- $\alpha$  de los compuestos de la presente invención se determinan por el siguiente ensayo *in vitro*:

#### 30 **Ensayos de Unión a Receptor:**

[<sup>125</sup>I] IL-8 (recombinante humana) se obtiene de Amersham Corp., Arlington Heights, IL, con actividad específica 2000 Ci/mmol. GRO- $\alpha$  se obtiene de NEN- New England Nuclear. Todos los demás agentes químicos son de uso analítico. Se expresaron individualmente altos niveles de receptores de IL-8 tipo  $\alpha$  y  $\beta$  recombinantes humanos en células de ovario de hámster chino como se ha descrito previamente (Holmes, y col., Science, 1991, 253, 1278). Las membranas de ovario de hámster chino se homogeneizaron de acuerdo con un protocolo anteriormente descrito (Haour, y col., J. Biol. Chem., 249 pág 2195-2205 (1974)). Excepto que el tampón de homogenización se cambia a Tris-HCL 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 1 mM, EDTA 0,5 mM (ácido etilen-diaminotetra-acético), PMSF (fluoruro de  $\alpha$ -toluenosulfonilo) 1 mM, Leupeptina 0,5 mg/l, pH 7,5. La concentración de proteína de membrana se determina usando el kit de microensayo de Pierce Co. usando albúmina de suero bobino como un patrón. Todos los ensayos se realizan en un formato de microplaca de 96 pocillos. Cada mezcla de reacción contiene <sup>125</sup>I IL-8 (0,25 nM) o <sup>125</sup>I GRO- $\alpha$  e IL-8R $\alpha$  0,5  $\mu$ g/ml o membranas de IL-8R $\beta$  1,0  $\mu$ g/ml en Bis-Trispropano 20 mM y tampones de Tris HCl 0,4 mM, pH 8,0, que contienen MgSO<sub>4</sub> 1,2 mM, EDTA 0,1 mM, Na 25 mM y CHAPS 0,03 %. Además, se añade el fármaco o compuesto de interés que se ha predisoluto en DMSO de modo que se alcance una concentración final de entre 0,01 nM y 100  $\mu$ M. El ensayo se inicia por la adición de <sup>125</sup>I IL-8. Después de una hora a temperatura ambiente la placa se recoge usando un recolector de 96 pocillos Tomtec en una tira de filtro de fibra de vidrio bloqueada con polietilenimina 1 %/ BSA 0,5 % y se lava 3 veces con NaCl 25 mM, TrisHCl 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 1 mM, EDTA 0,5 mM, CHAPS 0,03 %, pH 7,4. El filtro se seca después y se cuenta en el contador de centelleo líquido Betaplate. El receptor IL-8 R $\alpha$ , o de Tipo I, recombinante también se denomina en el presente documento el receptor no permisivo y el receptor IL-8 R $\beta$ , o Tipo II, recombinante se denomina el receptor permisivo.  
45 Los compuestos representativos de Fórmula (I) han mostrado actividad inhibidora positiva en este ensayo a niveles de CI<sub>50</sub> < 30  $\mu$ M.

#### Ensayo de quimiotaxis:

55 Las propiedades inhibidoras *in vitro* de estos compuestos se determinan en el ensayo de quimiotaxis de neutrófilos como se describe en Current Protocols in Immunology, vol. I, Supl 1, Unidad 6.12.3., cuya divulgación se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. Se aislaron neutrófilos de sangre humana como se describe en Current Protocols in Immunology Vol. I, Supl 1 Unidad 7.23.1, cuya

divulgación se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. Los quimioatrayentes IL-8, GRO- $\alpha$ , GRO- $\beta$ , GRO- $\gamma$  y NAP-2 se colocan en la cámara del fondo de una cámara de 48 multipocillos (Neuro Probe, Cabin John, MD) a una concentración entre 0,1 y 100 nM. Las dos cámaras se separan por un filtro de policarbonato 5  $\mu$ M. Cuando los compuestos de esta invención se ensayan, se mezclan con las células (0,001 – 1000 nM) justo antes de la adición de las células a la cámara superior. Se permite que la incubación continúe durante entre aproximadamente 45 y 90 minutos a aproximadamente 37 °C en un incubador humidificado con CO<sub>2</sub> 5 %. Al final del periodo de incubación, se retira la membrana de policarbonato y se lava la parte superior, después se tiñe la membrana usando el protocolo de tinción Diff Quick (Baxter Products, McGaw Park, IL, Estados Unidos). Las células que han sufrido quimiotaxis hacia la quimioquina se cuentan visualmente usando un microscopio. Generalmente, se cuentan cuatro campos para cada muestra, se hace la media de estos números para proporcionar el número medio de células que han migrado. Cada muestra se ensaya por triplicado y cada compuesto se repite al menos cuatro veces. Para ciertas células (células de control positivo) no se añade compuesto, estas células representan la máxima respuesta quimiotáctica de las células. En el caso en el que se desea un control negativo (no estimulado), no se añade quimioquina a la cámara del fondo. La diferencia entre el control positivo y el control negativo representa la actividad quimiotáctica de las células.

