

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 437 115**

51 Int. Cl.:

**C07D 241/04** (2006.01)

**A61K 31/495** (2006.01)

**A61P 11/00** (2006.01)

**A61P 11/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.06.2007 E 07812248 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2013 EP 2034832**

54 Título: **Antagonista de receptor de Interleucina-8**

30 Prioridad:

**23.06.2006 US 805626 P**

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

**09.01.2014**

73 Titular/es:

**GLAXOSMITHKLINE LLC (100.0%)  
One Franklin Plaza 200 North 16th Street  
Philadelphia, PA 19102, US**

72 Inventor/es:

**BUSCH-PETERSEN, JAKOB;  
BROOK, CHRISTOPHER S.;  
GOODMAN, RICHARD M. y  
WEBB, EDWARD C.**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 437 115 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

Antagonista de receptor de Interleucina-8

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a p-toluensulfonato de N-[4-cloro-2-hidroxi-3-(piperazin-1-sulfonil)fenil]-N'-(2-cloro-3-fluorofenil)urea, a composiciones farmacéuticas que contienen este compuesto y a su uso 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 Muchos nombres diferentes se han dado a la Interleucina-8 (IL-8), tales como proteína atrayente/activación de neutrófilos-1 (NAP-1), factor quimiotáctico de neutrófilos derivado de monocito (MDNCF), factor activador de neutrófilos (NAF), y factor quimiotáctico de linfocitos de células T. La interleucina-8 es un quimioatrayente para neutrófilos, basófilos y un subconjunto de células T. Es producido por una mayoría de células nucleadas incluyendo macrófagos, fibroblastos, células endoteliales y epiteliales expuestas a TNF, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  o LPS, y por los neutrófilos mismos cuando se exponen a LPS o factores quimiotácticos tales como FMLP.

15 GRO $\alpha$ , GRO $\beta$ , GRO $\gamma$  y NAP-2 también pertenecen a la familia de quimiocina  $\alpha$ . Igual que IL-8, estas quimiocinas también se han referido por diferentes nombres. Por ejemplo, GRO $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  se han referido como MGSA $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$  respectivamente (Actividad Estimulante de Crecimiento de Melanoma). Todas las quimiocinas de la familia  $\alpha$  que poseen el motivo ELR, que precede 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 un número de funciones *in vitro*. Se ha mostrado que todas tienen propiedades quimioatrayentes para neutrófilos, mientras que IL-8 y GRO $\alpha$  han demostrado actividad quimiotáctica de linfocitos T y basofílica. Además, IL-8 puede inducir liberación de histamina de basófilos tanto de individuos normales como atópicos. GRO- $\alpha$  e IL-8, además, pueden inducir liberación de enzima lisosomal y explosión respiratoria de neutrófilos. IL-8 también se ha mostrado que incrementa la expresión en la superficie de Mac-1 (CD11b/CD18) sobre neutrófilos sin síntesis de proteína nuevamente. Esto puede contribuir a la adhesión incrementada 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 han sido implicadas en una amplia gama de trastornos inflamatorios agudos y crónicos incluyendo psoriasis y artritis reumatoide. Además de las quimiocinas ELR (aquellas que contienen el motivo ELR de aminoácidos antes del motivo CXC) también han sido implicadas en angiostasis.

30 *In vitro*, IL-8, GRO $\alpha$ , GRO $\beta$ , GRO $\gamma$  y NAP-2 inducen cambios de forma de neutrófilos, quimiotaxis, liberación de gránulos y explosión respiratoria, uniéndose y activando receptores de la familia ligada a proteína G de transmembrana siete, en particular uniéndose receptores de IL-8, muy notablemente receptor de IL-8 $\beta$  (CXCR2). El desarrollo de antagonistas de molécula pequeña no peptídicos para miembros de esta familia de receptores tiene precedente. Por lo tanto, el receptor de IL-8 representa un objetivo prometedor para el desarrollo de agentes antiinflamatorios novedosos.

35 Persiste la necesidad de tratamiento, en este campo, de compuestos que sean capaces de unirse a receptores CXCR1 y/o CXCR2. Por lo tanto, las condiciones asociadas con un incremento en la producción de IL-8 (que es responsable de quimiotaxis de subconjuntos de neutrófilos y células T en el sitio inflamatorio) se beneficiarían por compuestos que son inhibidores de la unión a receptor IL-8. Dichos compuestos se describen en el documento WO 2004/039775, patente de los EE.UU. número 6.180.675 y patente de EE.UU. número 6.500.863.

**Sumario de la invención**

40 La presente invención se refiere a p-toluensulfonato de N-[4-cloro-2-hidroxi-3-(piperazin-1-sulfonil)fenil]-N'-(2-cloro-3-fluorofenil)urea (presente compuesto) y a composiciones que comprenden el presente compuesto y a un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

45 La presente invención también se refiere a combinaciones que comprenden el presente compuesto y a uno o más ingredientes terapéuticos adicionales.

Se describe también un procedimiento de tratamiento de una enfermedad medida por quimiocina, en el que la quimiocina es una que se une a un receptor IL-8 $\alpha$  o  $\beta$ , y dicho procedimiento comprende administrar una cantidad efectiva del presente compuesto.

50 Se describe también un procedimiento para inhibir la unión de IL-8 a sus receptores en un mamífero, particularmente en un humano, que necesita el mismo que comprende administrar una cantidad efectiva del presente compuesto.

**Descripción detallada de la invención**

La presente invención se refiere a p-toluensulfonato de N-[4-cloro-2-hidroxi-3-(piperazin-1-sulfonil)fenil]-N'-(2-cloro-3-

fluorofenil)urea y a composiciones que comprenden el presente compuesto y a un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

La presente invención también se refiere a combinaciones que comprenden el presente compuesto y a uno o más ingredientes terapéuticos adicionales.

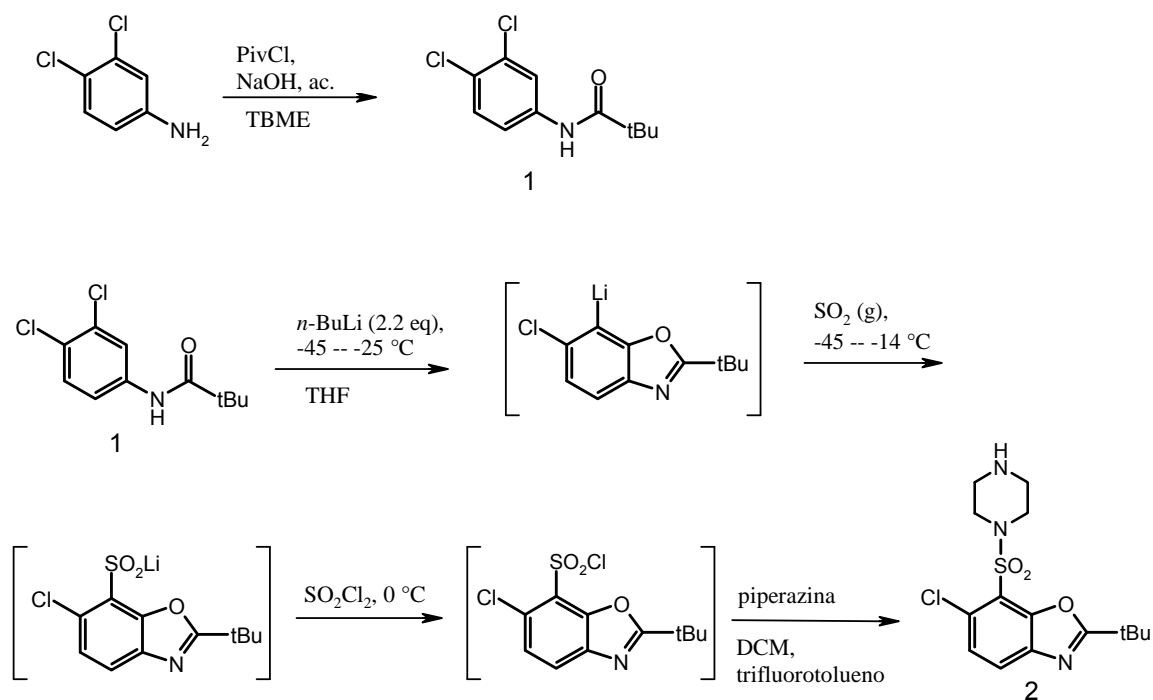
- 5 Se describe también un procedimiento de tratamiento de enfermedad mediada por quimiocina, en el que la quimiocina es una que se une a un receptor de IL-8  $\alpha$  o  $\beta$ , y dicho procedimiento comprende administrar una cantidad efectiva del presente compuesto.

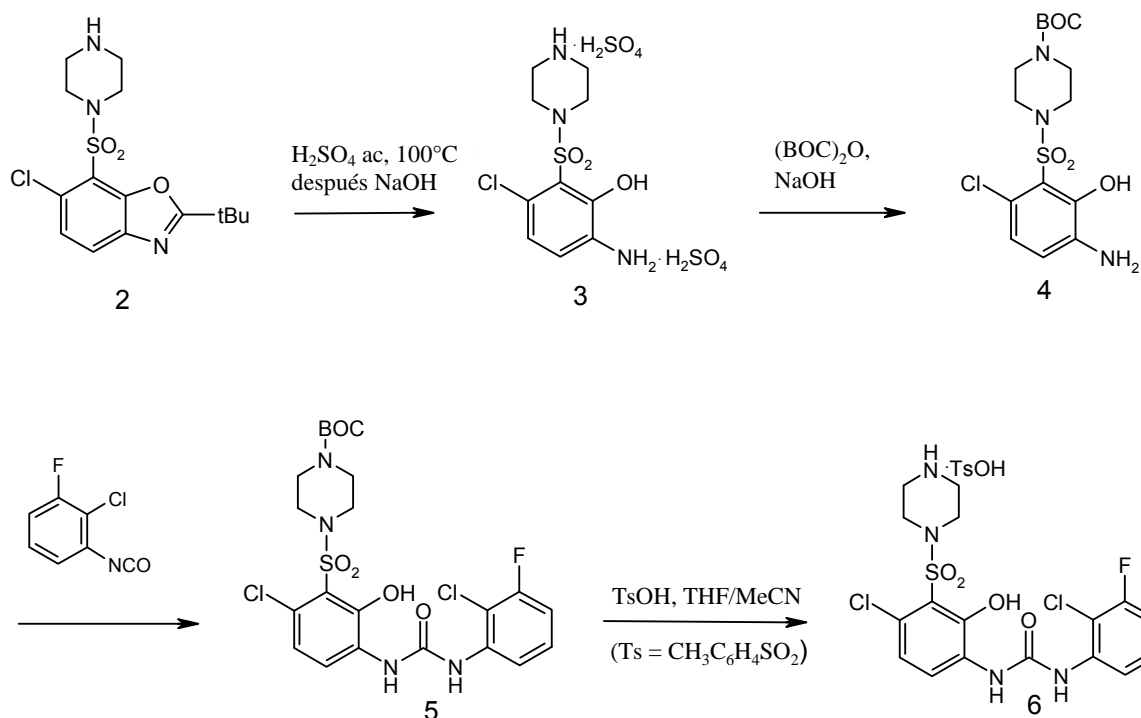
10 Se describe también un procedimiento para inhibir la unión de IL-8 a sus receptores en un mamífero, particularmente un humano, que necesita el mismo que comprende administrar una cantidad efectiva del presente compuesto.

Se describen también los procedimientos de tratamiento de asma, de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y de la enfermedad respiratoria en adultos. En particular, la presente invención se refiere al tratamiento de la enfermedad pulmonar obstructiva usando el presente compuesto.

### Procedimiento de preparación

- 15 p-toluenesulfonato de N-[4-cloro-2-hidroxi-3-(piperazin-1-sulfonil)fenil]-N'-(2-cloro-3- fluorofenil)urea





### Preparación del compuesto 1

3,4-dicloroanilina (100 g) se disolvió en tetrabutilmetilamina (TBME) (660 ml) y se enfrió a 10-15°C. Se añadió hidróxido de sodio (94 g de una solución acuosa al 30%) y la solución se agitó vigorosamente mediante agitador mecánico. Cloruro de trimetilacetilo (84 ml) se añadió a una velocidad tal como para mantener la temperatura interna por debajo de 35°C. Cuando la adición se completó (10-15 min.), la mezcla se mantuvo a 30-35°C durante aproximadamente 30 min., y después se enfrió a 0-5°C durante 30-40 minutos. La mezcla de reacción se mantuvo a 0-5°C durante 1 h, y después se filtró, se enjuagó primero con 90:10 de agua/metanol (400 ml) y después con agua (600 ml). El secado a 50-55°C bajo vacío dio el producto como cristales blanquecinos. Se obtuvo un rendimiento de 127 g.

### Preparación del compuesto 2

Una solución del compuesto 1 (300 ml) se enfrió a -50 - -40°C bajo una atmósfera de nitrógeno inerte. N-Butil-litio (2,5M en hexanos, 179 ml) se añadió a una velocidad tal como para mantener la temperatura interna y la solución entre -45 - -30°C (adición, aprox. 15 - 30 min). La solución se mantuvo a aprox. a -35 - -25°C hasta que CLAR indicó que se completó la reacción inicial. Después, la solución se volvió a enfriar a -45 - -40°C, y se hizo burbujear dióxido de azufre (~16,9 g) a través de la solución, manteniendo la temperatura interna por debajo de aproximadamente -14°C, hasta que la solución se hizo ácida. Cuando la reacción se completó, la mezcla se calentó a -10 - 0 °C. Empezando a -2 - 3°C, cloruro de sulfurilo (25,2 ml), después se añadió gota a gota a la solución de tetrahydrofurano durante 5 - 15 min, manteniendo la temperatura por debajo de aproximadamente 22°C. Después de 5 min, CLAR confirmó que la reacción se había completado, mientras la solución se mantuvo alrededor de 10 - 15°C. La mezcla fue intercambiada por solvente en  $\alpha,\alpha,\alpha$ -trifluorotolueno bajo presión reducida, se filtró, se concentró parcialmente bajo vacío (a ~100 ml), seguido por la adición de diclorometano (350 ml). A esta mezcla se añadió gota a gota una solución de piperazina (61,2 g) en diclorometano (625 ml) a temperatura ambiente, manteniendo la temperatura interna de la solución a 15 - 27°C (2 h de adición). La reacción se mantuvo a 20 - 24°C hasta que se completó. La mezcla se lavó con agua desionizada (200 ml), la capa orgánica se concentró, seguido por la adición de heptano (450 ml). El producto (70,5 g) se aisló por filtración, se lavó con heptano (50-100 ml), y se secó bajo vacío a 50-55°C.

### Preparación del compuesto 3

El compuesto 2 (30 g) se añadió a ~16% (p/p en agua) de ácido sulfúrico (300 ml). La mezcla resultante se calentó a reflujo a 99-103°C durante ~6 horas. Al completarse la reacción, la solución se enfrió a 40-50°C, después se concentró a ~60 ml bajo presión reducida. Se añadió acetonitrilo (225 ml) y la suspensión resultante se agitó a 20-25°C durante ~1 hora. El producto se aisló por filtración, se lavó con acetonitrilo (135 ml) y se secó a 45-50°C bajo vacío. Se obtuvo un rendimiento de 33,34 g.

Preparación del compuesto 4

El compuesto 3 (20 g) se añadió a agua desionizada (200 ml). El pH de la solución resultante se ajustó a 6,5-7,0 mediante la adición de hidróxido de sodio ac. al 50% (~6,35 ml) mientras la temperatura interna se mantenía entre 20-30°C. Después, se añadió una solución de dicarbonato de di-ter-butilo (8,9 g) en acetato de etilo (80 ml + 20 ml enjuague). El pH de la mezcla resultante se ajustó a 6,8-7,0 mediante la adición de hidróxido de sodio ac. al 50% (2,45 ml) mientras la temperatura interna se mantenía entre 20-30°C. Al completarse la reacción, la solución de reacción se filtró para remover una pequeña cantidad de precipitado. Las dos capas del filtrado se separaron y la capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (140 ml). Las capas de acetato de etilo combinadas se lavaron con agua (40 ml) y se concentraron a 100 ml. Se añadió heptano (100 ml) y la suspensión resultante se concentró a 60 ml. Este procedimiento se repitió una vez más. Después, se añadió heptano (140 ml) y la suspensión resultante se agitó a 20-25°C durante ~1 hora. El producto se aisló por filtración, se lavó con heptano (80 ml) y se secó a 40-45°C bajo vacío. Se obtuvo un rendimiento de 15,3 g.

Preparación del compuesto 5

El compuesto 4 (10 g) se añadió a dimetilformamida (20 ml) y acetonitrilo (80 ml). Isocianato de 2-cloro-3-fluorofenilo (4,77 g) se añadió mientras la temperatura interna se mantenía entre 20-30°C, seguido por enjuague con 10 ml de acetonitrilo. La mezcla resultante se agitó a 20-25°C durante ~2 horas. Al completarse la reacción, se añadió metanol (50 ml). La suspensión resultante se agitó a 20-25°C durante ~10 minutos. Se añadió agua desionizada (150 ml) y la suspensión resultante se agitó a 20-25°C durante ~1 hora. El producto se aisló por filtración, se lavó con agua desionizada (100 ml) y metanol (15-20 ml), y después se secó a 40-45°C bajo vacío. Se obtuvo un rendimiento de 14,15 g.

Preparación del compuesto 6 – Procedimiento 1

El compuesto 5 (50 g) se disolvió en tetrahidrofurano (THF, 200 ml) y se calentó a 33-37°C y se mantuvo a 33-37°C. En otro reactor, se preparó una solución de acetonitrilo (250 ml), THF (50 ml) y ácido p-toluensulfónico monohidratado (43,9 g). La solución resultante se calentó a 33-37°C y se mantuvo a 33-37°C. La solución de ácido p-toluensulfónico se filtró y se transfirió al reactor que contenía compuesto 5 y THF mientras se mantenía la temperatura a 33-37°C. Después de que se consumió el material de partida, semillas de producto micronizadas (0,5 g) se cargaron en una cantidad mínima de acetonitrilo (5 ml). La mezcla de reacción después se calentó a 53-57°C durante más de ~40 minutos, y se mantuvo a esa temperatura durante por lo menos 4 horas. La reacción se enfrió a 0-5°C, el producto se aisló por filtración, se lavó con acetonitrilo (250 ml), y se secó bajo vacío a 55-60°C. Se obtuvo un rendimiento de 52,24 g.

Preparación del compuesto 6 – Procedimiento 2

El compuesto 5 (500 g) se cargó al reactor 1 seguido por acetonitrilo (CAN, 3750 ml) y tetrahidrofurano (THF, 1250 ml). La solución después se calentó a 60-65°C y una vez que se observó una solución clara, se realizó una filtración clarificante al reactor 2. Al reactor 1, se añadió ácido p-toluensulfónico monohidratado (TsOH·H<sub>2</sub>O, 439 g) seguido por ACN (750 ml) y THF (250 ml). La mezcla se calentó a 40-45°C y una vez que se observó una solución clara, se realizó una filtración clarificante, añadiendo la solución al reactor 2 (que contenía la solución de material de partida) y manteniendo la temperatura en el reactor 2 a 50-60°C. La mezcla se calentó a reflujo y se mantuvo a 70-80°C hasta que la reacción se completó. Se removieron ~3500 ml de solvente por destilación atmosférica. El reactor después se cargo con 2,5 L de agua seguido por 4 L de ACN, y la temperatura se ajustó a 70-80°C. Después de que se observó la disolución, la solución resultante se enfrió a 64-68°C. Después de 5-10 minutos, semillas de producto molidas (5 g) se añadieron en una mínima cantidad de acetonitrilo, y se mantuvieron a 64-68°C durante una hora. La mezcla se enfrió a 0-5°C durante 2 horas y se mantuvo a 0-5°C durante ~30 minutos antes de aislar el producto por filtración. El producto sólido se lavó con 2,5 l de acetonitrilo, y se secó bajo vacío a 50-60°C. Se obtuvo un rendimiento de 480 g.

El presente compuesto es útil en la fabricación de una medicina para el tratamiento profiláctico o terapéutico de cualquier estado de enfermedad en un humano, u otro mamífero, que es exacerbado o causado por producción excesiva o no regulada de citocina IL-8 por las células de dicho mamífero pero no limitado a monocitos y/o macrófagos, u otras quimiocinas que se unen al receptor de IL-8 $\alpha$  o  $\beta$ , también referido como el receptor de tipo I o tipo II.

Se describe también un procedimiento para tratar una enfermedad mediada por quimiocina, en el que la quimiocina es una que se une a un receptor de IL-8 $\alpha$  o  $\beta$  y dicho procedimiento comprende administrar una cantidad efectiva del presente compuesto. En particular, las quimiocinas son IL-8, GRO $\alpha$ , GRO $\beta$ , GRO $\gamma$ , NAP-2 o ENA-78.