#### **Ensayo de Liberación de Elastasa:**

Los compuestos de la presente invención se ensayan con respecto a su capacidad para prevenir la liberación de elastasa de neutrófilos humanos. Los neutrófilos se aíslan de sangre humana como se describe en Current Protocols in Immunology Vol. 1, Supl 1 Unidad 7.23.1. Se colocan  $0,88 \times 10^6$  células PMN suspendidas en solución de Ringer (NaCl 118, KCl 4,56, NaHCO<sub>3</sub> 25, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,03, Glucosa 11,1, HEPES 5 mM, pH 7,4) en cada pocillo de una placa de 96 pocillos en un volumen de 50  $\mu$ l. A esta placa se añade el compuesto de ensayo (0,001 – 1000 nM) en un volumen de 50  $\mu$ l, citocalasina B en un volumen de 50  $\mu$ l (20  $\mu$ g/ml) y tampón de Ringer en un volumen de 50  $\mu$ l. Se permite que estas células se calienten (37 °C, CO<sub>2</sub> 5 %, RH 95 %) durante 5 minutos antes de que se añada IL-8, GRO $\alpha$ , GRO $\beta$ , GRO $\gamma$  o NAP-2 a una concentración final de 0,01 - 1000 nM. Se permite que la reacción continúe durante 45 minutos antes de centrifugar la placa de 96 pocillos (800 x g, 5 minutos) y se retiran 100  $\mu$ l del sobrenadante. Este sobrenadante se añade a una segunda placa de 96 pocillos seguido de un sustrato de elastasa artificial (MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Val-AMC, Nova Biochem, La Jolla, CA) a una concentración final de 6  $\mu$ g/ml disuelta en solución salina tamponada con fosfato. Inmediatamente, la placa se sitúa en un lector de placa de 96 pocillos fluorescente (Cytofluor 2350, Millipore, Bedford, MA) y se recogen datos a intervalos de 3 minutos de acuerdo con el procedimiento de Nakajima y col J. Biol. Chem. 254 4027 (1979). La cantidad de elastasa liberada de las PMN se calcula midiendo la velocidad de degradación de MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Val-AMC.

#### **TNF- $\alpha$ en Ensayo de Lesión del Cerebro Traumática**

El presente ensayo posibilita la examinación de la expresión de ARNm de factor de necrosis tumoral en regiones específicas del cerebro que siguen a la lesión del cerebro traumática de percusión de fluidos lateral inducida (TBI) en ratas. Se anestesió a ratas adultas Sprague-Dawley (n=42) con pentobarbital sódico (60 mg/kg, i.p.) y se sometieron a lesión cerebral de percusión de fluidos lateral de gravedad moderada (2,4 atmósferas) centrada sobre la corteza temporoparietal izquierda (n=18) o tratamiento "simulado" (anestesia y cirugía sin lesión, n=18). Se sacrificaron los animales por decapitación a 1, 6 y 24 horas después de la lesión, se retiraron los cerebros y se prepararon muestras de tejido de la corteza parietal izquierda (lesionada) (LC), área correspondiente en la corteza contralateral derecha (RC), corteza adyacente a la corteza parietal lesionada (LA), área adyacente correspondiente en la corteza derecha (RA), hipocampo izquierdo (LH) e hipocampo derecho (RH). Se aísla ARN total y se realiza una hibridación de transferencia de Northern y se cuantifica en relación con un ARN control positivo para TNF- $\alpha$  (macrófago = 100 %). Se observa un aumento notable de la expresión de ARNm de TNF- $\alpha$  en LH (104 $\pm$ 17 % de control positivo, p < 0,05 en comparación con simulación), LC (105 $\pm$ 21 %, p < 0,05) y LA (69 $\pm$ 8 %, p < 0,01) en el hemisferio con traumatismo 1 hora después de la lesión. También se observó un aumento en la expresión de ARNm de TNF- $\alpha$  en LH (46 $\pm$ 8 %, p < 0,05), LC (30 $\pm$ 3 %, p < 0,01) y LA (32 $\pm$ 3 %, p < 0,01) a las 6 horas que se resuelve 24 horas después de la lesión. En el hemisferio contralateral, aumenta la expresión de ARNm de TNF- $\alpha$  en RH (46 $\pm$ 2 %, p < 0,01), RC (4 $\pm$ 3 %) y RA (22 $\pm$ 8 %) a 1 hora y en RH (28 $\pm$ 11 %), RC (7 $\pm$ 5 %) y RA (26 $\pm$ 6 %, p < 0,05) a las 6 horas pero no a las 24 horas después de la lesión. En animales simulados (cirugía sin lesión) o vírgenes, no se observaron cambios consistentes en la expresión de ARNm de TNF- $\alpha$  en ninguna de las 6 áreas cerebrales en cualquiera de los hemisferios en ningún momento. Estos resultados indican que después de la lesión cerebral por percusión de fluidos parasagital, se altera la expresión temporal de ARNm de TNF- $\alpha$  en regiones cerebrales específicas, incluyendo las del hemisferio no traumatizado. Puesto que TNF- $\alpha$  es capaz de inducir el factor de crecimiento nervioso (NGF) y estimular la liberación de otras citocinas de astrocitos activados, esta alteración postraumática de la expresión génica de TNF- $\alpha$  desempeña un papel importante en la respuesta tanto aguda como regenerativa a traumatismo de SNC.