El presente compuesto se administra en una cantidad suficiente para inhibir función de citocina, en particular IL-8, GRO $\alpha$ , GRO $\beta$ , GRO $\gamma$ , NAP-2 o ENA-78, de tal manera que son biológicamente regulados descendientemente a niveles normales de función fisiológica, o en algún caso a niveles por debajo de lo normal, para mitigar el estado de enfermedad. Los niveles anormales 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) nivel de IL-8 libre mayor o igual a 1 picogramo por ml; (ii) cualquier IL-8, GRO $\alpha$ , GRO $\beta$ , GRO $\gamma$ , NAP-2 y ENA-78 asociado con células por encima de niveles fisiológicos normales; o (iii) la presencia

de IL-8, GRO $\alpha$ , GRO $\beta$ , GRO $\gamma$ , NAP-2 o ENA-78 por encima de los niveles basales en células o tejidos en los cuales IL-8, GRO $\alpha$ , GRO $\beta$ , GRO $\gamma$ , NAP-2 o ENA-78 respectivamente se produce.

Hay muchos estados de enfermedad en los cuales la producción excesiva o no regulada de IL-8 está implicada en la exacerbación y/o causa de la enfermedad. Las enfermedades mediadas por quimiocina incluyen psoriasis, dermatitis atópica, osteoartritis, artritis reumatoide, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, síndrome de insuficiencia respiratoria en adultos, enfermedad intestinal inflamatoria, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, accidente vascular cerebral, choque séptico, choque endotóxico, sepsis por gram-negativos, síndrome de choque tóxico, lesión por reperfusión cardiaca y renal, glomerulonefritis, trombosis, reacción del injerto contra el huésped, enfermedad de Alzheimer, rechazos de aloinjertos, malaria, restenosis, angiogénesis, aterosclerosis, osteoporosis, gingivitis, enfermedades virales tales como rinovirus o liberación de células madre hematopoyéticas no deseada.

En particular, el compuesto de la presente invención es útil en el tratamiento de asma, de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y del síndrome disneico en adultos. Preferentemente, el presente compuesto es útil para tratar la enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

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

La evidencia reciente también implica el papel de las quimiocinas en el tratamiento de infecciones por VIH Littleman *et al.*, Nature 381, pp. 661 (1996) y Koup *et al.*, Nature 381, pp. 667 (1996).

La presente evidencia también indica el uso de inhibidores de IL-8 en el tratamiento de aterosclerosis. La primera referencia, Boisvert *et al.*, J. Clin. Invest, 1998, 101:353-363 muestra, a través de transplantes de médula ósea, que la ausencia de receptores de IL-8 sobre células madre (y por lo tanto, sobre monocitos/macrófagos) conduce a una reducción en el desarrollo de placas ateroscleróticas en ratones deficientes de receptor de LDL.

La presente invención también provee un medio de tratamiento de lesiones del SNC. Dicho tratamiento se provee en un caso agudo, así como para prevención de lesión en aquellos individuos considerados susceptibles a lesión.

Lesiones del SNC, como se define en el presente documento, incluyen tanto trauma de cabeza abierta como penetrante, tal como por cirugía, o una lesión de trauma de cabeza cerrada, tal como por una lesión en la región de la cabeza. Dentro de esta definición también se incluye el accidente vascular isquémico, particularmente en el área del cerebro.

El accidente vascular cerebral isquémico se puede definir como un trastorno neurológico focal que resulta del suministro de sangre insuficiente a un área del cerebro particular, usualmente como una consecuencia de un émbolo, trombo o cierre ateromatoso local del vaso sanguíneo. El papel de las citocinas inflamatorias en esta área ha ido emergiendo y la presente invención provee medios para el tratamiento potencial de estas lesiones. Relativamente poco tratamiento, para una lesión aguda, tal como éstas, ha sido disponible.

FNT- $\alpha$  es una citocina con acciones proinflamatorias, incluyendo expresión de molécula de adhesión del leucocito endotelial. Los leucocitos se infiltran en lesiones cerebrales isquémicas y, por lo tanto, compuestos que inhiben o reducen los niveles de FNT serían útiles para el tratamiento de lesión cerebral isquémica. Véase Liu *et al.*, Stroke, Vol. 25., N° 7, pp. 1481-88 (1994).

Modelos de lesiones de cabeza cerrada y tratamiento con agentes mixtos de 5-LO/CO se divulgan en Shohami *et al.*, J. of Vasc & Clinical Physiology and Pharmacology, Vol. 3, N° 2, pp. 99-107 (1992). Se encontró que el tratamiento que redujo la formación de edema mejora el resultado funcional en estos animales tratados.

El presente compuesto se administra en una cantidad suficiente para inhibir IL-8, uniéndose a los receptores de IL-8 alfa o beta, de unirse a estos receptores, tal como lo evidencia una reducción en quimiotaxis y activación de neutrófilos. El descubrimiento de que el presente compuesto es un inhibidor de unión a IL-8 se basa en los efectos del presente compuesto en las pruebas.

Como se usa en el presente documento, el término "enfermedad o estado de enfermedad mediado por IL-8" se refiere a cualquiera y todos los estados de enfermedad en los cuales IL-8, GRO $\alpha$ , GRO $\beta$ , GRO $\gamma$ , NAP-2 o ENA-78 juega un papel, ya sea mediante la producción de IL-8, GRO $\alpha$ , GRO $\beta$ , GRO $\gamma$ , NAP-2 o ENA-78 mismos o mediante IL-8, GRO $\alpha$ , GRO $\beta$ , GRO $\gamma$ , NAP-2 o ENA-78, causando que otra monocina sea liberada, tal como pero sin limitarse

a IL-1, IL-6 o FNT. Un estado de enfermedad en el cual, por ejemplo, IL-1 es un componente principal, y cuya producción o acción es exacerbada o secretada en respuesta a IL-8, se consideraría por lo tanto un estado de enfermedad mediado por IL-8.

5 Como se usa en el presente documento, el término "enfermedad o estado de enfermedad mediado por quimiocina" se refiere a cualquiera y todos los estados de enfermedad en los cuales una quimiocina que se une a un receptor de IL-8  $\alpha$  o  $\beta$  juega un papel, tal como pero sin limitarse a IL-8, GRO $\alpha$ , GRO $\beta$ , GRO $\gamma$ , NAP-2 o ENA-78. Esto incluiría un estado de enfermedad en el cual IL-8 juega un papel, ya sea mediante la producción de IL-8 misma, o por IL-8 que causa que otra monocina sea liberada, tal como pero sin limitarse a IL-1, IL-6 o FNT. Un estado de enfermedad en el cual, por ejemplo, IL-1 es un componente principal y cuya producción o acción es exacerbada o secretada en respuesta a IL-8, se consideraría por lo tanto un estado de enfermedad mediado por IL-8.

10 Como se usa en el presente documento, el término "citocina" se refiere a cualquier polipéptido secretado que afecta las funciones de células y es una molécula que modula interacciones entre células en la respuesta inmune, inflamatoria o hematopoyética. Una citocina incluye, pero no se limita a monocinas y linfocinas, independientemente de qué células las produzcan. Por ejemplo, una monocina generalmente se refiere como siendo producida y secretada por una célula mononuclear, tal como un macrófago y/o monocito. Muchas otras células, sin embargo, también producen monocinas, tales como células asesinas naturales, fibroblastos, basófilos, neutrófilos, células endoteliales, astrocitos cerebrales, células estromáticas de médula ósea, queratinocitos epiderales y linfocitos B. Las linfocinas generalmente se refieren como siendo producidas por células de linfocitos. Ejemplos de citocinas incluyen, pero no se limitan a, Interleucina-1 (IL-1), Interleucina-6 (IL-6), Interleucina-8 (IL-8), Factor de Necrosis Tumoral-alfa (FNT- $\alpha$ ) y Factor de Necrosis Tumoral beta (FNT- $\beta$ ).

15 Como se usa en el presente documento, el término "quimiocina" se refiere a cualquier polipéptido secretado que afecta a las funciones de las células y es una molécula que modula interacciones entre células en la respuesta inmune, inflamatoria o hematopoyética, similar al término "citocina" anterior. Una quimiocina es principalmente secretada a través de las transmembranas celulares y causa quimiotaxis y activación de glóbulos blancos específicos y leucocitos, neutrófilos, monocitos, macrófagos, células T, células B, células endoteliales y células de músculo liso. Ejemplos de quimiocinas incluyen, pero no se limitan a, 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.

20 A fin de usar el presente compuesto en terapia, normalmente se formulará en una composición farmacéutica de conformidad con la práctica farmacéutica estándar. Por lo tanto, la presente invención también se refiere a una composición que comprende una cantidad no tóxica efectiva del presente compuesto y a un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

25 El presente compuesto y composiciones farmacéuticas que incorporan el mismo se pueden administrar convenientemente por cualquiera de las vías convencionalmente usadas para administración de fármaco, por ejemplo, vía oral, tópica, parenteral o por inhalación. El presente compuesto se puede administrar en formas de dosis convencionales preparadas combinando el presente compuesto con vehículos farmacéuticos estándares de conformidad con procedimientos convencionales. El presente compuesto también se puede administrar en dosis convencionales en combinación con un segundo compuesto terapéuticamente activo conocido. Estos procedimientos pueden implicar mezclado, granulado y compresión o disolución de los ingredientes, según sea apropiado para la preparación deseada. Se apreciará que la forma y carácter del vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable está determinada por la cantidad de ingrediente activo con la cual se ha de combinar, la vía de administración y otras variables bien conocidas. El vehículo(s) debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación y no deletéreo al receptor del mismo.

30 El vehículo farmacéutico utilizado puede ser, por ejemplo, o un sólido o un líquido. Ilustrativos de vehículos sólidos son lactosa, terra alba, sacarosa, talco, gelatina, agar, pectina, acacia, estearato de magnesio, ácido esteárico y similares. Ilustrativos de vehículos líquidos son jarabe, aceite de cacahuete, aceite de oliva, agua y similares. De manera similar, el vehículo o diluyente puede incluir material de retraso en el tiempo bien conocido en la técnica, tal como monoestearato de glicerilo o diastearato de glicerilo solo o con una cera.

35 Una amplia variedad de formas farmacéuticas se pueden utilizar. Por lo tanto, si un vehículo sólido se usa, la preparación puede formarse en tabletas, colocarse en una cápsula de gelatina dura en forma de polvo o comprimido o en la 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 ampolla o suspensión líquida no acuosa.

40 El presente compuesto se puede administrar tópicamente, es decir, mediante administración no sistémica. Esto incluye la aplicación del presente compuesto externamente a la epidermis o la cavidad bucal y la instilación de dicho compuesto en los oídos, ojos y nariz, de tal manera que el compuesto no entre significativamente al 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 tal como linimentos, lociones, cremas, pomadas o pastas, y gotas adecuadas para administración a los ojos, oídos o nariz. El ingrediente activo puede comprender, para administración tópica, de 0,001% a 10% p/p, por ejemplo de 1% a 2% en peso de la formulación. Sin embargo, puede comprender tanto como 10% p/p pero preferentemente comprenderá menos de 5% p/p, muy preferentemente de 0,1% a 1% p/p de la formulación.

Las lociones de conformidad con la presente invención incluyen aquellas adecuadas para aplicarse a la piel o a los ojos. Una loción para los ojos puede comprender una solución acuosa estéril que contiene opcionalmente un bactericida y se puede preparar por procedimientos similares a aquellos para la reparación de gotas. Lociones o linimentos para aplicarse a la piel también pueden incluir un agente para acelerar el secado y para enfriar la piel, tal como alcohol o acetona, y/o un humectante tal como glicerol o un aceite tal como aceite de ricino o aceite de araquís.

Cremas, pomadas o pastas de conformidad con la presente invención son formulaciones semisólidas del ingrediente activo para aplicación externa. Se pueden hacer mezclando el ingrediente activo en forma finamente dividida o pulverizada, solo o en solución o suspensión en un fluido acuoso o no acuoso, con la ayuda de maquinaria adecuada, con una base grasosa o no grasosa. 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 almendras, maíz, araquís, ricino u oliva; grasa de lana 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 activo de superficie adecuado, tal como un agente tensoactivo aniónico, catiónico o no iónico, tal como un éster de sorbitán o un derivado de polioxietileno del mismo. Agentes de suspensión tales como gomas naturales, derivados de celulosa o materiales inorgánicos tales como sílices silíceas y otros ingredientes tales como lanolina, también se pueden incluir.

Gotas de conformidad con la presente invención pueden comprender soluciones o suspensiones acuosas u oleosas estériles y se pueden preparar disolviendo el ingrediente activo en una solución acuosa adecuada de un agente bactericida y/o fungicida y/o cualquier otro conservador adecuado, y preferentemente incluyendo un agente activo de superficie. La solución resultante puede ser clarificada por filtración, transferida a un contenedor adecuado que después es sellado y esterilizado por autoclave o manteniendo a 98-100°C durante media hora. Alternativamente, la solución puede ser esterilizada por filtración y transferida al contenedor por una técnica aséptica. Ejemplos de agentes bactericidas y fungicidas adecuados para inclusión en las gotas son nitrato y acetato fenilmercurio (0,002%), cloruro de benzalconio (0,01%) y acetato de clorhexidina (0,01%). Solventes adecuados para la preparación de una solución oleosa incluyen glicerol, alcohol diluido y propilenglicol.

El presente compuesto se puede administrar parenteralmente, es decir mediante administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, intranasal, intrarectal, intravaginal o intraperitoneal. Las formas de dosis apropiadas para dicha administración se pueden preparar por técnicas convencionales. El presente compuesto también se puede administrar por inhalación, es decir, por administración de inhalación intranasal y oral. Formas de dosis apropiadas para dicha administración, tales como una formulación en aerosol o un inhalador de dosis medida se pueden preparar por técnicas convencionales.

Para todos los procedimientos de uso, divulgados en el presente documento, del presente compuesto, el régimen de dosis oral diario preferentemente será de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 80 mg/kg del peso corporal total. El régimen de dosis parenteral diario de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 80 mg/kg de peso corporal total. El régimen de dosis tópico diario será preferentemente de 0,1 mg a 150 mg, administrado de una a cuatro, preferentemente dos a tres veces al día. El régimen de dosis de inhalación diario será preferentemente de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg por día. También, un experto en la técnica reconocerá que la cantidad y espaciado óptimos de dosis individuales del presente compuesto serán determinados por la naturaleza y grado de la condición que se esté tratando, la forma, vía y sitio de administración y el paciente particular que esté siendo tratado, y que dichos óptimos pueden ser determinados por técnicas convencionales. También, un experto en la técnica apreciará que el curso de tratamiento óptimo, es decir, el número de dosis del presente compuesto dado por día para un número de días definido, lo puede lograr un experto en la técnica usando un curso convencional de pruebas de determinación de tratamiento.

Combinaciones:

El presente compuesto y las formulaciones farmacéuticas de conformidad con la invención se pueden usar en combinación con o incluir en uno o más de otros agentes terapéuticos, seleccionados de agentes antiinflamatorios, agentes anticolinérgicos (particularmente un antagonista de receptor de M<sub>1</sub>/M<sub>2</sub>/M<sub>3</sub>), agonistas de β<sub>2</sub>-adrenoreceptor, agentes antiinfecciosos, tales como antibióticos, antivirales o antihistamínicos. La invención por lo tanto provee, en un aspecto adicional, una combinación que comprende el presente compuesto o derivado fisiológicamente funcional del presente compuesto junto con uno o más de otros agentes terapéuticos activos, por ejemplo seleccionados de un agente antiinflamatorio, tal como un corticosteroide o un NSAID, un agente anticolinérgico, un agonista de β<sub>2</sub>-adrenoreceptor, un agente antiinfeccioso tal como un antibiótico o un antiviral, o un antihistamínico. Una realización de la invención abarca combinaciones que comprenden el presente compuesto o derivado fisiológicamente funcional



del mismo junto con un agonista de  $\beta 2$ -adrenoreceptor y/o un anticolinérgico y/o un inhibidor de PDE-4 y/o un antihistamínico.

Estará claro para un experto en la técnica que, en donde es apropiado, el otro ingrediente(a) terapéutico se puede usar en forma de sales, por ejemplo como sales de metal alcalino o amina o como sales de adición ácidas o profármacos, o como ésteres, por ejemplo ésteres de alquilo inferior, o como solvatos, por ejemplo hidratos para optimizar la actividad y/o estabilidad y/o características físicas tales como solubilidad, del ingrediente terapéutico. Estará claro también, que en donde es apropiado, los ingredientes terapéuticos se pueden usar en forma ópticamente pura.

En una realización, la invención abarca una combinación que comprende el presente compuesto junto con un agonista de  $\beta 2$ -adrenoreceptor. Ejemplos de agonistas de  $\beta 2$ -adrenoreceptor incluyen salmeterol (que puede ser un racemato o un enantiómero individual tal como el enantiómero *R*), salbutamol (que puede ser un racemato o un enantiómero solo tal como el enantiómero *R*), formoterol (que puede ser un racemato o un diaestereómero solo, tal como el diaestereómero *R,R*), salmefamol, fenoterol, carmoterol, etanterol, naminterol, clenbuterol, pirbuterol, flerbuterol, reproterol, bambuterol, indacaterol, terbutalina y sales de los mismos, por ejemplo la sal de xinafoato (1-hidroxi-2-naftalencarboxilato) de salmeterol, la sal de sulfato o sal libre de salbutamol o la sal de fumarato de formoterol. En una realización los agonistas de  $\beta 2$ -adrenoreceptor son agonistas de  $\beta 2$ -adrenoreceptor de larga acción, por ejemplo, compuestos que proveen broncodilatación efectiva durante aproximadamente 12 horas o más. Otros agonistas de  $\beta 2$ -adrenoreceptor incluyen aquellos descritos en los documentos WO2002/066422, WO2002/070490, WO2002/076933, WO2003/024439, WO2003/072539, WO2003/091204, WO2004/016578, WO2004/022547, WO2004/037807, WO2004/037773, WO2004/037768, WO2004/039762, WO2004/039766, WO2001/42193 y WO2003/042160.

Ejemplos adicionales de agonistas de  $\beta 2$ -adrenoreceptor incluyen:

3-(4-[[6-((2*R*)-2-hidroxi-2-[4-hidroxi-3-(hidroximetil)fenil]etil)amino]hexil]oxi]butil)bencensulfonamida;

3-(3-[[7-((2*R*)-2-hidroxi-2-[4-hidroxi-3-hidroximetil]fenil]etil)-amino]heptil]oxi]propil)bencensulfonamida;

4-((1*R*)-2-[[6-[[2-[[2,6-diclorobencil]oxi]etoxi]hexil]amino]-1-hidroxietil]-2-(hidroximetil)fenol);

4-((1*R*)-2-[[6-[[4-[[3-(ciclopentilsulfonil)fenil]butoxi]hexil]amino]-1-hidroxietil]-2-(hidroximetil)fenol);

N-[2-hidroxil-5-[[1*R*)-1-hidroxi-2-[[2-4-[[2*R*)-2-hidroxi-2-feniletil]amino]fenil]etil]amino]etil]fenil]formamida;

N-2-[4-(3-fenil-4-metoxifenil)aminofenil]etil]-2-hidroxi-2-(8-hidroxi-2(1*H*)-quinolinon-5-il)etilamina; y

5-[(*R*)-2-(2-[4-(2-amino-2-metil-propoxi)-fenilamino]-fenil)-etilamino]-1-hidroxi-etil]-8-hidroxi-1*H*-quinolin-2-ona.

El agonista de  $\beta 2$ -adrenoreceptor puede estar en forma de una sal formada con un ácido farmacéuticamente aceptable seleccionado de ácido sulfúrico, clorhídrico, fumárico, hidroxinaftoico (por ejemplo 1- o 3-hidroxi-2-naftoico), cinámico, cinámico sustituido, trifenilacético, sulfámico, sulfanílico, naftalenacrílico, benzoico, 4-metoxibenzoico, 2- o 4-hidroxibenzoico, 4-clorobenzoico y 4-fenilbenzoico.

Agentes antiinflamatorios incluyen corticosteroides. Ejemplos de corticosteroides que se pueden usar en combinación con los compuestos de la invención son aquellos corticosteroides orales e inhalados y sus profármacos que tienen actividad antiinflamatoria.