#### **Modelo de lesión del SNC para ARNm de IL-1 $\beta$**

5 Este ensayo caracteriza la expresión regional de ARNm de interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) en regiones específicas del cerebro después de lesión cerebral traumática de percusión de fluidos lateral experimental (TBI) en ratas. Se anestesió a ratas adultas Sprague-Dawley (n=42) con pentobabrital sódico (60 mg/kg, i.p.) y se sometieron a lesión de cerebro por percusión de fluidos lateral de gravedad moderada (2,4 atmósferas) centrada sobre la corteza temporoparietal izquierda (n=18) o tratamiento "simulado" (anestesia y cirugía sin lesión). Se sacrifican los animales a 1, 6 y 24 horas después de la lesión, se retiran los cerebros y se preparan muestras de tejido de corteza parietal izquierda (lesionada) (LC), el área correspondiente en la corteza contralateral derecha (RC), corteza adyacente a la corteza parietal lesionada (LA), área adyacente correspondiente en la corteza derecha (RA), hipocampo izquierdo (LH) e hipocampo derecho (RH). Se aísla ARN total y se realiza una hibridación de transferencia de Northern y se presenta la cantidad de ARNm de IL-1 $\beta$  en tejido cerebral como porcentaje de radioactividad relativa de ARN de macrófagos positivos para IL-1 $\beta$  que se cargó en el mismo gel. 1 hora después de la lesión cerebral, se observa un aumento notable y significativo en la expresión de ARNm de IL-1 $\beta$  en LC (20,0 $\pm$ 0,7 % de control positivo, n=6, p < 0,05 en comparación con el animal de simulación), LH (24,5 $\pm$ 0,9 %, p < 0,05) y LA (21,5 $\pm$ 3,1 %, p < 0,05) en el hemisferio lesionado, que se mantuvo elevada hasta 6 horas después de la lesión en el LC (4,0 $\pm$ 0,4 %, n=6, p < 0,05) y LH (5,0 $\pm$ 1,3 %, p < 0,05). En animales de simulación o vírgenes, no se observa expresión de ARNm de IL-1 $\beta$  en ninguna de las áreas del cerebro respectivas. Estos resultados indican que después de TBI, la expresión temporal de ARNm de IL-1 $\beta$  se estimula regionalmente en regiones específicas del cerebro. Estos cambios regionales en citocinas, tales como IL-1 $\beta$  desempeñan un papel después del traumatismo.

10

15

20

**REIVINDICACIONES**

1. Un compuesto que es: N-[4-cloro-2-hidroxi-3-(1-piperazinilsulfonil)fenil]-N'-(2-cloro-3-fluorofenil)urea, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.
- 5 2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la sal farmacéuticamente aceptable se selecciona entre el grupo que consiste en cloruro, bromuro, sulfato, fosfato, metanosulfonato, etanosulfonato, acetato, malato, tartrato, citrato, lactato, oxalato, succinato, fumarato, maleato, benzoato, salicilato, fenilacetato y mandelato.
3. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo como se ha definido en la reivindicación 1 o la reivindicación 2 y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.
- 10 4. El uso de un compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo como se define en la reivindicación 1 o reivindicación 2 en la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento de una enfermedad mediada por quimiocinas, en el que la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en psoriasis, dermatitis atópica, artritis (reumatoide u ósea), asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, síndrome de distrés respiratorio del adulto, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, apoplejía, choque séptico, choque endotóxico, sepsis gram negativa, síndrome de choque tóxico, lesión por perfusión cardíaca y renal,
- 15 glomerulonefritis, trombosis, reacción de injerto contra huésped, enfermedad de Alzheimer, rechazos de aloinjertos, malaria, reestenosis, angiogénesis, aterosclerosis, osteoporosis, gingivitis, enfermedades virales tales como rinovirus y liberación de células madre hematopoyéticas no deseada.
5. El uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la enfermedad es enfermedad pulmonar obstructiva crónica.
6. El uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la enfermedad es enfermedad inflamatoria del intestino.
- 20 7. El uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la enfermedad es colitis ulcerosa.
8. El uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la enfermedad es psoriasis.
9. Un compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo como se ha definido en la reivindicación 1 o la reivindicación 2 para su uso en terapia.