Ejemplos incluyen metilprednisolona, prednisolona, dexametasona, propionato de fluticasona propionate, éster S-fluorometílico de ácido  $6\alpha,9\alpha$ -difluoro-11 $\beta$ -hidroxi-16 $\alpha$ -metil-17 $\alpha$ -[[4-metil-1,3-tiazol-5-carbonil]oxi]-3-oxo-androsta-1,4-dieno-17 $\beta$ -carbotoico, éster S-fluorometílico de ácido  $6\alpha,9\alpha$ -difluoro-17 $\alpha$ -[[2-furanilcarbonil]oxi]-11 $\beta$ -hidroxi-16 $\alpha$ -metil-3-oxo-androsta-1,4-dieno-17 $\beta$ -carbotoico (furoato de fluticasona), éster S-(2-oxo-tetrahydro-furan-3*S*-ílico) de ácido  $6\alpha,9\alpha$ -difluoro-11 $\beta$ -hidroxi-16 $\alpha$ -metil-3-oxo-17 $\alpha$ -propioniloxi-androsta-1,4-dieno-17 $\beta$ -carbotoico, éster S-cianometílico de ácido  $6\alpha,9\alpha$ -difluoro-11 $\beta$ -hidroxi-16 $\alpha$ -metil-3-oxo-17 $\alpha$ -(2,2,3,3-tetrameticiclopropilcarbonil)oxi-androsta-1,4-dieno-17 $\beta$ -carbotoico y éster S-fluorometílico de ácido  $6\alpha,9\alpha$ -difluoro-11 $\beta$ -hidroxi-16 $\alpha$ -metil-17 $\alpha$ -(1-meticiclopropilcarbonil)oxi-3-oxo-androsta-1,4-dieno-17 $\beta$ -carbotoico, ésteres de beclometasona (por ejemplo el éster de 17-propionato o el éster de 17,21-dipropionato), ésteres de budesonida, flunisolida, mometasona (por ejemplo furoato de mometasona), triamcinolon acetona, rofleponida, ciclesonida (16 $\alpha$ ,17-[[*R*]-ciclohexilmetileno]bis(oxi)]-11 $\beta$ ,21-dihidroxi-pregna-1,4-dieno-3,20-diona), propionato de butixocort, RPR-106541, y ST-126. En una realización, los corticosteroides incluyen propionato de fluticasona, éster S-fluorometílico de ácido  $6\alpha,9\alpha$ -difluoro-11 $\beta$ -hidroxi-16 $\alpha$ -metil-17 $\alpha$ -[[4-metil-1,3-tiazol-5-carbonil]oxi]-3-oxo-androsta-1,4-dieno-17 $\beta$ -carbotoico, éster S-fluorometílico de ácido  $6\alpha,9\alpha$ -difluoro-17 $\alpha$ -[[2-furanilcarbonil]oxi]-11 $\beta$ -hidroxi-16 $\alpha$ -metil-3-oxo-androsta-1,4-dieno-17 $\beta$ -carbotoico, éster S-cianometílico de ácido  $6\alpha,9\alpha$ -difluoro-11 $\beta$ -hidroxi-16 $\alpha$ -metil-3-oxo-17 $\alpha$ -(2,2,3,3-tetrameticiclopropilcarbonil)oxi-androsta-1,4-dieno-17 $\beta$ -carbotoico y éster S-fluorometílico de ácido  $6\alpha,9\alpha$ -difluoro-11 $\beta$ -hidroxi-16 $\alpha$ -metil-17 $\alpha$ -(1-meticiclopropilcarbonil)oxi-3-oxo-androsta-1,4-dieno-17 $\beta$ -carbotoico. En una realización

el corticosteroide es éster S-fluorometílico de 6 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -difluoro-17 $\alpha$ -[(2-furanilcarbonil)oxi]-11 $\beta$ -hidroxi-16 $\alpha$ -metil-3-oxo-androsta-1,4-diene-17 $\beta$ -carbotoiico.

Ejemplos de corticosteroides también incluyen aquellos descritos en los documentos WO2002/088167, WO2002/100879, WO2002/12265, WO2002/12266, WO2005/005451, WO2005/005452, WO2006/072599 y WO2006/072600.

Compuestos no esteroideos que tienen agonismo de glucocorticoide que pueden poseer selectividad para transrepresión sobre la transactivación y que pueden ser útiles en terapia de combinación incluyen aquellos cubiertos en las siguientes solicitudes de patente publicadas y patentes: WO2003/082827, WO1998/54159, WO2004/005229, WO2004/009017, WO2004/018429, WO2003/104195, WO2003/082787, WO2003/082280, WO2003/059899, WO2003/101932, WO2002/02565, WO2001/16128, WO2000/66590, WO2003/086294, WO2004/026248, WO2003/061651, WO2003/08277, WO2006/000401, WO2006/000398 y WO2006/015870.

Compuestos no esteroideos que tienen agonismo de glucocorticoides que poseen selectividad para transrepresión sobre transactivación y que pueden ser útiles en terapia de combinación incluyen aquellos cubiertos en las siguientes patentes: WO2003/082827, WO1998/54159, WO2004/005229, WO2004/009017, WO2004/018429, WO2003/104195, WO2003/082787, WO2003/082280, WO2003/059899, WO2003/101932, WO2002/02565, WO2001/16128, WO2000/66590, WO2003/086294, WO2004/026248, WO2003/061651 y WO2003/08277.

Ejemplos de agentes antiinflamatorios incluyen fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID).

Ejemplos de NSAID's incluyen cromoglicato de sodio, nedocromil sódico, inhibidores de fosfodiesterasa (PDE) (por ejemplo, teofilina, inhibidores de PDE4 o inhibidores mixtos de PDE3/PDE4), antagonistas del leucotrieno, inhibidores de síntesis de leucotrieno (por ejemplo, montelukast), inhibidores de iNOS, triptasa y inhibidores de elastasa, antagonistas de beta-2 integrina y agonistas o antagonistas de receptor de adenosina (por ej., agonistas de adenosina 2a), antagonistas de citocina (por ejemplo, antagonistas de quimiocina, tales como un antagonista de CCR3) o inhibidores de síntesis de citocina, o inhibidores de 5-lipoxigenasa. En una realización, la invención abarca iNOS (óxido nítrico sintasa inducible) para administración oral. Ejemplos de inhibidores de iNOS incluyen aquellos divulgados en los documentos WO1993/13055, WO1998/30537, WO2002/50021, WO1995/34534 y WO1999/62875. Ejemplos de inhibidores de CCR3 incluyen aquellos divulgados en el documento WO2002/26722.

En una realización, la invención provee el uso del presente compuesto en combinación con un inhibidor de fosfodiesterasa 4 (PDE4), por ejemplo, en el caso de una formulación adaptada para inhalación. El inhibidor de PDE4 útil en este aspecto de la invención puede ser cualquier compuesto que es conocido o que se descubre que actúa como un inhibidor de PDE4, por ej., como un inhibidor de PDE4B y/o PDE4D.

Compuestos inhibidores de PDE4 incluyen ácido cis-4-ciano-4-(3-ciclopentiloxi-4-metoxifenil)ciclohexan-1-carboxílico, 2-carbometoxi-4-ciano-4-(3-ciclopropilmetoxi-4-difluorometoxifenil)ciclohexan-1-ona y cis-[4-ciano-4-(3-ciclopropilmetoxi-4-difluorometoxifenil)ciclohexan-1-ol]. También, ácido cis-4-ciano-4-[3-(ciclopentiloxi)-4-metoxifenil]ciclohexane-1-carboxílico (también conocido como cilomilast) y sus sales, ésteres, pro-fármacos o formas físicas, que se describe en la patente de EE.UU. 5.552.438.

Otros compuestos inhibidores de PDE4 incluyen AWD-12-281 (N-(3,5-dicloro-4-piridinil)-1-[4-fluorofenil]metil]-5-hidroxi- $\alpha$ -oxo-1H-indol-3-acetamida de Elbion (Hofgen, N. et al. 15<sup>o</sup>. EFMC Int Symp Med Chem (Sep 6-10, Edinburgh) 1998, Abst P.98; CAS referencia N<sup>o</sup> 247584020-9); un derivado de 9-benciladenina nombrado NCS-613 (INSERM); D-4418 de Chiroscience y Schering-Plough; un inhibidor de PDE4 de benzodiazepina identificado como CI-1018 (PD-168787) y atribuido a Pfizer; un derivado de benzodioxol divulgado por Kyowa Hakkō en el documento WO99/16766; K-34 de Kyowa Hakkō; V-11294A de Napp (Landells, L.J. et al. Eur Resp J [Annu Cong Eur Resp Soc (Sept 19-23, Geneva) 1998] 1998, 12 (Supl. 28): Abst P2393); roflumilast (3-(ciclopropilmetoxi)-N-(3,5-dicloro-4-piridinil)-4-(difluorometoxi)-benzamida) (véase EP 0 706 513 B1 de Byk Gulden Lomberg, por ej., véase ejemplo 5 de la misma); una ftalazinona (WO1999/47505) de Byk-Gulden; Pumafentrina, (-)-p-[(4aR\*,10bS\*)-9-etoxi-1,2,3,4,4a,10b-hexahidro-8-metoxi-2-metilbenzo[c][1,6]naftiridin-6-il]-N,N-diisopropilbenzamida que es un inhibidor mixto de PDE3/PDE4 que ha sido preparado y publicado por Byk-Gulden, ahora Altana; arofilina bajo desarrollo por Almirall-Prodesfarma; VM554/UM565 de Vernalis; o T-440 (Tanabe Seiyaku; Fuji, K. et al. J Pharmacol Exp Ther, 1998, 284(1): 162), y T2585.

Compuestos inhibidores de PDE4 adicionales se divulgan en las solicitudes de patente internacionales publicadas WO2004/024728, WO2004/056823, WO2004/103998 (por ej., ejemplo 399 o 544 descrito en las mismas), WO2005/058892, WO2005/090348, WO2005/090353, y WO2005/090354, todas a nombre de Glaxo Group Limited.

Ejemplos de agentes anticolinérgicos son aquellos compuestos que actúan como antagonistas en los receptores muscarínicos, en particular aquellos compuestos que son antagonistas de los receptores de M<sub>1</sub> o M<sub>3</sub>, antagonistas dobles de los receptores de M<sub>1</sub>/M<sub>3</sub> o M<sub>2</sub>/M<sub>3</sub>, o pan-antagonistas de los receptores de M<sub>1</sub>/M<sub>2</sub>/M<sub>3</sub>. Compuestos ilustrativos para administración por inhalación incluyen ipratropio (por ejemplo, como el bromuro, CAS 22254-24-6, vendido bajo el nombre Atrovent), oxitropio (por ejemplo, como el bromuro, CAS 30286-75-0) y tiotropio (por ejemplo, como el bromuro, CAS 136310-93-5, vendido bajo el nombre Spiriva). También de interés son revatropato (por ejemplo, como el bromhidrato, CAS 262586-79-8) y LAS-34273 que se divulga en el documento

5 WO2001/04118. Compuestos ilustrativos para administración oral incluyen pirenzepina (CAS 28797-61-7), darifenacina (CAS 133099-04-4, o CAS 133099-07-7 para el bromhidrato vendido bajo el nombre Enablex), oxibutnina (CAS 5633-20-5, vendido bajo el nombre Ditropan), terodilina (CAS 15793-40-5), tolterodina (CAS 124937-51-5, o CAS 124937-52-6 para el tartrato, vendido bajo el nombre Detrol), otilonio (por ejemplo, como el bromuro, CAS 26095-59-0, vendido bajo el nombre Spasmomen), cloruro de trospio (CAS 10405-02-4) y solifenacina (CAS 242478-37-1, o CAS 242478-38-2 para el succinato también conocido como YM-905 y vendido con el nombre Vesicare).

Compuestos adicionales se divulgan en los documentos WO 2005/037280, WO 2005/046586 y WO 2005/104745. Las presentes combinaciones incluyen, pero no se limitan a:

- 10 Yoduro de (3-endo)-3-(2,2-di-2-tieniletetil)-8,8-dimetil-8-azoniabicyclo[3.2.1]octano;  
 Bromuro de (3-endo)-3-(2-ciano-2,2-difeniletetil)-8,8-dimetil-8-azoniabicyclo[3.2.1]octano;  
 Bromuro de 4-[hidroxi(difenil)metil]-1-{2-[(fenilmetil)oxi]etil}-1-azoniabicyclo[2.2.2]octano; y  
 Bromuro de (1R,5S)-3-(2-ciano-2,2-difeniletetil)-8-metil-8-{2-[(fenilmetil)oxi]etil}-8-azoniabicyclo[3.2.1]octano.

15 Otros agentes anticolinérgicos incluyen compuestos que se divulgan en la solicitud de patente de EE.UU. 60/487981. Estos incluyen, por ejemplo:

- Yoduro de (endo)-3-(2-metoxi-2,2-di-tiofen-2-il-etil)-8,8-dimetil-8-azonia-bicyclo[3.2.1]octano;  
 3-((endo)-8-metil-8-aza-bicyclo[3.2.1]oct-3-il)-2,2-difenil-propionitrilo;  
 (endo)-8-metil-3-(2,2,2-trifenil-etil)-8-aza-bicyclo[3.2.1]octano;  
 3-((endo)-8-metil-8-aza-bicyclo[3.2.1]oct-3-il)-2,2-difenil-propionamida;

- 20 ácido 3-((endo)-8-metil-8-aza-bicyclo[3.2.1]oct-3-il)-2,2-difenil-propiónico;  
 yoduro de (endo)-3-(2-ciano-2,2-difenil-etil)-8,8-dimetil-8-azonia-bicyclo[3.2.1]octano;  
 bromuro de (endo)-3-(2-ciano-2,2-difenil-etil)-8,8-dimetil-8-azonia-bicyclo[3.2.1]octano;  
 3-((endo)-8-metil-8-aza-bicyclo[3.2.1]oct-3-il)-2,2-difenil-propan-1-ol;  
 N-bencil-3-((endo)-8-metil-8-aza-bicyclo[3.2.1]oct-3-il)-2,2-difenil-propionamida;

- 25 yoduro de (endo)-3-(2-carbamoil-2,2-difenil-etil)-8,8-dimetil-8-azonia-bicyclo[3.2.1]octano;  
 1-bencil-3-[3-((endo)-8-metil-8-aza-bicyclo[3.2.1]oct-3-il)-2,2-difenil-propil]-urea;  
 1-etil-3-[3-((endo)-8-metil-8-aza-bicyclo[3.2.1]oct-3-il)-2,2-difenil-propil]-urea;  
 N-[3-((endo)-8-metil-8-aza-bicyclo[3.2.1]oct-3-il)-2,2-difenil-propil]-acetamida;  
 N-[3-((endo)-8-metil-8-aza-bicyclo[3.2.1]oct-3-il)-2,2-difenil-propil]-benzamida;

- 30 3-((endo)-8-metil-8-aza-bicyclo[3.2.1]oct-3-il)-2,2-di-tiofen-2-il-propionitrilo;  
 yoduro de (endo)-3-(2-ciano-2,2-di-tiofen-2-il-etil)-8,8-dimetil-8-azonia-bicyclo[3.2.1]octano;  
 N-[3-((endo)-8-metil-8-aza-bicyclo[3.2.1]oct-3-il)-2,2-difenil-propil]-bencensulfonamida;  
 [3-((endo)-8-metil-8-aza-bicyclo[3.2.1]oct-3-il)-2,2-difenil-propil]-urea;  
 N-[3-((endo)-8-metil-8-aza-bicyclo[3.2.1]oct-3-il)-2,2-difenil-propil]-metanesulfonamida; y/o

- 35 bromuro de (endo)-3-{2,2-difenil-3-[(1-fenil-metanoil)-amino]-propil}-8,8-dimetil-8-azonia-bicyclo[3.2.1]octano.

Compuestos adicionales incluyen:

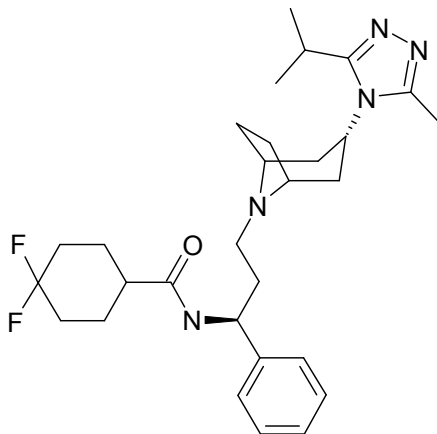
- yoduro de (endo)-3-(2-metoxi-2,2-di-tiofen-2-il-etil)-8,8-dimetil-8-azonia-bicyclo[3.2.1]octano;  
 yoduro de (endo)-3-(2-ciano-2,2-difenil-etil)-8,8-dimetil-8-azonia-bicyclo[3.2.1]octano;  
 bromuro de (endo)-3-(2-ciano-2,2-difenil-etil)-8,8-dimetil-8-azonia-bicyclo[3.2.1]octano;  
 40 yoduro de (endo)-3-(2-carbamoil-2,2-difenil-etil)-8,8-dimetil-8-azonia-bicyclo[3.2.1]octano;

yoduro de (endo)-3-(2-ciano-2,2-di-tiofen-2-il-etil)-8,8-dimetil-8-azonia-biciclo[3.2.1]octano; y/o

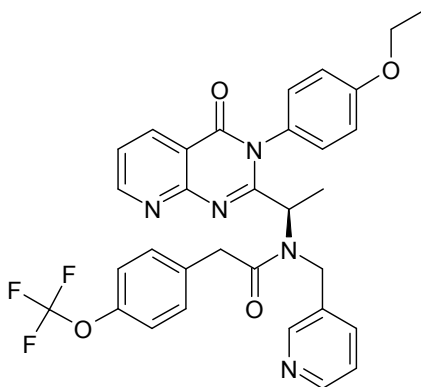
bromuro de (endo)-3-{2,2-difenil-3-[(1-fenil-metanoil)-amino]-propil}-8,8-dimetil-8-azonia-biciclo[3.2.1]octano.

En una realización, la invención provee una combinación que comprende el presente compuesto junto con un antagonista de H1. Ejemplos de antagonistas de H1 incluyen, sin limitación, amexanox, astemizol, azatadina, azelastina, acrivastina, bromfeniramina, cetirizina, levocetirizina, efletirizina, clorfeniramina, clemastina, ciclizina, carebastina, ciproheptadina, carbinoxamina, descarboetoxiloratadina, doxilamina, dimetindeno, ebastina, epinastina, efletirizina, fexofenadina, hidroxizina, ketotifen, loratadina, levocabastina, mizolastina, mequitazina, mianserina, noberastina, meclizina, norastemizol, olopatadina, picumast, pirlamina, prometazina, terfenadina, tripeleminamina, temelastina, trimeprazina y triprolidina, particularmente cetirizina, levocetirizina, efletirizina y fexofenadina. En una realización adicional, la invención provee una combinación que comprende el presente compuesto junto con un antagonista de H3 (y/o agonistas inversos). Ejemplos de antagonistas de H3 incluyen, por ejemplo, aquellos compuestos descritos en WO2004/035556 y en WO2006/045416. Otros antagonistas de receptor de histamina que se pueden usar en combinación con los compuestos de la presente invención incluyen antagonistas (y/o agonistas inversos) del receptor de H4, por ejemplo, los compuestos descritos en Jablonowski et al., J. Med. Chem. 46:3957-3960 (2003).

En una realización, la invención provee una combinación que comprende el presente compuesto junto con un antagonista de receptor de CCR5, tal como 4,4-difluoro-N-((1S)-3-{3-[3-metil-5-(1-metiletil)-4H-1,2,4-triazol-4-il]-8-azabicyclo[3.2.1]oct-8-il}-1-fenilpropil)ciclohexancarboxamida:



En una realización, la invención provee una combinación que comprende el presente compuesto junto con un antagonista de receptor de CXCR3 tal como N-((1R)-1-{3-[4-(etiloxi)fenil]-4-oxo-3,4-dihidropirido[2,3-d]pirimidin-2-il}etil)-N-(3-piridinilmetil)-2-{4-[(trifluorometil)oxi]fenil}acetamida:



La invención por lo tanto provee, en un aspecto adicional, una combinación que comprende el presente compuesto junto con un inhibidor de PDE4.

La invención por lo tanto provee, en un aspecto adicional, una combinación que comprende el presente compuesto junto con un agonista de  $\beta_2$ -adrenoreceptor.

La invención por lo tanto provee, en un aspecto adicional, una combinación que comprende el presente compuesto

junto con un corticosteroide.

La invención por lo tanto provee, en un aspecto adicional, una combinación que comprende el presente compuesto junto con un agonista de GR no esteroideo.

5 La invención por lo tanto provee, en un aspecto adicional, una combinación que comprende el presente compuesto junto con un agente anticolinérgico.

La invención por lo tanto provee, en un aspecto adicional, una combinación que comprende el presente compuesto junto con un antihistamínico.

La invención por lo tanto provee, en un aspecto adicional, una combinación que comprende el presente compuesto junto con un inhibidor de PDE4 y un agonista de  $\beta_2$ -adrenoreceptor.

10 La invención por lo tanto provee, en un aspecto adicional, una combinación que comprende el presente compuesto junto con un anticolinérgico y un inhibidor de PDE4.

15 Las combinaciones referidas anteriormente convenientemente se pueden presentar para usarse en forma de una formulación farmacéutica y por lo tanto formulaciones farmacéuticas que comprenden una combinación como se definió antes junto con un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable representan un aspecto adicional de la invención.

Los compuestos individuales de dichas combinaciones se pueden administrar ya sea secuencialmente o simultáneamente en formulaciones farmacéuticas separadas o combinadas. En una realización, los compuestos individuales se administrarán simultáneamente en una formulación farmacéutica combinada. Las dosis apropiadas de agentes terapéuticos conocidos lo apreciarán fácilmente los expertos en la técnica.

20 La invención por lo tanto provee, en un aspecto adicional, una composición farmacéutica que comprende una combinación del presente compuesto junto con otro agente terapéuticamente activo.

La invención por lo tanto provee, en un aspecto adicional, una composición farmacéutica que comprende una combinación del presente compuesto junto con un inhibidor de PDE4.

25 La invención por lo tanto provee, en un aspecto adicional, una composición farmacéutica que comprende una combinación del presente compuesto junto con un agonista de  $\beta_2$ -adrenoreceptor.

La invención por lo tanto provee, en un aspecto adicional, una composición farmacéutica que comprende una combinación del presente compuesto junto con un corticosteroide.

La invención por lo tanto provee, en un aspecto adicional, una composición farmacéutica que comprende una combinación del presente compuesto junto con un agonista de GR no esteroideo.

30 La invención por lo tanto provee, en un aspecto adicional, una composición farmacéutica que comprende una combinación del presente compuesto junto con un anticolinérgico.

La invención por lo tanto provee, en un aspecto adicional, una composición farmacéutica que comprende una combinación del presente compuesto junto con un antihistamínico.

35 La invención por lo tanto provee, en un aspecto adicional, una composición farmacéutica que comprende una combinación del presente compuesto junto con un agonista de receptor de CXCR3.

La invención por lo tanto provee, en un aspecto adicional, una combinación farmacéutica de la invención junto con un agonista de receptor de CCR5.

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

#### 40 **Ejemplos biológicos**

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

Prueba de unión a receptor:

45 [<sup>125</sup>I] IL-8 (recombinante humana) se obtiene de GE Healthcare, con actividad específica 2000 Ci/mmol. Todos los compuestos químicos son de grado analítico. Niveles elevados de receptores de CXCR1 humano recombinante (IL-8 tipo  $\alpha$ ) y CXCR2 (IL-8 tipo  $\beta$ ) se expresan individualmente en células de Ovario de Hámster Chino (CHO) no adherente como se describieron anteriormente (Holmes, *et al.*, Science, 1991, 253, 1278). Las membranas se preparan de conformidad con un protocolo anteriormente descrito, Haour, *et al.*, J. Biol. Chem., 249 pp 2195-2205 (1974)), excepto que el regulador de pH de homogenización es modificado a 40 mM de Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM de

MgSO<sub>4</sub>, 0,5 mM de EGTA ácido (etileno-glicol-bis(2-aminoetiléter)-N,N,N',N'tetra-acético), 1 mM de PMSF (fluoruro de  $\alpha$ -toluensulfonilo), 2,5 mg/l de leupeptina y 0,1 mg/ml de aprotinina. Las células son homogeneizadas y centrifugadas a 2.000 rpm durante 10 min. El sobrenadante es centrifugado a 100.000 x g durante 1 hora. El sobrenadante es desechado y las membranas almacenadas a -80°C. La concentración de proteína de membrana se determina usando reactivo BioRad de conformidad con el protocolo de los fabricantes usando albúmina de suero de bovino (BSA) como un estándar.

Toda la unión a IL-8 se conduce usando pruebas de proximidad por escintilación (SPA), usando esferas de aglutinina de germen de trigo en un formato de placa de 96 pozos. Las membranas CHO-CXCR1 o CHO-CXCR2 son preincubadas con las esferas en el regulador de pH de unión durante 30 min a 4°C El regulador de pH contiene 20 mM de regulador de pH Bis-Trispropano, pH 8,0, que contenía 1 mM de MgSO<sub>4</sub>, 0,1 mM de EDTA y 25 mM de NaCl. Los compuestos son diluidos en DMSO a 20X la dilución final (concentración de compuesto final entre 1 nM y 30 uM y concentración de DMSO final de 5%). La prueba se realiza en placas de 96 pozos (optiplate 96, Packard) a temperatura ambiente, en 0,1 ml de regulador de pH de unión con membranas y 0,04% de CHAPS dimetilamonio]-1-propansulfonato) de (3-[(3-colamidopropilo), 0,0025% de BSA y 0,23 nM de [<sup>125</sup>I] IL-8. Las placas se agitan sobre una plataforma durante 1 hora, al final de la incubación las placas se hacen girar a 2.000 rpm durante 5 min. y se cuentan en un contador Top Count. El receptor de IL-8 R $\alpha$  recombinante, □CXCR1□ o tipo 1, también se refiere en el presente documento como el receptor no permisivo y el receptor de IL-8 R $\beta$  recombinante, □□CXCR2 o tipo II, se refiere como el receptor permisivo.

Un compuesto se considera activo en esta prueba si presenta un valor de CI<sub>50</sub> de < 30 uM. Se espera que el presente compuesto pruebe ser activo a un valor de CI<sub>50</sub> de aproximadamente 13 nM en la presente prueba.

Prueba de quimiotaxis:

Se realiza una prueba de quimiotaxis de neutrófilos. Se aíslan neutrófilos humanos primarios de sangre entera periférica usando centrifugación por gradientes discontinua de percolación, sedimentación de dextrano y lisis hipotónica. Los quimioatrayentes IL-8 (CXCL8) o GRO- $\alpha$  (CXCL1) se colocan en la cámara inferior de una cámara de 96 multi-pozos (ChemoTx System, Neuro Probe, Gaithersburg, MD). La concentración de agonista usada es una concentración de CE80. Las dos cámaras están separadas por una membrana de 5 um de policarbonato. Un compuesto probado es preincubado con las células antes de colocarse en la parte superior del filtro. La quimiotaxis se deja proceder durante 45 minutos en una incubadora humidificada a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Al final del período de incubación, la membrana es removida y las células que han migrado en la cámara inferior son transferidas a una placa de 96 pozos. Estas células se miden usando una prueba de viabilidad de células luminescentes (Celltiter-Glo, Promega, Madison, WI). Cada muestra se prueba por duplicado y cada compuesto se repite por lo menos tres veces. Las células de control positivo son células sin compuesto añadido y representan la respuesta quimiotáctica máxima. El control negativo (no estimulado) es sin quimiocina añadida a la cámara inferior. La diferencia entre el control positivo y el control negativo representa la actividad quimiotáctica de las células.

Un compuesto se considera activo si presenta un valor de CI<sub>50</sub> de <5 uM.

Prueba de sangre entera humana con CD11b:

Un compuesto se prueba para su capacidad para inhibir la expresión inducida por GRO $\alpha$  de la integrina CD11b sobre neutrófilos en sangre entera humana.

Se extrae sangre (9 ml) usando una línea de mariposa y una jeringa de 10 ml que contiene 0,2 ml de heparina de sodio de trabajo. La sangre se mantiene a 37°C hasta colocarse sobre hielo en el paso 5. Las soluciones de abastecimiento de compuesto se diluyen después a 12 veces la concentración final máxima, 120 uM. Diluciones seriales medio Log se realizaron después en vehículo. Soluciones de diez microlitros del compuesto o vehículo se añaden después a los tubos de polipropileno de 12x75 apropiados. Cien microlitros de sangre entera se añaden por tubo y se incuban durante 10 minutos, en un baño de agua a 37°C con agitación inicial (suave) y nuevamente a 5 minutos. El abastecimiento de GRO $\alpha$  se diluye 1:166.66 en 0,1% BSA-DPBS a concentración "12x" de 120 nM y 10 ul de la dilución de GRO $\alpha$  o se añade 0,1% de BSA-DPBS a los tubos apropiados por lo que la concentración final de GRO $\alpha$  es igual a 10 nM. Los tubos se incuban durante 10 min. a 37°C con agitación manual suave y nuevamente a 5 minutos. Las muestras se colocan sobre hielo y 250 ul de dilución de trabajo de CellFix enfriada con hielo se añade seguido por una incubación durante un minuto sobre hielo. 1,5 ml de tubos Eppendorf están listos durante la incubación de GRO $\alpha$  añadiendo los anticuerpos apropiados. Cada tubo recibe 10 ul de CD11b-FITC y 5 ul de CD16-PE, excepto por el control de isotipo que recibe 10 ul de IgG2a-FITC en lugar de CD11b. La adición de 50 ul de la sangre fijada de cada tubo se añade al tubo de Eppendorf apropiado. Las muestras se dejan incubar después durante 20 min a 4°C en la oscuridad. La adición de las mezclas de sangre/anticuerpo a 500 ul de DPBS frío se añade al tubo de poliestireno de 12x75 apropiadamente marcado. La mezcla resultante se mantiene sobre hielo. Se añade abastecimiento de LDS (10 ul) y la mezcla se incuba durante 10 min a 4°C antes del análisis de flujo. Las muestras se mantienen en un ambiente oscuro. La adición de LDS es escalonada a medida que las muestras son recolectadas en el citómetro por lo que todas las muestras se realizan ~10-20 minutos después de la adición de LDS.

El caudal del medio se usa para recolección de flujo y el umbral de FL3 se incrementa para eliminar glóbulos rojos del análisis usando la señal de LDS. La compensación de color se fija apropiadamente usando muestras no marcadas y muestras de un color para sustraer LDS derramado en PE y el PE derramado en FITC y FITC en PE. Para el citómetro BD LSR, LDS=FL3, PE=FL2, FITC=FL1. Un mínimo de 2000-3000 eventos que satisfacen la compuerta de granulocitos por SSC vs. FSC y son CD16 positivos por la señal de FL2 son recolectados.

Un compuesto se considera activo en esta prueba si presenta un valor de  $CI_{50}$  de  $<5\mu M$ .

Movilización de calcio en células CHO-K1 que expresan establemente CXCR2 y  $G\alpha_{16}$ :

Células CHO-K1 que expresan establemente CXCR2 y  $G\alpha_{16}$  se hacen crecer a 80% de confluencia en DMEM/F12 (HAM's)1:1, con 10% de FCS (inactivado con calor), con 2 mM de L-glutamina, w/ 0,4 mg/ml de G418 mientras se mantiene a 37°C en una incubadora con 5% de  $CO_2$ . Veinticuatro horas antes de la prueba, las células son cosechadas y colocadas en placas, 40.000 células por pozo, en una placa de fondo claro, pared negra de 96 pozos (Packard View) y se regresaron a la incubadora con  $CO_2$ . El día de la prueba, los compuestos se diluyen en serie en 100% de DMSO a 300X la concentración de prueba deseada. El medio de crecimiento es aspirado de células y reemplazado por 100  $\mu l$  de media de carga (EMEM con sales de Earl con L-Glutamina, 0,1% de BSA, (Bovuminar Cohen Fraction V de Seriologicals Corp.), 4  $\mu M$  de colorante indicador fluorescente de éster fluo-4-acetoximetílico (Fluo-4 AM, de Molecular Probes), y 2,5 mM de probenecid) y se incuba durante 1 hora a 37°C en incubadora con  $CO_2$ . El medio de carga es aspirado y reemplazado con 100  $\mu l$  de EMEM con sales de Earl con L-Glutamina, 0,1% de gelatina, y 2,5 mM de probenecid y se incuba durante 10 min adicionales. El compuesto diluido en serie (3  $\mu l$ ) en DMSO a 300X es transferido a una placa de 96 pozos que contiene 297 micro litros de KRH (120 mM de NaCl, 4,6 mM de KCl, 1,03 mM de  $KH_2PO_4$ , 25 mM de  $NaHCO_3$ , 1,0 mM de  $CaCl_2$ , 1,1 mM de  $MgCl_2$ , 11 mM de glucosa, 20 mM de HEPES (pH 7,4)) con 2,5 mM de probenecid y 0,1% de gelatina (compuesto ahora a 3X). El medio es aspirado de células, y las células se lavan 3 veces con KRH con 2,5 mM de probenecid, con 0,1% de gelatina. KRH (100  $\mu l$ ) con 2,5 mM de probenecid con 0,1% de gelatina se añade a los pozos, después 50  $\mu l$  de 3X compuesto en KRH con 2,5 mM de probenecid y 0,1% de gelatina se añade a los pozos (compuesto ahora a 1X) y se incuba a 37°C en una incubadora con  $CO_2$  durante 10 min. Las placas se colocan sobre FLIPR (lector de placas de formación de imagen fluorométrica, Molecular Devices, Sunnyvale CA) para análisis como se describió anteriormente (Sarau et al., 1999). El por ciento de IL-8 humana máxima indujo inmovilización de  $Ca^{2+}$  inducida por 1,0 nM de IL-8, una conc.  $CE_{80}$  para CXCR2, se determina para cada concentración de compuesto y la  $CI_{50}$  calculada como la concentración de compuesto de prueba que inhibe 50% de la respuesta máxima inducida por 1,0 nM de IL-8. Un compuesto se considera activo en esta prueba si presenta un valor de  $CI_{50}$  de  $<10\mu M$ .

Estimulación de CD11b en neutrófilos después de dosis oral a ratas

Ratas Lewis (250-300 g) se dosificaron oralmente con el presente compuesto o vehículo y una hora más tarde se sacrificaron por asfixia con  $CO_2$ . Sangre entera de rata, 3 ml, se extrajo mediante punción cardiaca en una jeringa que contiene 100  $\mu l$  de 0,25 M de EDTA (GIBCO, Grand Island, NY). Abastecimiento de CXCL2 de rata (PeproTech, Rocky Hill, NJ) se hizo por reconstitución en solución de Krebs/0,1% de BSA (KBSA) a 10  $\mu M$ . El abastecimiento se diluyó a "11x" la concentración máxima usada en DPBS (GIBCO) y se diluyó en serie en vehículo KBSA/DPBS. Diez  $\mu l$  de concentración apropiada del presente compuesto (1,2 – 100 nM) o vehículo se añadió a tubos de polipropileno de 12x75 mm seguido por 100  $\mu l$  de sangre entera. Los tubos se incubaron durante 30 minutos en un baño de 37°C, con agitación manual suave cada 10 minutos. Las muestras se colocaron después sobre hielo durante 10 minutos seguido por la adición de 10  $\mu l$  de CD11b-FITC anti-rata o control de isotipo de IgG2a de ratón marcado con FITC (ambos Antigenix America, Huntington Station, NY) y se incubó durante 30 minutos sobre hielo. Solución de lisis de FACS (Becton Dickinson, San Jose, CA), 1 ml de 1X, se añadió con acción de remolino vigorosa inmediata, seguido por acción de remolino adicional después de que la solución se añadió a la última muestra. Las muestras se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente y los leucocitos se comprimieron a  $\sim 300 \times g$  y se lavaron con DPBS. Las células se resuspendieron en 650  $\mu l$  de 1% de paraformaldehído. La solución de lisis de FACS no lisa por completo los glóbulos rojos de rata. Por lo tanto, para análisis citométrico de flujo, 3,5  $\mu l$  de una solución de etanol de 1,67 mg/ml (super-saturada; clarificada por centrifugación) de LDS-751 (Exciton, Dayton, OH) se añadió a cada muestra dentro de 1-2 minutos de análisis de flujo para dejar salir cualesquiera glóbulos rojos restantes. Los datos de la muestra se recolectaron usando software CellQuest y un citómetro de flujo LSR (Becton-Dickinson), en un caso de velocidad de flujo baja, al incrementar el umbral de FL3 para eliminar los glóbulos rojos LDS-751 negativos y después impidiendo el paso de la población de neutrófilos en la gráfica de diseminación hacia los lados *versus* diseminación hacia adelante. FL1 (fluorescencia de FITC verde, directamente en relación con el contenido de CD11b) de esta población después se midió como fluorescencia de canal promedio por análisis con software CellQuest.

En la presente prueba, el presente compuesto probó ser activo para inhibición de la expresión de CD11b por neutrófilos de sangre entera siguiendo la dosificación oral a ratas Lewis a 10 mg/kg. El presente compuesto significativamente desplazó la  $CE_{50}$  de la curva de concentración-respuesta de CXCL2 de 4,7 nM (1,9 – 7,4; 95% C.I.) en ratas tratadas con vehículo a 12,3 nM (10,0 – 14,7), ( $p < 0,001$ ,  $n = 6$  por grupo).

La descripción anterior divulga por completo la invención incluyendo realizaciones preferentes de la misma. Modificaciones y mejoras de las realizaciones específicamente divulgadas en el presente documento están dentro

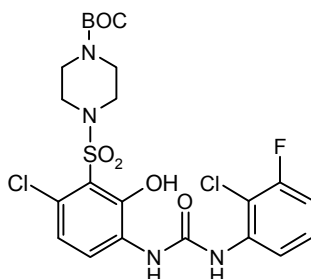
del alcance de las siguientes reivindicaciones. Sin elaboración adicional, se cree que un experto en la técnica, usando la descripción anterior, puede utilizar la presente invención en su extensión más completa. Por lo tanto, los ejemplos en el presente documento se deben considerar como simplemente ilustrativos y no una limitación del ámbito de la presente invención de manera alguna. Las realizaciones de la invención en las cuales se reivindica una propiedad o privilegio exclusivo se definen como sigue.

5



## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que es p-toluensulfonato de N-[4-cloro-2-hidroxi-3-(piperazina-1-sulfonil)fenil]-N'-(2-cloro-3-fluorofenil)urea.
- 5 2. Una composición farmacéutica que comprende p-toluensulfonato de N-[4-cloro-2-hidroxi-3-(piperazina-1-sulfonil)fenil]-N'-(2-cloro-3-fluorofenil)urea y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.
3. El uso de p-toluensulfonato de N-[4-cloro-2-hidroxi-3-(piperazina-1-sulfonil)fenil]-N'-(2-cloro-3-fluorofenil)urea en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad mediada por quimiocina.
- 10 4. El uso de p-toluensulfonato de N-[4-cloro-2-hidroxi-3-(piperazina-1-sulfonil)fenil]-N'-(2-cloro-3-fluorofenil)urea en la fabricación de un medicamento de acuerdo con la reivindicación 3 para el tratamiento de asma, de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica o del síndrome de sufrimiento disneico en adultos.
5. El uso de p-toluensulfonato de N-[4-cloro-2-hidroxi-3-(piperazina-1-sulfonil)fenil]-N'-(2-cloro-3-fluorofenil)urea en la fabricación de un medicamento de acuerdo con la reivindicación 4 para el tratamiento de una enfermedad pulmonar obstructiva crónica.
- 15 6. Una composición farmacéutica que comprende p-toluensulfonato de N-[4-cloro-2-hidroxi-3-(piperazina-1-sulfonil)fenil]-N'-(2-cloro-3-fluorofenil)urea y uno o más ingredientes terapéuticos adicionales.
7. La composición de acuerdo con la reivindicación 6, en la que el ingrediente terapéutico adicional es un antagonista de receptor de CXCR3 o un antagonista de receptor de CCR5.
8. Un procedimiento de preparación de p-toluensulfonato de N-[4-cloro-2-hidroxi-3-(4-metil-piperazina-1-sulfonil)fenil]-N'-(2-cloro-3-fluorofenil)urea que comprende los pasos de:
  - 20 a) combinar acetonitrilo y ácido p-toluensulfónico monohidratado;
  - b) añadir el producto del paso a) a



disuelto en tetrahidrofurano; y c) tratar el producto obtenido en el paso b) con acetonitrilo y desproteger el producto del paso b.

- 25 9. Un compuesto que es p-toluensulfonato de N-[4-cloro-2-hidroxi-3-(piperazina-1-sulfonil)fenil]-N'-(2-cloro-3-fluorofenil)urea para usarse como una sustancia terapéuticamente activa.
10. Un compuesto que es p-toluensulfonato de N-[4-cloro-2-hidroxi-3-(piperazina-1-sulfonil)fenil]-N'-(2-cloro-3-fluorofenil)urea para su uso en el tratamiento de una enfermedad mediada por quimiocina.
- 30 11. Un compuesto que es p-toluensulfonato de N-[4-cloro-2-hidroxi-3-(piperazina-1-sulfonil)fenil]-N'-(2-cloro-3-fluorofenil)urea para su uso de acuerdo con la reivindicación 10 en el tratamiento del asma, de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica o síndrome disneico en adultos.
12. Un compuesto que es p-toluensulfonato de N-[4-cloro-2-hidroxi-3-(piperazina-1-sulfonil)fenil]-N'-(2-cloro-3-fluorofenil)urea para su uso de acuerdo con la reivindicación 11 en el tratamiento de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica.