

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 539 518**

51 Int. Cl.:

C07D 239/42 (2006.01)

A61K 31/505 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.04.2008 E 08736527 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.03.2015 EP 2137163**

54 Título: **Inhibidores de proteínas quinasas**

30 Prioridad:

24.04.2007 WO PCT/EP2007/003602

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

01.07.2015

73 Titular/es:

**ASTRAZENECA AB (100.0%)
43 183 Mölndal, SE**

72 Inventor/es:

**WABNITZ, PHILIPP;
SCHAUERTE, HEIKE;
ALLGEIER, HANS;
AUGUSTIN, MARTIN;
ZEITLMANN, LUTZ;
PLEISS, MICHAEL A.;
STUMM, GABRIELE y
MUELLER, ANKE**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 539 518 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

Inhibidores de proteínas quinasas

5 **Antecedentes de la invención**

Las proteínas quinasas dependientes de ciclinas ("CDK") constituyen una familia de enzimas bien conservadas que desempeñan múltiples papeles en la célula, tal como la regulación del ciclo celular y control transcripcional (Science 1996, Vol. 274:1643-1677; Ann. Rev.Cell Dev. Biol., 1997, 13:261-291).

10 Algunos miembros de la familia, tal como CDK1, 2, 3, 4 y 6 regulan la transición entre diferentes fases del ciclo celular, tal como la progresión de un estadio de quiescencia en G1 (el hueco entre la mitosis y el inicio de la replicación de ADN para una nueva ronda de división celular) a S (el periodo de síntesis activa de ADN), o la progresión de fase G2 a M, en la que se produce mitosis activa y división celular. Otros miembros de esta familia de proteínas, incluyendo CDK7, 8 y 9 regulan puntos clave en el ciclo de transcripción, mientras que CDK5 desempeña un papel en la función celular neuronal y secretora.

20 Los complejos de CDK se forman mediante la asociación de una subunidad reguladora de ciclina (por ejemplo, ciclina A, B1, B2, D1, D2, D3, y E) y una subunidad quinasa catalítica (por ejemplo cdc2 (CDK1), CDK2, CDK4, CDK5 y CDK6). Como implica el nombre, las CDK muestran una dependencia absoluta en la subunidad de ciclina para fosforilar sus sustratos diana, y diferentes pares quinasa/ciclina funcionan para regular la progresión a través de partes específicas del ciclo celular.

25 CDK9 junto con sus ciclinas asociadas (ciclina T1, T2a, T2b o K) constituye el componente catalítico del complejo positivo de proteína quinasa P-TEFb que funciona durante la fase de elongación de la transcripción fosforilando el dominio carboxilo terminal (CTD) de la mayor subunidad de la ARN polimerasa II. P-TEFb actúa junto con el factor de transcripción positivo NfκB así como factores de transcripción negativos, superando de esta manera un bloqueo de la elongación transcripcional (Liu y Herrmann 2005).

30 Se sabe que la disregulación del ciclo celular, que es una de las características capitales de las células neoplásicas, está estrechamente asociada con la alteración genética y disregulación de las CDK y sus reguladores, lo que sugiere que los inhibidores de CDK pueden ser útiles como sustancias terapéuticas para enfermedades proliferativas, tal como cáncer. Por tanto, los inhibidores de molécula pequeña que se dirigen a CDK han sido el foco de interés extenso en la terapia contra el cáncer (Current Opinion in Pharmacology, 2003(3): 362-370). La capacidad de inhibir la progresión del ciclo celular sugiere un papel general para los inhibidores de molécula pequeña de las CDK como sustancias terapéuticas para enfermedades proliferativas, tal como cáncer. Mientras que la inhibición de las CDK relacionadas con el ciclo celular es claramente relevante en aplicaciones de oncología, este puede no ser el caso para la inhibición de las CDK que regulan la ARN polimerasa. Recientemente, la inhibición de la función de CDK9/ciclina T se ha conectado a la prevención de la replicación del VIH y por tanto el descubrimiento de nueva biología de CDK continúa abierto a nuevas indicaciones terapéuticas para inhibidores de CDK (Sausville, E.A. Trends Molec. Med. 2002, 8, S32-S37), tal como, por ejemplo, infecciones víricas (documento WO 02/100401). Los inhibidores de CDK también se podrían concebiblemente usar para tratar otras afecciones tal como enfermedades inmunológicas y enfermedades neurodegenerativas, entre otras.

45 Se han descrito más de 50 inhibidores de CDK farmacológicos, algunos de los cuales tienen potente actividad antitumoral (Current Opinion in Pharmacology, 2003(3): 362-370). Se puede encontrar una revisión completa sobre los inhibidores conocidos de CDK en Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2003, 42(19):2122-2138.

50 El uso de derivados de 2-anilino-4-fenilpirimidina como inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas para el tratamiento de, por ejemplo, cáncer se ha descrito en el documento WO 2005/012262. Además, se han descrito derivados de 2-piridinilamino-4-tiazolil-pirimidina para el tratamiento de cáncer, etc., en el documento WO 2005/012298. Se conoce el uso de 4,5-dihidro-tiazolo, oxazolo e imidazolo[4,5-h]quinazolin-8-ilaminas como inhibidores de proteínas quinasas del documento WO 2005/005438. Además, se han divulgado derivados de indolinona y derivados de indurribina, que son útiles como inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas en los documentos WO 02/081445 y WO 02/074742. Además, se han descrito inhibidores de CDK para varias aplicaciones terapéuticas en el documento WO2005/026129.

60 Los inhibidores conocidos de CDK se pueden clasificar según su capacidad para inhibir CDK en general o según su selectividad para una CDK específica. Flavopiridol, por ejemplo, actúa como una "pan" antagonista de CDK y no es particularmente selectivo para una CDK específica (Current Opinion in Pharmacology, 2003(3): 362-370). Se sabe que los inhibidores de CDK basados en purina, tal como olomucina, roscovitina, purvanoles y CGP74514A muestran una mayor selectividad para las CDK 1, 2 y 5, pero no muestran actividad inhibitoria contra las CDK 4 y 6 (Current Opinion in Pharmacology, 2003(3): 362-370). Además, se ha demostrado que los inhibidores de CDK basados en purina tal como roscovitina pueden ejercer efectos antiapoptóticos en el sistema nervioso (Pharmacol Ther 2002, 93:135-143) o prevenir la muerte neuronal en enfermedades neurodegenerativas, tal como la

65

enfermedad de Alzheimer (Biochem Biophys Res Commun 2002 (297):1154-1158; Trends Pharmacol Sci 2002 (23):417-425).

5 Dado el tremendo potencial de dirigirse a las CDK para la terapia de afecciones tal como enfermedades proliferativas, inmunológicas, infecciosas, cardiovasculares y neurodegenerativas, el desarrollo de moléculas pequeñas como inhibidores selectivos de CDK particulares constituye un fin deseable.

10 La presente invención proporciona inhibidores de molécula pequeña novedosos de quinasas dependientes de ciclinas. Preferiblemente, dichos inhibidores de molécula pequeña muestran una potencia aumentada para inhibir una CDK particular, en particular CDK9. Dichos inhibidores de molécula pequeña pueden tener una utilidad terapéutica para el tratamiento de afecciones tales como enfermedades proliferativas, inmunológicas, neurodegenerativas, infecciosas y cardiovasculares. Además, se ha mostrado que sorprendentemente los inhibidores de molécula pequeña de la presente invención ejercen un efecto beneficioso en el tratamiento de enfermedades inflamatorias y de cualquier tipo de dolor.

15 Los tratamiento actuales para el dolor son solo parcialmente eficaces, y muchos también producen efectos secundarios debilitantes o peligrosos. Por ejemplo, muchos de los analgésicos tradicionales usados para tratar el dolor grave inducen efectos secundarios debilitantes tal como náusea, mareo, estreñimiento, hipoventilación, y disfunción cognitiva (Brower, 2000).

20 Aunque ya hay un amplio panel de medicamentos aprobados contra el dolor como analgésicos no narcóticos, analgésicos opiáceos, bloqueantes de canales de calcio, relajantes musculares, y corticoesteroides sistémicos disponibles, dichos tratamiento permanecen simplemente empíricos y, mientras que pueden aliviar los síntomas del dolor, no producen el alivio completo en la mayoría de los casos. Esto también se debe al hecho de que los mecanismos subyacentes al desarrollo de los diferentes tipos de dolor aún se entienden mal. Los investigadores están solo empezando a apreciar la complejidad y diversidad de los sistemas de señalización usados para transmitir impulsos nerviosos para cada tipo de dolor.

25 Generalmente, el dolor se define como una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada con daño tisular real o potencial, o se describe en términos de tal daño, según la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP, por sus siglas en inglés). Específicamente, el dolor se puede producir como dolor agudo o crónico.

30 El dolor agudo se produce durante breves periodos de tiempo, típicamente menos de 1 mes y está asociado con trastornos temporales. Es una respuesta natural del cuerpo para dejar que el huésped sea consciente de alteración fisiológica o bioquímica que podría producir daño adicional en un corto periodo de tiempo. Se siente cuando estímulos nocivos estimulan los nocirreceptores mecánicos y/o térmicos de alto umbral en terminaciones nerviosas periféricas y los potenciales de acción provocados en fibra aferentes ligeramente mielinizadas (A δ) y/o amielínicas (C) alcanzan un cerebro consciente. Dichos estímulos nocivos pueden estar proporcionados por lesión, cirugía, enfermedad, traumatismo o procedimientos médicos dolorosos. El dolor agudo habitualmente desaparece cuando la causa subyacente se ha tratado o ha curado. El dolor agudo no aliviado, sin embargo, puede producir problemas de dolor crónico que pueden producir estancias hospitalarias largas, rehospitalizaciones, visitas a clínicas ambulatorias y departamentos de urgencia, y costes sanitarios aumentados.

35 En contraste con el dolor agudo, el dolor crónico persiste mucho después de que la lesión inicial haya curado y con frecuencia se extiende a otras partes del cuerpo, con diversas consecuencias patológicas y psiquiátricas. El dolor somático crónico resulta de respuestas inflamatorias a traumatismo en tejidos periféricos (por ejemplo, compresión de nervios, procedimientos quirúrgicos, cáncer, o artritis), lo que produce la hipersensibilización de los nocirreceptores y respuestas de dolor ardiente intensas a estímulos normalmente no nocivos (hiperalgesia). El dolor crónico es continuo y recurrente y su intensidad variará de moderado a dolor incapacitante grave que puede reducir significativamente la calidad de vida.

40 El dolor crónico se trata actualmente con analgésicos convencionales tal como AINE (ibuprofeno, naproxeno), inhibidores de Cox-2 (Celecoxib, Valdecoxib, Rofecoxib) y opiatos (codeína, morfina, tebaina, noscapina). Para un número significativo de pacientes, sin embargo, estos fármacos proporcionan insuficiente alivio del dolor.

45 Otro subtipo de dolor, el dolor inflamatorio, se puede producir como dolor tanto agudo como crónico. Las lesiones resultantes de tejido y neuronas no deben pero pueden desarrollarse en efectos de dolor neuropático crónico de larga duración en sucesión a tales sucesos inflamatorios.

50 El dolor inflamatorio está mediado por estímulos nocivos como, por ejemplo, mediadores inflamatorios (por ejemplo, citoquinas, tal como TNF α , prostaglandinas, sustancia P, bradiquinina, purinas, histamina, y serotonina), que se liberan después de lesión tisular, enfermedad, o inflamación y otros estímulos nocivos (por ejemplo, estímulos térmicos, mecánicos o químicos). Además, las citoquinas y los factores de crecimiento pueden influir el fenotipo y función neuronal (Besson 1999). Estos mediadores son detectados por nocirreceptores (receptores sensoriales) que están distribuidos a lo largo de la periferia del tejido. Dichos nocirreceptores son sensibles a estímulos nocivos (por ejemplo, mecánicos, térmicos o químicos) que dañan el tejido si se prolongan (Koltzenburg 2000). Una clase

especial de los denominados nocirreceptores C representa una clase de nocirreceptores “silenciosos” que no responden a ningún nivel de estímulos mecánicos o térmicos pero se activan en presencia de inflamación solo.

5 Los planteamientos actuales para el tratamiento de dolor especialmente inflamatorio se dirigen a la inhibición de citoquinas (por ejemplo, IL1 β) y supresión de TNF α proinflamatorio. Los tratamientos anticitoquina/antiTNF α aprobados actuales se basan en anticuerpos quiméricos tal como Infliximab y Etanercept que reducen la circulación de TNF α en el torrente sanguíneo. TNF α es uno de los mediadores proinflamatorios más importantes que induce la síntesis de enzimas importantes tal como COX-2, MMP, iNOS, cPLA₂ y otras. Las principales desventajas de estos “productos biológicos”, sin embargo, residen en su potencial inmunogénico con pérdida asociada de eficacia y su cinética que produce una reducción más o menos digital de todo o nada de TNF α circulante. La última puede producir efectos secundarios inmunosupresores graves.

15 Una forma distinta de dolor crónico, el dolor neuropático (o neurogénico), surge como resultado de disfunción nerviosa periférica o central e incluye una variedad de afecciones que se diferencian en la etiología así como la localización. Generalmente, las causas del dolor neuropático son diversas, pero comparten el síntoma común de daño a los nervios periféricos o componentes de rutas centrales. Los factores causantes podrían ser metabólicos, víricos o lesión nerviosa mecánica. Se cree que el dolor neuropático se sostiene por procesos somatosensoriales anormales en el sistema nervioso periférico, el SNC o ambos. El dolor neuropático no está directamente conectado a la estimulación de los nocirreceptores, sino que en su lugar, se piensa que surge, por ejemplo, de la hipersensibilización de los receptores de glutamato en neuronas postsinápticas en la materia gris (asta dorsal) de la médula espinal.

20 El dolor neuropático se asocia con afecciones tales como degeneración nerviosa en diabetes y neuralgia posherpética (culebrilla). Los estados de dolor neuropático son consecuencia de un número de enfermedades y afecciones incluyendo diabetes, SIDA, esclerosis múltiple, muñón y dolor fantasma después de una amputación, neuropatía relacionada con cáncer, neuralgia posherpética, lesión nerviosa traumática, neuropatía isquémica, compresión nerviosa, ictus, lesión de la médula espinal.

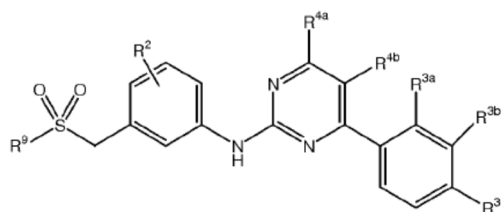
30 El tratamiento del dolor neuropático permanece un reto clínico principal, parcialmente debido a un entendimiento inadecuado de los mecanismos implicados en el desarrollo y mantenimiento del dolor neuropático. Muchos analgésicos existentes con ineficaces en tratar el dolor neuropático y la mayoría de los fármacos narcóticos y no narcóticos actuales no controlan el dolor. La práctica clínica actual incluye el uso de un número de clases de fármacos para el tratamiento del dolor neuropático, por ejemplo, anticonvulsivos, antidepresivos tricíclicos y anestésicos locales sistémicos. Sin embargo, el desenlace habitual de tal tratamiento es alivio del dolor parcial o insatisfactorio, y en algunos casos los efectos secundarios de estos fármacos superan su utilidad clínica. Se cree ampliamente que los analgésicos clásicos son poco eficaces o ineficaces en el tratamiento del dolor neuropático. Se han realizado pocos estudios clínicos sobre el uso de fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) u opiáceos en el tratamiento del dolor neuropático, pero en los que se han hecho, los resultados parecen indicar que los AINE son poco eficaces o ineficaces y los opiáceos solo funcionan a altas dosis. Una revisión que analiza los datos clínicos controlados para dolor neuropático periférico (PNP) (Pain, Noviembre, 1997 73(2), 123-39) describió que los AINE probablemente eran ineficaces como analgésicos para PNP y que no había datos a largo plazo que apoyaran la eficacia analgésica de ningún fármaco.

45 Los fármacos analgésicos disponibles con frecuencia producen insuficiente alivio del dolor. Aunque los antidepresivos tricíclicos y algunos fármacos antiepilépticos, por ejemplo gabapentina, lamotrigina y carbamacepina, son eficaces en algunos pacientes, permanece una gran necesidad sin cumplir para fármacos eficaces para el tratamiento de estas afecciones.

50 En conclusión, hay una gran necesidad no cumplida para métodos seguros y eficaces de tratamiento del dolor, en particular para dolor inflamatorio crónico y neuropático.

Compendio de la invención

55 La presente invención se dirige a inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas y a métodos y composiciones para tratar y/o prevenir cualquier tipo de dolor, trastornos inflamatorios, enfermedades inmunológicas, enfermedades proliferativas, enfermedades infecciosas, enfermedades cardiovasculares y enfermedades neurodegenerativas que comprenden: administrar una cantidad eficaz de al menos un inhibidor de una quinasa dependiente de ciclina (cdk, CDK) a un sujeto en necesidad de ello. El inhibidor se selecciona entre compuestos según la fórmula general I:



Fórmula Ia

en donde

5 R^9 es $-NR^5R^6$ o R^8

10 R^5 y R^6 independientemente entre si son hidrógeno, alquilo de C_{1-4} , hidroxi-alquilo de C_{1-4} o alqueno de C_{3-4} , cicloalquilo de C_{3-8} , cicloalquilo de C_{3-8} -alquilo de C_{1-4} o heterocicloalquilo de C_{4-7} -alquilo de C_{0-4} , arilo de C_{4-7} -alquilo de C_{1-4} , heteroarilo de C_{4-7} -alquilo de C_{0-4} o

en donde R^5 y R^6 junto con el átomo de N al que están unidos también pueden formar un heterocicloalquilo de 5 a 8 miembros,

15 en donde dicho cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo o alquilo está además opcionalmente sustituido por hasta 2 radicales seleccionados del grupo que consiste en halo, hidroxi, aminocarbonilo, alquilo de C_{1-4} , hidroxi-alquilo de C_{1-4} , alquilo de C_{1-4} -O-alquilo de C_{1-4} , alquilo de C_{1-4} -O- y $-NR^5R^6$;

20 R^8 es alquilo de C_{1-4} , hidroxi-alquilo de C_{2-4} o alqueno de C_{3-4} , cicloalquilo de C_{3-8} , cicloalquilo de C_{3-8} -alquilo de C_{1-4} o heterocicloalquilo de C_{4-7} -alquilo de C_{0-4} ;

25 en donde dicho cicloalquilo, heterocicloalquilo o alquilo está además opcionalmente sustituido por hasta 2 radicales seleccionados del grupo que consiste en halo, hidroxi, alquilo de C_{1-4} , hidroxi-alquilo de C_{1-4} , alquilo de C_{1-4} -O-alquilo de C_{1-4} , alquilo de C_{1-4} -O- y $-NR^5R^6$;

R^2 es uno o dos sustituyentes independientemente seleccionados de halógeno e hidrógeno;

R^{3a} representa hidrógeno, halo o alcoxi de C_{1-4} ;

30 R^{3b} representa hidrógeno;

R^{3c} representa hidrógeno o halógeno;

R^{4a} representa hidrógeno; y

35 R^{4b} representa hidrógeno o metilo;

o un compuesto seleccionado de los derivados N-óxidos, las sales farmacéuticamente aceptables y solvatos (por ejemplo, hidratos) de tales compuestos.

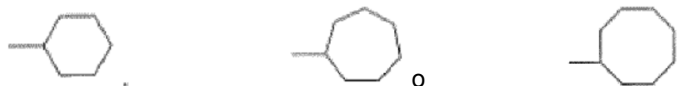
40 Como se divulga en el presente documento, el término "alquilo de C_{1-4} " se pretende que incluya hidrocarburos alifáticos saturados de cadena lineal o ramificada que tienen de 1 a 4 átomos de carbono, tal como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, sec-butilo, isobutilo, tert-butilo.

45 El término "alqueno inferior" se refiere a grupos alqueno de cadena lineal o ramificada que tienen de 2 a 6 átomos de carbono, tal como, por ejemplo, vinilo, alilo, but-2-enilo, but-3-enilo, o isopropenilo; el término "alqueno inferior" preferiblemente representa alilo, but-2-enilo o but-3-enilo.

Como se divulga en el presente documento, el término "halo" se pretende que incluya fluoro, cloro, bromo y yodo,

50 El término cicloalquilo de C_{3-8} indica los siguientes cicloalquilos:





El término arilo indica un sistema de anillos aromático mono o bicíclico de 6 a 10 miembros tal como fenilo, naftilo, 3-clorofenilo, 2,6-dibromofenilo, 2,4,6-tribromofenilo, 4,7-dicloronaftilo, y preferiblemente fenilo o naftilo.

- 5 El término heterocicloalquilo se pretende que incluya un sistema de anillos de 5 a 10 miembros mono o bicíclico, que contiene uno a tres heteroátomos independientemente seleccionados de oxígeno, azufre o nitrógeno y preferiblemente se selecciona del grupo que comprenden: aciridinilo, acetidinilo, pirrolidinilo, tetrahydrofuranilo, tetrahydrotiofenilo, piperidinilo, piperadicinilo, piperacinilo, tetrahydropiranilo, tetrahydrotiopiranilo o morfolinilo.
- 10 El término heterocicloalquilo comprende además todos los heteroarilos como se definen posteriormente, en donde todos los dobles enlaces de los heteroarilos correspondientes se sustituyen por enlaces sencillos.

El término heteroarilo indica un sistema de anillos parcial o completamente insaturado de 5 a 10 miembros mono o bicíclico, que contiene de uno a tres heteroátomos independientemente seleccionados de oxígeno, azufre o nitrógeno y preferiblemente se selecciona del grupo que consiste en:

15 Pirrolilo, furanilo, tiofenilo, tienilo, imidazolilo, pirazolilo, tiazolilo, oxazolilo, isotiazolilo, isoxazolilo, piridinilo, piridilo, pirimidinilo, pirimidilo, piracinilo, piracilo, piradicinilo, piradicilo, 3-metilpiridilo, benzotienilo, 4-etilbenzotienilo, 3,4-dietilfuranilo, pirrolilo, tetrahydroquinolilo, quinolilo, tetrahydroisoquinolinilo, isoquinolinilo, benzoimidazolilo, benzotiazolilo, benzooxazolilo, benzo [1, 3] dioxolilo, indolilo, benzofuranilo, benzotiofenilo, indazolilo o crom-2-onilo.

Se debe entender que el término heteroarilo también comprende sistemas de anillo parcialmente insaturados de 5 a 10 miembros mono o bicíclicos, en donde de uno hasta 4 dobles enlaces del sistema de anillos se sustituyen por un enlace sencillo y en donde el sistema de anillos contiene al menos un doble enlace.

25 Cuando se produce cualquier variable más de una vez en la fórmula I o en cualquier sustituyente, su definición en cada aparición es independiente de su definición en cada otra aparición. Por ejemplo, cuando un compuesto comprende más de un sustituyente R^5 y/o R^6 pueden ser iguales o diferentes.

30 En los compuestos de fórmula Ia:

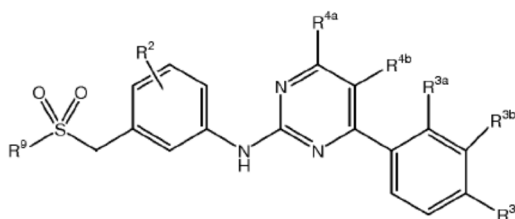
R^2 es preferiblemente hidrógeno.

35 Preferiblemente R^6 es hidrógeno o metilo y R^5 es etilo, 2-hidroxi-etilo, isopropilo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, n-propilo, t-butilo, 3-metoxi-propilo, 2-dimetilaminoetilo, 3-dimetilaminopropilo, piperidinilo y especialmente, 4-piperidinilo, piridinilo y especialmente piridin-3-ilo o piridin-4-ilo, pirrolidinilo y especialmente pirrolidin-3-ilo, tetrahydrofuranilo, y especialmente tetrahydrofuran-3-ilo, tetrahydro-furan-2-ilmetilo, 4-cloro-bencilo, tiofen-2-il-metilo, o R^5 y R^6 son ambos hidrógeno, metilo, etilo, o R^5 y R^6 junto con el átomo de N al que están unidos forman morfolino, 4-aminocarbonil-piperidina o acepano.

40 R^5 y R^6 más preferiblemente se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, metilo, ciclopropilo, 2-dimetilaminoetilo, 3-dimetilaminopropilo y 2-hidroxi-etilo. R^5 y R^6 son lo más preferiblemente hidrógeno.

45 R^8 es preferiblemente alquilo de C_{1-4} o hidroxi-alquilo de C_{2-4} ; R^8 es más preferiblemente metilo o 2-hidroxi-etilo.

Otro grupo preferido son compuestos de fórmula Ia



Fórmula Ia

50 en donde

R^2 es hidrógeno o halógeno;

R^{4a} y R^{4b} son se han definido anteriormente;

R^{3a}, R^{3b} y R^{3c} son se han definido anteriormente; y

5 R⁹ es NR⁵R⁶ o R⁸, en donde R⁵ y R⁶ son cada uno independientemente hidrógeno, cicloalquilo o alquilo de C₁₋₄ opcionalmente sustituido por hidroxilo o dialquilamino;

y R⁸ es hidroxil-alquilo de C₂₋₄;

10 y los derivados N-óxidos, las sales farmacéuticamente aceptables y solvatos (por ejemplo, hidratos) de tales compuestos.

En estos compuestos de fórmula la:

15 R² es preferiblemente hidrógeno;

R^{3a} es preferiblemente alcoxi de C₁₋₄; lo más preferiblemente metoxi o isopropoxi.

20 R^{3b} es hidrógeno.

R^{3c} es preferiblemente hidrógeno o halógeno, especialmente fluoro.

R^{4a} es hidrógeno.

25 R^{4b} es preferiblemente hidrógeno o metilo; lo más preferiblemente hidrógeno.

R⁵ y R⁶ son cada uno independientemente hidrógeno, cicloalquilo o alquilo de C₁₋₄ opcionalmente sustituido por hidroxilo o dialquilamino; más preferiblemente R⁵ y R⁶ son cada uno independientemente hidrógeno, metilo, ciclopropilo, 2-hidroxietilo, 2-dimetilaminoetilo o 3-dimetilaminopropilo.

30 R⁸ es hidroxil-alquilo de C₂₋₄, más preferiblemente 2-hidroxietilo.

Los siguientes compuestos son preferidos:

35 {3-[4-(2-Metoxi-fenil)-pirimidin-2-ilamino]-fenil}-metanosulfonamida (Compuesto 1);

{3-[4-(2-Isopropoxi-fenil)-pirimidin-2-ilamino]-fenil}-metanosulfonamida (Compuesto 2);

40 C-{3-[4-(2-Metoxi-fenil)-pirimidin-2-ilamino]-fenil}-N,N-dimetil-metanosulfonamida (Compuesto 3);

C-{3-[4-(2-Metoxi-fenil)-pirimidin-2-ilamino]-fenil}-N-metil-metanosulfonamida (Compuesto 4);

{3-[4-(4-Fluoro-2-metoxi-fenil)-pirimidin-2-ilamino]-fenil}-metanosulfonamida (Compuesto 5);

45 N-Ciclopropil-C-{3-[4-(2-metoxi-fenil)-pirimidin-2-ilamino]-fenil}-metanosulfonamida (Compuesto 6);

N-(2-Hidroxi-etil)-C-{3-[4-(2-metoxi-fenil)-pirimidin-2-ilamino]-fenil}-metanosulfonamida (Compuesto 7);

50 N-(2-Hidroxi-etil)-C-{3-[4-(2-metoxi-fenil)-pirimidin-2-ilamino]-fenil}-N-metil-metanosulfonamida (Compuesto 8);

2-{3-[4-(2-Metoxi-fenil)-pirimidin-2-ilamino]-fenilmetanosulfonil}-etanol (Compuesto 9);

{3-[4-(2-Metoxi-fenil)-6-metil-pirimidin-2-ilamino]-fenil}-metanosulfonamida (Compuesto 10);

55 -(2-Hidroxi-etil)-C-{3-[4-(2-metoxi-fenil)-6-metil-pirimidin-2-ilamino]-fenil}-N-metil-metanosulfonamida (Compuesto 11);

2-{3-[4-(2-Metoxi-fenil)-6-metil-pirimidin-2-ilamino]-fenilmetanosulfonil}-etanol (Compuesto 12);

{3-[4-(2-Metoxi-fenil)-5-metil-pirimidin-2-ilamino]-fenil}-metanosulfonamida (Compuesto 13);

60 N-(2-Hidroxi-etil)-C-{3-[4-(2-metoxi-fenil)-5-metil-pirimidin-2-ilamino]-fenil}-N-metil-metanosulfonamida (Compuesto 14); y

2-{3-[4-(2-Metoxi-fenil)-5-metil-pirimidin-2-ilamino]-fenilmetanosulfonil}-etanol (Compuesto 15).

65

En una forma de realización adicional, la invención proporciona los compuestos mencionados anteriormente según la fórmula I, para uso médico.

5 En una forma de realización adicional, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que contienen un compuesto como se ha esbozado anteriormente, junto con un soporte farmacéuticamente aceptable.

10 En una forma de realización adicional, la invención proporciona el uso de un compuesto como se ha esbozado anteriormente para preparar una composición farmacéutica para tratar trastornos inflamatorios, enfermedades inmunológicas, enfermedades proliferativas, enfermedades infecciosas, enfermedades cardiovasculares y enfermedades neurodegenerativas.

En una forma de realización adicional, la invención proporciona el uso de un compuesto como se ha esbozado anteriormente para preparar una composición farmacéutica para tratar dolor, dolor crónico, y/o dolor neuropático.

15 En una forma de realización adicional, la invención proporciona un método para tratar trastornos inflamatorios, enfermedades inmunológicas, enfermedades proliferativas, enfermedades infecciosas, enfermedades cardiovasculares y enfermedades neurodegenerativas que comprende la administración de una cantidad eficaz de al menos uno de los compuestos como se han mencionado anteriormente a un sujeto en necesidad de ello.

20 En una forma de realización adicional, la invención proporciona un método para tratar dolor, dolor crónico, y/o dolor neuropático que comprende la administración de una cantidad eficaz de al menos uno de los compuestos como se han mencionado anteriormente a un sujeto en necesidad de ello.

Breve descripción de las figuras

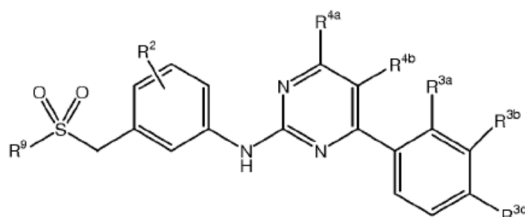
25 La **figura 1** representa esquemáticamente el modelo de lesión de nervio conservado (modelo SNI, desarrollado por Decosterd y Woolf (2000), que se caracteriza por la ligación y sección de dos ramas del nervio ciático (es decir, nervios ciático poplíteo interno y safeno interno) que deja el nervio safeno externo intacto.

30 La **figura 2** representa esquemáticamente un posible papel de CDK9 como diana en el desarrollo del dolor.

35 La **figura 3** representa el resultado de medidas de citoquinas realizadas con macrófagos THP-1 inducidos con LPS. La expresión de TNF mostrada como % de inhibición comparada con el control de DMSO. Las células tratadas con los compuestos 1, 5, 6, 8 o 9 muestran una inhibición significativa de la expresión de TNF en el sobrenadante comparado con el vehículo (DMSO). Comparados con los compuestos de referencia SB203580 (inhibidor de p38) y BMS345541 (inhibidor de IKK) estos compuestos muestran una inhibición similar o mejor de la expresión de TNF en este ensayo.

Descripción detallada de la invención

40 Los inhibidores de CDK proporcionados por la presente invención son compuestos según la fórmula general I:



Fórmula Ia

45 en donde

R^9 es $-NR^5R^6$ o R^8

50 R^5 y R^6 independientemente entre si son hidrógeno, alquilo de C_{1-4} , hidroxi-alquilo de C_{1-4} o alqueno de C_{3-4} , cicloalquilo de C_{3-8} , cicloalquilo de C_{3-8} -alquilo de C_{1-4} o heterocicloalquilo de C_{4-7} -alquilo de C_{0-4} , arilo de C_{4-7} -alquilo de C_{1-4} , heteroarilo de C_{4-7} -alquilo de C_{0-4} o

55 en donde R^5 y R^6 junto con el átomo de N al que están unidos también pueden formar un heterocicloalquilo de 5 a 8 miembros,

en donde dicho cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo o alquilo está además opcionalmente sustituido por hasta 2 radicales seleccionados del grupo que consiste en halo, hidroxilo, aminocarbonilo, alquilo de C₁₋₄, hidroxialquilo de C₁₋₄, alquilo de C₁₋₄-O-alquilo de C₁₋₄, alquilo de C₁₋₄-O- y -NR⁵R⁶;

5 R⁸ es alquilo de C₁₋₄, hidroxialquilo de C₂₋₄ o alqueno de C₃₋₄, cicloalquilo de C₃₋₈, cicloalquilo de C₃₋₈-alquilo de C₁₋₄ o heterocicloalquilo de C₄₋₇-alquilo de C₀₋₄;

10 en donde dicho cicloalquilo, heterocicloalquilo o alquilo está además opcionalmente sustituido por hasta 2 radicales seleccionados del grupo que consiste en halo, hidroxilo, alquilo de C₁₋₄, hidroxialquilo de C₁₋₄, alquilo de C₁₋₄-O-alquilo de C₁₋₄, alquilo de C₁₋₄-O- y -NR⁵R⁶;

R² es uno o dos sustituyentes independientemente seleccionados de halógeno e hidrógeno;

15 R^{3a} representa hidrógeno, halo o alcoxi de C₁₋₄;

R^{3b} representa hidrógeno;

R^{3c} representa hidrógeno o halógeno;

20 R^{4a} representa hidrógeno; y

R^{4b} representa hidrógeno o metilo;

25 y los derivados N-óxidos, las sales farmacéuticamente aceptables y solvatos (por ejemplo, hidratos) de tales compuestos.

30 En una forma de realización preferida de esta invención, el inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina según la fórmula I inhibe una CDK seleccionada del grupo que consiste en CDK1, CDK2, CDK3, CDK4, CDK5, CDK6, CDK7, CDK8, CDK9, CDK10, CDK11, CrkRS (Crk7, proteína quinasa 7 relacionada con CDC2), CDKL-1 (similar a quinasa dependiente de ciclina 1); KKIALLRE, CDKL-2 (similar a quinasa dependiente de ciclina 2), KKIALLRE, CDKL-3 (similar a quinasa dependiente de ciclina 3), NKIAMRE, CDKL-4, similar a similar a quinasa dependiente de ciclina 1, CDC2L1 (similar a ciclo de división celular-2 1), PITSLRE B, CDC2L1 (similar a ciclo de división celular-2 1), PITSLRE A, CDC2L5 (similar a ciclo de división celular-2 5), PCTK1 (proteína quinasa de PCTAIRE 1), PCTK2 (proteína quinasa de PCTAIRE 2), PCTK3 (proteína quinasa de PCTAIRE 3) o PFTK1 (proteína quinasa de PFTAIRE 1).

El inhibidor también puede inhibir más de una quinasa dependiente de ciclina seleccionada del grupo enumerado anteriormente.

40 En una forma de realización preferida particular de esta invención, el compuesto según la fórmula I inhibe CDK9.

En una forma de realización adicional de esta invención, el compuesto según la fórmula I inhibe selectivamente una o más CDK sin tener un efector inhibidor sustancial sobre otras enzimas o proteínas.

45 En una forma de realización preferida, tales compuestos inhibitorios muestran una selectividad aumentada por una CDK particular. "Selectividad aumentada" como se usa en el presente documento significa que el compuesto inhibidor es al menos 10-100 x más selectivo para una CDK particular seleccionada del grupo de CDK enumerado en el presente documento, anteriormente. En una forma de realización preferida de la presente invención, el compuesto inhibidor es 20-90 x más selectivo para una CDK particular. En una forma de realización preferida particular, el compuesto inhibidor es 30-80 x más selectivo para una CDK particular.

50 En una forma de realización preferida particular, el compuesto según la fórmula I muestra una selectividad aumentada para CDK9 más que para otras CDK.

55 Como se usa en el presente documento, el término "inhibir" o "inhibición" se refiere a la capacidad de un compuesto para regular por descenso, disminuir, reducir, suprimir, inactivar, o inhibir al menos parcialmente la función celular de una quinasa dependiente de ciclina, es decir, su actividad o la expresión de la quinasa dependiente de ciclina.

60 Además, el término "inhibidor de quinasa dependiente de ciclina" se refiere a cualquier compuesto o grupo de compuestos capaces de regular por descenso, disminuir, suprimir o regular de otra manera la cantidad y/o actividad de una quinasa dependiente de ciclina. La inhibición de dichas quinasas se puede alcanzar por cualquiera de una variedad de mecanismos conocidos en la técnica, incluyendo, pero no limitado a, unión directa al polipéptido quinasa, desnaturalizar o inactivar de otro modo la quinasa, o inhibir la expresión del gen (por ejemplo, transcripción a ARNm, traducción a un polipéptido naciente, y/o modificaciones polipeptídicas finales a una proteína madura), que codifica la quinasa. Además, un inhibidor de quinasa dependiente de ciclina también puede interferir con la expresión, modificación, regulación o activación de una molécula que actúa después de una CDK en una ruta

dependiente de CDK. Generalmente, los inhibidores de quinasas pueden ser proteínas, polipéptidos, ácidos nucleicos, moléculas pequeñas, u otras fracciones químicas. Específicamente, los inhibidores de quinasas también incluyen anticuerpos monoclonales o policlonales dirigidos contra quinasas dependientes de ciclinas.

- 5 En una forma de realización preferida, el inhibidor de la quinasa dependiente ciclina se selecciona de los compuestos representados por la fórmula I como se divulga en el presente documento.

Uso terapéutico

- 10 Los compuestos de fórmula I son inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas. Por tanto, se esperan que tengan la capacidad de parar, o recuperar el control del ciclo celular en células que se dividen anormalmente. Consecuentemente, se sugiere que los compuestos según la fórmula I se demostrarán útiles en tratar y/o prevenir trastornos proliferativos tal como cánceres.

- 15 Se sabe que las CDK desempeñan un papel en apoptosis, proliferación, diferenciación y transcripción y por tanto, los compuestos según la fórmula I también pueden ser útiles en el tratamiento de enfermedades diferentes de enfermedades proliferativas, tal como enfermedades infecciosas, enfermedades inmunológicas, enfermedades neurodegenerativas y enfermedades cardiovasculares.

- 20 Además, los compuestos según la fórmula I también muestran un efecto antinociceptivo y antiinflamatorio inesperado.

- 25 Por tanto, en una forma de realización preferida, los compuestos de fórmula I se pueden usar en métodos y/o composiciones farmacéuticas para el tratamiento de cualquier tipo de dolor, incluyendo dolor crónico, dolor neuropático y/o inflamatorio.

En una forma de realización preferida adicional, los compuestos de fórmula I se pueden usar en métodos y/o composiciones farmacéuticas para el tratamiento de trastornos inflamatorios.

- 30 En una forma de realización preferida particular, los compuestos de fórmula I para uso en el tratamiento de cualquier tipo de dolor o en el tratamiento de trastornos inflamatorios muestran una selectividad aumentada para CDK9 más que para otras CDK.

Dolor

- 35 Ha resultado que la administración de inhibidores de CDK según la fórmula I a ratones que padecen lesiones de nervios ejerce un efecto hipoalérgico, en particular en modelos murinos de dolor inflamatorio y neuropático.

- 40 El descubrimiento de que la inhibición de una quinasa dependiente de ciclina está implicada en mediar un efecto hipoalérgico era inesperado.

- 45 Por tanto, en una forma de realización preferida, esta invención se refiere a un método para tratar cualquier tipo de dolor que comprende administrar una cantidad eficaz de un inhibidor de una quinasa dependiente de ciclina según la fórmula I. Específicamente, los compuestos de fórmula I se pueden usar para el tratamiento de dolor crónico, neuropático y/o inflamatorio. En una forma de realización preferida particular, los compuestos de fórmula I para uso en el tratamiento de cualquier tipo de dolor muestran una selectividad aumentada por CDK9 más que para otras CDK.

- 50 El papel de CDK9 en el desarrollo del dolor se podría basar en el siguiente mecanismo de acción: tanto la ciclina T1 como CDK9 estimulan la actividad promotora basal de TNF α . TNF α es una citoquina proinflamatoria y mediador del dolor que controla la expresión de redes genéticas inflamatorias. Para la mediación de las respuestas del receptor de TNF celular, la ruta de factor nuclear- κ B (NF κ B) es crucial. TNF α desencadena su reclutamiento a genes de citoquinas mientras que NF κ B interacciona con el complejo p-TEFb para la estimulación de la transcripción génica (Barboric M et al., 2001).

- 55 Además, se ha mostrado que CDK9 es un compañero de unión de TRAF2, un miembro del complejo del receptor de TNF α (MacLachlan et al., 1998), mientras que GP130, una subunidad del complejo del receptor de IL6 proinflamatoria se ha identificado recientemente como otro potencial compañero de unión de CDK9 (Falco et al, 2002). Como un jugador clave en la señalización de TNF α e interleuquina así como en la expresión de varios genes mediada por Nf κ B (por ejemplo, citoquinas como mediadores de dolor), CDK9 se puede, por tanto, considerar una diana central para el tratamiento de cualquier tipo de dolor, tal como dolor inflamatorio (véase la figura 2).

- 60 Para el tratamiento del dolor neuropático, la acción farmacológica tiene que tener lugar más allá de la barrera hematoencefálica (BHE) en el sistema nervioso central (SNC). Las células de microglía como las principales células inmunitarias en el SNC, por ejemplo, liberan, tras la activación, una variación de factores nocivos tal como citoquinas (TNF α , IL1 β , IL6) y otras molécula proinflamatorias (Huwe 2003). La microglía se activa por estimulación del receptor

de TNF α o receptor de tipo Toll y la señal está mediada a través de la Ik quinasa (IKK) y Nf κ B que produce la activación transcripcional de las citoquinas descritas anteriormente. La contribución de la microglía se ha discutido como instrumental en enfermedades crónicas de SNC y puede contribuir a la percepción del dolor (Watkins et al, 2003).

5 Recientemente se ha mostrado que el factor de transcripción Nf κ B regula la expresión de cicloxigenasa-2 (COX-2) a través de interleuquina 1 β (IL1 β) en la médula espinal (Lee et al., 2004). Como el contribuidor principal a la elevación de prostaglandina E2 medular, el mediador del dolor COX-2 ya se conoce como una diana para una variedad de fármacos anti-nociceptivos/antiinflamatorios. Los inhibidores de Nf κ B han demostrado su capacidad para reducir significativamente los niveles de COX-2 y alodinia mecánica así como hiperalgesia térmica en modelos animales.

10 En contraste a COX-2, la inhibición de la acción de CDK9 produciría la supresión de una variedad de mediadores del dolor en lugar de solo uno único. Por tanto, la acción antinociceptiva de los inhibidores de CDK9 puede ser superior comparada a por ejemplo, los inhibidores de COX-2.

15 Debido a su relevancia para la transcripción génica mediada por Nf κ B, la interacción inhibitoria con CDK9 puede por tanto ser un enfoque razonable no solo para el tratamiento de dolor inflamatorio agudo, sino también para el tratamiento del dolor crónico.

20 El término "dolor" como se usa en el presente documento generalmente se refiere a cualquier tipo de dolor y en términos generales abarca tipos de dolor tales como dolor agudo, dolor crónico, dolor inflamatorio y neuropático. En una forma de realización preferida de la presente invención, "dolor" comprende dolor neuropático y afecciones asociadas. El dolor puede ser crónico, alodinia (la percepción de dolor de un estímulo normalmente inocuo), hiperalgesia (una respuesta exagerada a cualquier estímulo de dolor determinado) y una expresión del campo receptivo (es decir, el área que es "dolorosa" cuando se aplica un estímulo), dolor fantasma o dolor inflamatorio.

25 Los tipos de dolor agudo comprenden, pero no están limitados a dolor asociado con daño a tejidos, dolor posquirúrgico, dolor después de traumatismo, dolor causado por quemaduras, dolor causado por infección local o sistémica, dolor visceral asociado con enfermedades que comprenden: pancreatitis, cistitis intestinal, dismenorrea, síndrome del intestino irritable, enfermedad de Crohn, cólico uretral e infarto de miocardio.

30 Además, el término "dolor" comprende dolor asociado con trastornos del SNC que comprenden: esclerosis múltiple, lesión de la médula espinal, lesión cerebral traumática, enfermedad de Parkinson e ictus.

35 En una forma de realización preferida, "dolor" se refiere a tipos de dolor crónico que comprenden cefalea (por ejemplo, trastornos de migrañas, cefalea tensional episódica y crónica, cefalea similar a tensional, cefalea en brotes, y hemicrania paroxística crónica), lumbalgia, dolor canceroso, dolor de artrosis y dolor neuropático, pero no está limitado a los mismos.

40 El dolor inflamatorio (dolor en respuesta a lesión de tejidos y el proceso inflamatorio resultante) como se define en el presente documento se refiere a dolor inflamatorio asociado con enfermedades que comprenden enfermedades del tejido conjuntivo, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple y artritis, pero no está limitado a los mismos.

45 El dolor neuropático (dolor resultante de daño a los nervios periféricos o al sistema nervioso central mismo) incluye afecciones que comprenden, pero no limitadas a neuropatías metabólicas (por ejemplo, neuropatía diabética), neuralgia posherpética, neuralgia del trigémino, neuralgia craneana, dolor neuropático tras un ictus, dolor neuropático asociado a esclerosis múltiple, dolor neuropático asociado a VIH/SIDA, dolor neuropático asociado al cáncer, dolor neuropático asociado al túnel carpiano, dolor neuropático asociado a lesión de médula espinal, síndrome de dolor regional complejo, dolor neuropático asociado a fibromialgia, distrofia simpática refleja, síndrome del miembro fantasma o traumatismo del nervio periférico o médula espinal, sección de nervios incluyendo cirugía, amputación de miembros y dolor de muñón, dolor causado por los efectos secundarios de terapias anticancerosas y antisida, dolor neuropático posquirúrgico, dolor asociado a neuropatía tal como en neuropatía idiopática o postraumática y mononeuritis, y dolor neuropático causado por enfermedad del tejido conjuntivo tal como artritis reumatoide, síndrome de Wallenberg, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple o panarteritis nudosa. La neuropatía se puede clasificar como radiculopatía, mononeuropatía, mononeuropatía múltiple, polineuropatía o plexopatía.

50 El término "alodinia" indica dolor que surge de estímulos que normalmente no son dolorosos. El dolor alodínico se puede producir en áreas diferentes que en el área estimulada.

55 El término "hiperalgesia" indica una sensibilidad aumentada a un estímulo doloroso.

60 El término "hipoalgesia" indica una sensibilidad disminuida a un estímulo doloroso.

65

Enfermedades inflamatorias. Sorprendentemente, se pudo mostrar que los compuestos inhibidores de CDK según la fórmula I como se divulga en el presente documento ejercen un efecto antiinflamatorio en ensayos inflamatorios *in vitro* e *in vivo*.

5 Por tanto, en una forma de realización preferida, esta invención se refiere a un método de tratar enfermedades inflamatorias que comprende administrar una cantidad eficaz de un inhibidor de quinasa dependiente de ciclina según la fórmula I. En una forma de realización preferida particular, los compuestos de fórmula I para uso en el tratamiento de enfermedades inflamatorias muestran una selectividad aumentada para CDK9 más que para otras CDK.

10 El papel de CDK9 en el desarrollo de enfermedades inflamatorias se podría basar en el siguiente mecanismo de acción: las enfermedades inflamatorias tal como artritis reumatoide (AR); aterosclerosis; asma; enfermedad intestinal inflamatoria, lupus eritematoso sistémico y varias otras enfermedades autoinmunitarias están mediadas por el factor de necrosis tumoral α (TNF α), un regulador clave de rutas inflamatorias y obstructivas en tejidos en dichas enfermedades. Se sabe que la señal de TNF α está mediada a través de varios transductores tal como la I κ B quinasa (IKK), que fosforila la proteína I κ B que se disocia de Nf κ B tras su fosforilación. El Nf κ B disociado, un regulador positivo de la transcripción de citoquinas, se transloca en el núcleo celular donde se une a sus sitios de reconocimiento.

15 20 Se ha encontrado Nf κ B activado en la membrana sinovial de pacientes de AR [Han et al.; 2003, *Autoimmunity*, 28, 197-208]. Regula genes proinflamatorios tal como TNF α , IL-6, IL-8, NOS y COX2. Dirigirse a Nf κ B y su compañero de señalización anterior IKK ya ha demostrado ser una estrategia terapéutica en muchos modelos animales de artritis [Firestein, 2003, *Nature* 423, 356-361].

25 El Nf κ B unido se asocia con un complejo coactivador que contiene histona acetiltransferasas (CBP, p300, SRC-1, y proteínas relacionadas con SRC-1) que recluta y activa CDK9 que cataliza la fosforilación del CTD de ARN Pol II [West et al.; 2001, *Journal of Virology* 75(18), 8524-8537]. La hiperfosforilación resultante del CTD de ARN Pol II produce la activación transcripcional de citoquinas proinflamatorias tal como IL-1 β , IL-6, e IL-8 que también se sabe que están reguladas por TNF α .

30 Varios estudios mostraron que TNF α es un 'regulador maestro' de una cascada de señalización autóloga que regula la expresión de citoquinas proinflamatorias. Para interrumpir esta cascada proinflamatoria, se pueden usar con éxito anticuerpos (Ac) específicos para bloquear la señal de TNF α . El tratamiento con anti-TNF α de AR con Ac ya ha demostrado su eficacia terapéutica en varios estudios clínicos y fármacos aprobados por la FDA tal como Infliximab y Etanercept han entrado en el mercado [Feldmann y Maini, *NatMed*, 2003, 9 (10); 356-61]. Sin embargo, las desventajas de las terapias basadas en Ac incluyen su potencial inmunógeno, pérdida concomitante de eficacia durante el tratamiento progresivo y altos costes del tratamiento. Además, la cinética de los Ac permite una reducción más o menos de todo o nada del TNF α circulante. Como resultado, las funciones fisiológicas de la respuesta inmunitaria también se suprimen [Laufer et al., *Inflammation and Rheumatic Diseases*, 2003; Thieme, pp. 104-5].

35 40 Las intervenciones terapéuticas en la cascada de señalización mediada por TNF α con inhibidores de quinasas que se dirigen a dianas tal como p38 MAPK o IKK han mostrado efectos secundarios graves - en la mayoría de los casos debido a la falta de especificidad contra la diana respectiva.

45 En contraste a lo mismo, los inhibidores específicos de CDK según la fórmula I como se presentan en el presente documento pueden intervenir en el extremo más bajo de las rutas de señalización de TNF α reduciendo la interacción con funciones fisiológicas. Además, dichos compuestos permitirán la interrupción de la red inflamatoria mediada por TNF α autóloga evitando los efectos secundarios a través de una especificidad superior. Por tanto, el tratamiento con inhibidores específicos de CDK9 de fórmula I constituye una estrategia prometedora para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias.

50 Por tanto, los compuestos según la fórmula I como se presentan en el presente documento se pueden usar para el tratamiento y/o prevención de enfermedades inflamatorias.

55 El término "enfermedades inflamatorias" como se usa en el presente documento se refiere a enfermedades desencadenadas por mediadores celulares o no celulares del sistema inmunitario o tejidos que causan la inflamación de tejidos del cuerpo y posteriormente producen una afección inflamatoria aguda o crónica.

60 Los ejemplos de tales enfermedades inflamatorias son reacciones de hipersensibilidad de tipo I-IV, por ejemplo, pero no limitadas a enfermedades de hipersensibilidad del pulmón incluyendo asma, enfermedades atópicas, rinitis o conjuntivitis alérgica, angioedema de los párpados, angioedema hereditario, reacciones de hipersensibilidad y enfermedades autoinmunitarias antirreceptor, tiroiditis de Hashimoto, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Goodpasture, pénfigo, miastenia grave, enfermedad de Grave y Raynaud, diabetes resistente a insulina de tipo B, artritis reumatoide, psoriasis, enfermedad de Crohn, escleroderma, enfermedad del tejido conjuntivo mixta, polimiositis, sarcoidosis, granulomatosis de Wegener, glomerulonefritis, reacciones del huésped contra el injerto agudas o crónicas.

Además, el término “enfermedades inflamatorias” incluye pero no está limitado a inflamación de la cavidad abdominal, dermatitis, inflamación gastrointestinal (incluyendo enfermedad intestinal inflamatoria, colitis ulcerativa), fibrosis, inflamación ocular y orbital, enfermedad de ojos secos y enfermedad de ojos secos grave resultante del síndrome de Sjörgen, mastitis, otitis, inflamación en la boca, inflamación del sistema musculoesquelético (incluyendo gota, artrosis), enfermedades inflamatorias del sistema nervioso central (incluyendo esclerosis múltiple, meningitis bacteriana, meningitis), inflamación del aparato genitourinario (incluyendo prostatitis, glomerulonefritis), inflamación cardiovascular (incluyendo aterosclerosis, insuficiencia cardíaca), inflamación del aparato respiratorio (incluyendo bronquitis crónica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica), tiroiditis, diabetes mellitus, osteítis, miositis, insuficiencia orgánica múltiple (incluyendo septicemia), polimiositis y artritis psoriásica.

Enfermedades inmunológicas

También se prevé que los compuestos según la fórmula I sean útiles en el tratamiento y/o prevención de enfermedades inmunológicas, tal como, por ejemplo, enfermedades autoinmunitarias.

Según esto, la presente invención proporciona un método para el tratamiento y/o prevención de enfermedades inmunológicas que comprende la administración de una cantidad eficaz de al menos un inhibidor de CDK según la fórmula I a un sujeto en necesidad de ello.

El término “enfermedades inmunológicas” como se usa en el presente documento se refiere a enfermedades incluyendo, pro no limitadas a alergia, asma, enfermedad de injerto contra el huésped, deficiencia inmunitarias y enfermedades y enfermedades autoinmunitarias.

Específicamente, las enfermedades inmunológicas incluyen diabetes, enfermedades reumáticas, SIDA, enfermedad granulomatosa crónica, rechazo de órganos y tejidos trasplantados, rinitis, enfermedades pulmonares obstructivas crónicas, osteoporosis, colitis ulcerativa, enfermedad de Crohn, sinusitis, lupus eritematoso, psoriasis, esclerosis múltiple, miastenia grave, alopecia, infecciones recurrentes, dermatitis atópica, eccema y reacciones anafilácticas graves, pero no están limitadas a las mismas. Además, las “enfermedades infecciosas” también incluyen alergias tal como alergias de contacto, alergias alimenticias o alergias a fármacos.

Enfermedades proliferativas

Los compuestos de fórmula I son inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas, que representan moléculas clave implicadas en la regulación del ciclo celular. La disregulación del ciclo celular es una de las características principales de las células neoplásicas. Por tanto, se espera que dichos compuestos se demuestren útiles en parar o recuperar el control del ciclo celular en células que se dividen anormalmente. Por tanto, se espera que los compuestos según la fórmula I sean útiles en el tratamiento y/o prevención de enfermedades proliferativas tal como cáncer.

Según esto, la invención proporciona un método para el tratamiento y/o prevención de enfermedades proliferativas que comprende administrar una cantidad eficaz de al menos un inhibidor de una quinasa dependiente de ciclina según la fórmula I.

Como se usa en el presente documento, el término “enfermedad proliferativa” se refiere a trastornos cancerosos, incluyendo, pero no limitados a, neoplasias benignas, displasias, hiperplasias así como neoplasias que muestran crecimiento metastásico o cualquier otra transformación.

El término “cáncer” incluye pero no está limitado a neoplasia benigna y maligna como carcinoma, sarcoma, carcinosarcoma, cánceres de los tejidos que forman la sangre, tumores de tejidos nerviosos incluyendo el cerebro y cáncer de células de la piel.

Los ejemplos de cánceres que se pueden tratar incluyen, pero no están limitados a, un carcinoma, por ejemplo, un carcinoma de la vejiga, mama, colon (por ejemplo, carcinomas colorrectales tal como adenocarcinoma de colon y adenoma de colon), riñón, epidérmico, hígado, pulmón, por ejemplo, adenocarcinoma, carcinoma de pulmón microcítico y de pulmón no microcítico, esófago, vesícula biliar, ovario, páncreas, por ejemplo, carcinoma pancreático exocrino, estómago, cuello uterino, tiroides, próstata o piel, por ejemplo, carcinoma de células escamosas; un tumor hematopoyético de linaje linfoide, por ejemplo, leucemia, leucemia linfocítica aguda, linfoma de células B, linfoma de células T, linfoma de Hodgkin, linfoma no hodgkiniano, linfoma de células pilosas, o linfoma de Burkett; un tumor hematopoyético de linaje mielóide, por ejemplo, leucemias mielógenas aguda y crónica, síndrome mielodisplásico, o leucemia promielocítica; cáncer folicular del tiroides; un tumor de origen mesenquimatoso, por ejemplo, fibrosarcoma o habdomiosarcoma; un tumor del sistema nervioso central o periférico, por ejemplo, astrocitoma, neuroblastoma, glioma o schwannoma; melanoma; seminoma; teratocarcinoma; osteosarcoma; xeroderma pigmentosa; queratocarcinoma; cáncer folicular del tiroides; sarcoma de Kaposi, astrocitoma, carcinoma de células basales, cáncer del intestino delgado, tumores del intestino delgado, tumores gastrointestinales, glioblastomas, liposarcoma, tumor de células germinales, tumores de cabeza y cuello (tumores del oído, nariz y área

de la garganta), cáncer de la boca, garganta, laringe y el esófago, cáncer de los huesos y sus tejidos de soporte y conjuntivo como tumor óseo maligno o benigno, por ejemplo, sarcoma osteogénico maligno, osteoma benigno, tumores del cartílago; como condrosarcoma maligno o condroma benigno, osteosarcomas; tumores de la vejiga urinaria y los órganos y estructuras internos y externos del sistema urogenital masculino y femenino, tumores de tejidos blandos, sarcoma de tejido blando, tumor de Wilm o cánceres de las glándulas endocrinas y exocrinas como por ejemplo, tiroides, paratiroides, hipófisis, glándulas suprarrenales, glándulas salivares.

Enfermedades infecciosas

Además, la invención se refiere a un método de tratar y/o prevenir enfermedades infecciosas que comprende administrar una cantidad eficaz de al menos un inhibidor de una quinasa dependiente de ciclina según la fórmula I.

Se sabe que ciertas CDK de células huésped están implicadas en la replicación vírica, es decir, CDK2, CDK7, CDK8 y CDK9 (J. Virol. 2001; 75: 7266-7279). Específicamente, se ha descrito el papel de la actividad quinasa de CDK9 en la regulación de la elongación de la transcripción y metilación de histonas en VIH-1 (J. Virol 2004, 78(24):13522-13533).

En una forma de realización preferida, la invención por tanto se refiere a un método de tratar y/o prevenir enfermedades infecciosas que comprenden administrar una cantidad eficaz de al menos un inhibidor de una quinasa dependiente de ciclina según la fórmula I, en donde dicho compuesto muestra una selectividad aumentada por CDK9 más que por otras CDK.

El término "enfermedades infecciosas" como se usa en el presente documento comprende infecciones causadas por patógenos tal como virus, bacterias, hongos y/o parásitos.

Las enfermedades infecciosas inducidas por virus incluyen enfermedades causadas por infección con retrovirus, retrovirus humanos endógenos, hepadnavirus, herpesvirus, flavivirus, adenovirus, togavirus, y poxvirus. Específicamente, las enfermedades infecciosas están causadas por virus que comprenden, pero no limitados a, virus tales como VIH-1, VIH-2, HTLV-I y HTLV-II, hepadnavirus tales como tal como HBV, herpesvirus tal como el virus del herpes simple I (HSV I), virus del herpes simple 11 (HSV II), virus de Epstein-Barr (EBV), virus varicela zoster (VZV), citomegalovirus humano (HCMV) o herpesvirus humano 8 (HHV-8), flavivirus tal como HCV, virus del Nilo occidental o de la fiebre amarilla, virus del papiloma humano, poxvirus, virus Sindbis o adenovirus.

Los ejemplos de enfermedades infecciosas incluyen, pero no están limitados a, SIDA, borreliosis, botulismo, diarrea, EBE (Encefalopatía Bovina Espongiforme), chikungunya, cólera, CJD (enfermedad de Creutzfeldt-Jakob), conjuntivitis, infección por citomegalovirus, dengue/fiebre dengue, encefalitis, encefalitis equina del este, encefalitis equina occidental, infección por virus de Epstein-Barr, infección por Escherichia coli, infección alimentaria, fiebre aftosa, dermatitis fúngica, gastroenteritis, infección por Helicobacter pylori, Hepatitis (HCV, HBV), Herpes Zoster (culebrilla), Infección por VIH, gripe, malaria, sarampión, meningitis, meningoencefalitis, molusco contagioso, enfermedades transmitidas por mosquitos, infección por Parvovirus, peste, PCP (neumonía por Pneumocystis carinii), polio, gastroenteritis primaria, fiebre Q, Rabia, infección por Virus Respiratorio Sincitial (RSV), fiebre reumática, rinitis, fiebre del valle del Rift, infección por Rotavirus, salmonelosis, salmonella enteritidis, sarna, sígela, viruela, infección estreptocócica, tétanos, síndrome de choque tóxico, tuberculosis, úlceras (enfermedad de úlceras pépticas), fiebre hemorrágica, viruela, verrugas, infección por virus del Nilo occidental (encefalitis del Nilo occidental), tos ferina, fiebre amarilla.

Enfermedades cardiovasculares

Además, la invención se refiere al tratamiento y/o prevención de enfermedades cardiovasculares que comprende administrar una cantidad eficaz de al menos un inhibidor de una quinasa dependiente de ciclina según la fórmula I.

Se ha descrito que el campo de las enfermedades cardiovasculares constituye una posible aplicación clínica para inhibidores de CDK (Pharmacol Ther 1999, 82(2-3):279-284). Además, se sabe que la inhibición del complejo ciclina T/CDK9 y más específicamente, la inhibición de CDK9 puede desempeñar un papel beneficioso en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares tal como insuficiencia cardíaca (documento WO2005/027902).

Por tanto, en una forma de realización preferida, la invención se refiere a un método de tratar y/o prevenir enfermedades cardiovasculares que comprende administrar una cantidad eficaz de al menos un inhibidor de una quinasa dependiente de ciclina según la fórmula I, en donde dicho compuesto muestra una selectividad aumentada para CDK más que para otras CDK.

El término "enfermedades cardiovasculares" incluye, pero no está limitado a, trastornos del corazón y el sistema vascular como insuficiencia cardíaca congestiva, infarto de miocardio, enfermedades isquémicas del corazón tal como angina estable, angina inestable e isquemia asintomática, todo tipo de arritmias auriculares y ventriculares, enfermedades vasculares hipertensas, enfermedades vasculares periféricas, cardiopatía coronaria y aterosclerosis. Además, como se usa en el presente documento, el término incluye, pero no está limitado a, cardiopatía congénita

5 adulta, aneurisma, angina de pecho, edema angioneurótico, estenosis de la válvula aortica, aneurisma aórtico, insuficiencia valvular aortica, displasia ventricular derecha arritmogénica, malformaciones arteriovenosas, fibrilación auricular, síndrome de Behcet, bradicardia, cardiomegalia, cardiomiopatías tal como cardiomiopatía congestiva, hipertrófica y restrictiva, estenosis carótida, hemorragia cerebral, síndrome de Churg-Strauss, embolia por colesterol, endocarditis bacteriana, displasia fibromuscular, insuficiencia cardiaca congestiva, enfermedades de las válvulas del corazón tal como válvulas incompetentes o válvulas con estenosis, ataque al corazón, hematoma epidural o subdural, enfermedad de von Hippel-Lindau, hiperemia, hipertensión, hipertensión pulmonar, crecimiento hipertrófico, hipertrofia ventricular izquierda, hipertrofia ventricular derecha, síndrome del corazón izquierdo hipoplásico, hipotensión, claudicación intermitente, cardiopatía isquémica, síndrome de Klippel-Trenaunay-Weber, síndrome medular lateral, prolapso de la válvula mitral, prolapso de la válvula mitral síndrome QT largo, isquemia miocárdica, miocarditis, trastornos del pericardio, pericarditis, enfermedades vasculares periféricas, flebitis, panarteritis nudosa, atresia pulmonar, enfermedad de Raynaud, restenosis, cardiopatía reumática, síndrome de Sneddon, estenosis, síndrome de la vena cava superior, síndrome X, taquicardia, telangiectasia hemorrágica hereditaria, telangiectasia, arteritis temporal, tromboangitis obliterante, trombosis, tromboembolia, venas varicosas, enfermedades vasculares, vasculitis, vasoespasmo, fibrilación ventricular, síndrome de Williams, enfermedad vascular periférica, venas varicosas y úlceras en las piernas, trombosis venosa profunda y síndrome de Wolff-Parkinson-White.

Además, el término enfermedades cardiovasculares incluye enfermedades resultantes de defectos congénitos, defectos genéticos, influencias medioambientales (por ejemplos influencias de la dieta, estilo de vida, estrés, etc.), y otros defectos o influencias.

Enfermedades neurodegenerativas

Se ha descrito que los inhibidores de CDK ejercen efectos neuroprotectores. Específicamente, se ha descrito que los inhibidores de CDK previenen la muerte neuronal en enfermedades neurodegenerativas tal como la enfermedad de Alzheimer (Biochem Biophys Res Commun 2002 (297):1154-1158; Trends Pharmacol Sci 2002 (23):417-425; Pharmacol Ther 1999, 82(2-3):279-284).

Por tanto, se espera que los compuestos según la fórmula I, que son inhibidores de CDK, proporcionen efectos beneficiosos en el tratamiento terapéutico de enfermedades neurodegenerativas.

Según esto, la invención se refiere a un método de tratar y/o prevenir enfermedades neurodegenerativas que comprende administrar una cantidad eficaz de al menos un inhibidor de una quinasa dependiente de ciclina según la fórmula I.

El término "enfermedades neurodegenerativas" como se usa en el presente documento incluye trastornos del sistema nervioso central así como trastornos del sistema nervioso periférico incluyendo, pero no limitados a, lesiones cerebrales, enfermedades cerebrovasculares y sus consecuencias, enfermedad de Parkinson, degeneración corticobasal, enfermedad de motoneuronas, demencia incluyendo ELA, esclerosis múltiple, lesión cerebral traumática, ictus, post-ictus, lesión cerebral postraumática, y enfermedad cerebrovascular de vasos pequeños, demencias, tal como enfermedad de Alzheimer, demencia vascular, demencia con cuerpos de Lewis, demencia frontotemporal y parkinsonismo ligado al cromosoma 17, demencias frontotemporales, incluyendo enfermedad de Pick, parálisis nuclear progresiva, degeneración corticobasal, enfermedad de Huntington, degeneración talámica, demencia de Creutzfeld-Jakob, demencia por VIH, esquizofrenia con demencia, psicosis de Korsakoff y demencia relacionada con SIDA.

Similarmente, también se considera que los trastornos cognitivos, tal como deterioro cognitivo leve, deterioro de memoria senil, debilitamiento cognitivo senil, deterioro cognitivo vascular, trastornos de falta de atención, trastornos de hiperactividad por falta de atención, y problemas de memoria en niños con discapacidades de aprendizaje son trastornos neurodegenerativos.

Específicamente la presente invención se refiere a un método para tratar los tipos de dolor y afecciones asociadas y enfermedades inflamatorias, enfermedades inmunológicas, enfermedades proliferativas, enfermedades infecciosas, enfermedades cardiovasculares y enfermedades neurodegenerativas anteriormente referidas, en donde el término "tratar" comprende la prevención, alivio, o tratamiento del dolor y afecciones asociadas y enfermedades inflamatorias, enfermedades inmunológicas, enfermedades proliferativas, enfermedades infecciosas, enfermedades cardiovasculares y enfermedades neurodegenerativas.

Composiciones farmacéuticas

Las formas de realización preferidas de la presente invención incluyen la administración de composiciones que comprenden al menos un inhibidor de quinasa dependientes de ciclina según la fórmula I como principio activo junto con al menos un soporte, excipiente y/o diluyente farmacéuticamente aceptable (es decir, no tóxico).

Preferiblemente, la composición comprende al menos un inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas según la fórmula I como un principio activo, en donde dicho al menos un inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas tiene una selectividad aumentada para CDK9 más que para otras CDK.

5 Además, la invención también comprende composiciones que combinan al menos dos inhibidores de CDK y/o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Dichos al menos dos inhibidores pueden inhibir la misma quinasas dependiente de ciclina o también pueden inhibir diferentes tipos de quinasas dependientes de ciclina, por ejemplo, un inhibidor en la composición puede inhibir CDK9 mientras que el otro inhibidor es capaz de inhibir CDK2, por ejemplo.

10 Teniendo en cuenta el tratamiento del dolor, una medicación contra el dolor individual con frecuencia proporciona solo alivio del dolor parcialmente eficaz porque interfiere con solo una ruta de transducción del dolor de muchas. Por tanto, también se pretende administrar inhibidores de CDK según la fórmula I junto con un agente reductor del dolor (analgésico) que actúa en un punto diferente en el proceso de percepción del dolor.

15 Un "agente analgésico" comprende una molécula o combinación de moléculas que produce una reducción en la percepción del dolor. Un agente analgésico emplea un mecanismo de acción diferente de la inhibición de CDK.

20 Una clase de analgésicos, tal como los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), disminuye los mensajeros químicos de los estímulos que son detectados por los nociceptores y otra clase de fármacos, tal como los opiáceos, altera el procesamiento de la información nociceptiva en el SNC. Otros analgésicos son anestésicos locales, anticonvulsivos y antidepressivos tal como antidepressivos tricíclicos. Administrar una o más clases de fármacos además de inhibidores de CDK puede proporcionar alivio más eficaz del dolor.

25 Los AINE preferidos para su uso en los métodos y composiciones de la presente invención son aspirina, paracetamol, ibuprofeno e indometacina. Además, también se pueden usar inhibidores de ciclooxigenasa-2 (COX-2), tal como inhibidores específicos de COX-2 (por ejemplo, celecoxib, COX189 y rofecoxib) como un agente analgésico en los métodos y composiciones de la presente invención.

30 Los antidepressivos tricíclicos preferidos se seleccionan del grupo que consiste en clomipramina, amoxapina, nortriptilina, amitriptilina, imipramina, desipramina, doxepina, trimipramina, protriptilina y pamoato de imipramina.

35 Además, el uso de anticonvulsivos (por ejemplo, gabapentina), agonistas de GABAB (por ejemplo, L-baclofeno), opiáceos, antagonistas del receptor vainilloide y agonistas del receptor canabinoide (CB), por ejemplo agonistas del receptor CB1 como analgésico también se prefiere en los métodos y composiciones en la invención.

40 Al preparar composiciones con inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas de esta invención, se pueden seguir las recomendaciones de fuentes farmacéuticas bien conocidas tal como Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª ed. (Mack Publishing, 1995).

45 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden preparar en un soporte o diluyente sólido o líquido convencional y un adyuvante farmacéuticamente hecho convencional a un nivel de dosis adecuado de una manera conocida. Las preparaciones preferidas están adaptadas para la aplicación oral. Estas formas de administración incluyen, por ejemplo, píldoras, comprimidos, comprimidos con película, comprimidos recubiertos, cápsulas, polvos y depósitos.

50 Además, la presente invención también incluye preparaciones farmacéuticas para aplicación parenteral, incluyendo aplicación dérmica, intradérmica, intragástrica, intracutánea, intravasal, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intranasal, intravaginal, intrayugal, percutánea, rectal, subcutánea, sublingual, tópica o transdérmica, en donde dichas preparaciones además de vehículos y/o diluyentes típicos contienen al menos un inhibidor según la presente invención y/o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como principio activo.

55 Las composiciones farmacéuticas según la presente invención que contienen al menos un inhibidor según la presente invención y/o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como principio típicamente se administrarán junto con materiales soporte adecuados seleccionados con respecto a la forma deseada de administración, es decir, para la administración en forma de comprimidos, cápsulas (bien rellenas de sólido, rellenas de semisólido o rellenas de líquido), polvos para reconstitución, geles, elixires, gránulos dispersables, jarabes, suspensiones, y similares, y consistentes con prácticas farmacéuticas convencionales. Por ejemplo, para la administración oral en forma de comprimidos o cápsulas, el componente fármaco activo se puede combinar con cualquier soporte farmacéuticamente aceptable no tóxico oral, preferiblemente, con un soporte inerte como lactosa, almidón, sacarosa, celulosa, estearato de magnesio, fosfato dicálcico, sulfato de calcio, talco, manitol, alcohol etílico (cápsulas rellenas de líquido) y similares.

65 Además, también se pueden incorporar aglutinantes, lubricantes, agentes disgregantes y agentes colorantes adecuados en el comprimido o cápsula. Los polvos y comprimidos pueden contener desde aproximadamente el 5 hasta aproximadamente el 95% en peso de un inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas según la fórmula I

como se ha enumerado en el presente documento o análogos del mismo o la respectiva sal farmacéuticamente aceptable como principio activo.

5 Los aglutinantes adecuados incluyen almidón, gelatina, azúcares naturales, edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas tal como goma arábica, alginato de sodio, carboximetilcelulosa, polietilenglicol y ceras. Entre los lubricantes adecuados se pueden mencionar ácido bórico, benzoato de sodio, acetato de sodio, cloruro de sodio, y similares.

10 Los disgregantes adecuados incluyen almidón, metilcelulosa, goma guar, y similares.

También se pueden incluir agentes edulcorantes y saborizantes así como conservantes, donde sea apropiado. Los disgregantes, diluyentes, lubricantes, aglutinantes, etc., se discuten en más detalle posteriormente.

15 Además, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden formular en forma de liberación sostenida para proporcionar la liberación de velocidad controlada de uno cualquiera o más de los componentes o principios activos para optimizar el/los efecto(s) terapéutico(s), por ejemplo, actividad antihistamínica y similares. Las formas farmacéuticas adecuadas para la liberación sostenida incluyen comprimidos que tienen capas de velocidades de disgregación variables o matrices poliméricas de liberación controlada impregnadas con los componentes activos y en forma de comprimido o cápsulas que contienen tales matrices poliméricas porosas impregnadas o encapsuladas.

20 Las preparaciones de forma líquida incluyen soluciones, suspensiones, y emulsiones. Como ejemplo, se pueden mencionar soluciones en agua o agua/propilenglicol para inyecciones parenterales o la adición de edulcorantes y opacifantes para soluciones, suspensiones y emulsiones orales. Las preparaciones en forma líquida también pueden incluir para la administración intranasal.

25 Las preparaciones en aerosol adecuadas para la inhalación pueden incluir soluciones y sólidos en forma de polvo, que pueden estar presentes en combinación con un soporte farmacéuticamente aceptable tal como un gas inerte, comprimido, por ejemplo, nitrógeno.

30 Para preparar supositorios, una cera de bajo punto de fusión, tal como una mezcla de glicéridos de ácidos grasos como manteca de cacao de funde primero, y el principio activo se dispersa después homogéneamente en la misma, por ejemplo, agitando. La mezcla fundida, homogénea se vierte después en moldes de tamaño conveniente, se deja enfriar, y mediante ello se solidifica.

35 También se incluyen preparaciones en forma sólida, que se pretende que se conviertan, poco antes de su uso, a preparaciones en forma líquida para la administración bien oral o parenteral. Tales formas líquidas incluyen soluciones, suspensiones, y emulsiones.

40 Los compuestos según la presente invención también se pueden administrar por vía transdérmica. Las composiciones transdérmicas pueden tener la forma de una crema, una loción, un aerosol y/o una emulsión y pueden estar incluidas en un parche transdérmico de tipo matriz o depósito como se conoce en la técnica para este fin.

45 El término cápsula como se enumera en el presente documento se refiere a un recipiente o envase hecho, por ejemplo, de metilcelulosa, alcoholes polivinílicos, o gelatinas desnaturalizadas o almidón para sostener o contener composiciones que comprenden el/los principio(s) activo(s). Las cápsulas con caparazones duros típicamente están hechas de gelatinas mezcladas o de resistencia en gel relativamente alta de huesos o piel de cerdo. La cápsula misma puede contener pequeñas cantidades de colorantes, agentes opacifantes, plastificantes y/o conservantes.
50 Por comprimido se entiendo una forma farmacéutica sólida comprimida o moldeada que comprende los principios activos con diluyentes adecuados. El comprimido se puede preparar por compresión de mezclas o granulaciones obtenidas por granulación húmeda, granulación seca, o por compactación que conoce bien el experto en la materia.

55 Geles orales se refiere a los principios activos dispersados o solubilizados en una matriz semisólida hidrofílica.

Polvos para reconstitución se refiere a mezclas en polvo que contienen los principios activos y diluyentes adecuados que se pueden resuspender, por ejemplo, en agua o zumo.

60 Los diluyentes adecuados son sustancias que habitualmente constituyen la mayor parte de la composición o forma farmacéutica. Los diluyentes adecuados incluyen azúcares tal como lactosa, sacarosa, manitol, y sorbitol, almidones derivados de trigo, maíz, arroz, y patata, y celulosas tal como celulosa microcristalina. La cantidad de diluyente en la composición puede variar desde aproximadamente el 5 hasta aproximadamente el 95% en peso de la composición total, preferiblemente desde aproximadamente el 25 hasta aproximadamente el 75% en peso, y más preferiblemente desde aproximadamente el 30 hasta aproximadamente el 60% en peso.

65

El término disgregantes se refiere a materiales añadidos a la composición para apoyar la disgregación y liberación de los ingredientes farmacéuticamente activos de un medicamento. Los disgregantes adecuados incluyen almidones, almidones modificados "solubles en agua fría" tal como carboximetilalmidón sódico, gomas naturales y sintéticas tal como goma garrofin, karaya, guar, tragacanto y agar, derivados de celulosa tal como metilcelulosa y carboximetilcelulosa de sodio, celulosas microcristalinas, y celulosas microcristalinas entrecruzadas tal como croscarmelosa de sodio, alginatos tal como ácido alginico y alginato de sodio, arcillas tal como bentonitas, y mezclas efervescentes. La cantidad de disgregante en la composición puede variar desde aproximadamente el 2 hasta aproximadamente el 20% en peso, de la composición, más preferiblemente, desde aproximadamente el 5 hasta aproximadamente el 10% en peso.

Los aglutinantes son sustancias que unen o "pegan" partículas de polvo y las hacen cohesivas formando gránulos, sirviendo por tanto como el "adhesivo" en la formulación. Los aglutinantes añaden fuerza cohesiva ya disponible en el diluyente o agente de carga. Los aglutinantes adecuados incluyen azúcares tal como sacarosa, almidones derivados de trigo maíz arroz y patata, gomas naturales tal como goma arábica, gelatina y tragacanto, derivados de algas tal como ácido alginico, alginato de sodio y alginato de calcio y amonio, materiales de celulosa tal como metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio e hidroxipropilmetilcelulosa, polivinilpirrolidona, y compuestos inorgánicos, tal como silicato de magnesio y aluminio. La cantidad de aglutinante en la composición puede variar desde aproximadamente el 2 hasta aproximadamente el 20% en peso de la composición, preferiblemente desde aproximadamente el 3 hasta aproximadamente el 10% en peso, y más preferiblemente desde aproximadamente el 3 hasta aproximadamente el 6% en peso.

Lubricantes se refiere a una clase de sustancias que se añaden a la forma farmacéutica para permitir que los gránulos del comprimido etc., después de ser comprimidos se liberen del molde o troquel reduciendo la fricción o desgaste. Los lubricantes adecuados incluyen estearatos metálicos tal como estearato de magnesio, estearato de calcio, o estearato de potasio, ácido esteárico, ceras de alto punto de fusión, y otros lubricantes solubles en agua tal como cloruro de sodio, benzoato de sodio, acetato de sodio, oleato de sodio, polietilenglicoles y D,L-leucina. Los lubricantes habitualmente se añaden en el último paso antes de la compresión, ya que deben estar presentes en la superficie de los gránulos. La cantidad de lubricante en la composición puede variar desde aproximadamente el 0,2 hasta aproximadamente el 5% en peso de la composición, preferiblemente desde aproximadamente el 0,5 hasta aproximadamente el 2% en peso, y más preferiblemente desde aproximadamente el 0,3 hasta aproximadamente el 1,5% en peso de la composición.

Los deslizantes son materiales que previenen apelmazamiento de los componentes de la composición farmacéutica y mejoran las características de flujo del granulado de modo que el flujo sea suave y uniforme. Los deslizantes adecuados incluyen dióxido de silicón y talco.

La cantidad de deslizante en la composición puede variar desde aproximadamente el 0,1 hasta aproximadamente el 5% en peso de la composición final, preferiblemente desde aproximadamente el 0,5 hasta aproximadamente el 2% en peso.

Los agentes colorantes son excipientes que proporcionan color a la composición o la forma farmacéutica. Tales excipientes pueden incluir colorantes de grado alimentario adsorbidos en un adsorbente adecuado tal como arcilla u óxido de aluminio. La cantidad de agente colorante puede variar desde aproximadamente el 0,1 hasta aproximadamente el 5% en peso de la composición, preferiblemente desde aproximadamente el 0,1 hasta aproximadamente el 1% en peso.

La presente invención se refiere a la administración de composiciones que contienen como principio activo un inhibidor de quinasa dependiente de ciclina a un sujeto en necesidad de ello para el tratamiento de cualquier tipo de dolor, trastornos inflamatorios, enfermedades inmunológicas, enfermedades proliferativas, enfermedades cardiovasculares o enfermedades neurodegenerativas.

"Un sujeto en necesidad de ello" comprende un animal, preferiblemente un mamífero, y lo más preferiblemente un ser humano, que se espera experimente cualquier tipo de dolor, trastornos inflamatorios, enfermedades inmunológicas, enfermedades proliferativas, enfermedades cardiovasculares o enfermedades neurodegenerativas en el futuro próximo o que tiene experiencia continua de dichas afecciones. Por ejemplo, tal animal o ser humano puede tener una afección continua que está causando dolor actualmente y es probable que continúe causando dolor, o el animal o ser humano ha estado, está o estará soportando un procedimiento o suceso que habitualmente tienen consecuencias dolorosas. Las afecciones dolorosas crónicas tal como hiperalgesia neuropática diabética y enfermedades vasculares de colágeno son ejemplos del primer tipo; el trabajo dental, particularmente en un área de inflamación o daño nervioso, y la exposición a toxinas (incluyendo exposición a agentes quimioterapéuticos) son ejemplos del último tipo.

Para alcanzar el efecto terapéutico deseado, el respectivo inhibidor de quinasa dependiente de ciclina se tiene que administrar en una cantidad terapéuticamente eficaz.

El término “cantidad terapéuticamente eficaz” se usa para indicar una cantidad de un compuesto activo, o agente farmacéutico, que provoca la respuesta biológica o médica indicada. Esta respuesta se puede producir en un tejido, sistema, animal o ser humano que es buscada por un investigador, veterinario, médico u otro clínico, e incluye el alivio de los síntomas de la enfermedad que se trata. En el contexto de la presente invención, una cantidad terapéuticamente eficaz comprende, por ejemplo, una cantidad que reduce el dolor, en particular dolor inflamatorio o neuropático. Específicamente, una cantidad terapéuticamente eficaz indica una cantidad que ejerce un efecto hipoalgésico en el sujeto que se va a tratar.

Tal cantidad eficaz variará de sujeto a sujeto dependiendo de la sensibilidad normal del sujeto a, por ejemplo, dolor, su altura, peso, edad y salud, la fuente del dolor, el modo de administrar el inhibidor de las CDK, el inhibidor particular administrado, y otros factores. Como resultado, es aconsejable determinar empíricamente una cantidad eficaz para un sujeto particular en un conjunto particular de circunstancias.

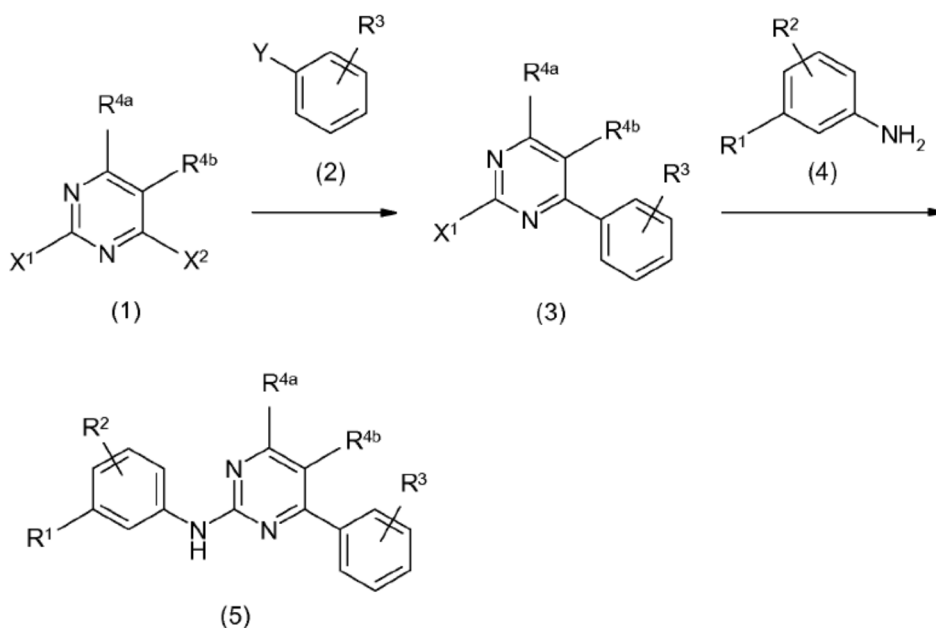
La invención se ilustra además mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Todos los reactivos se compraron de ACROS Organics, Aldrich, Lancaster, Maybridge y Boron Molecular.

Los análisis de LC/MS para los compuestos se hicieron en Suveyor MSQ (Thermo Finnigan, EEUU) con ionización APCI.

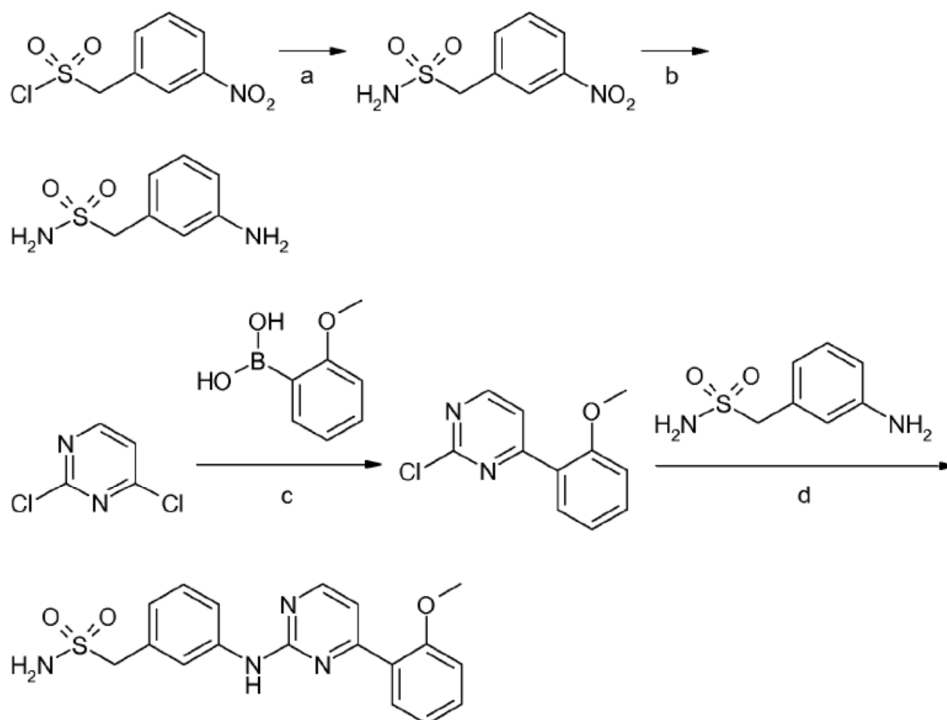
Los compuestos de la invención se pueden preparar por cualquier método conocido en la técnica. Una ruta sintética conveniente se muestra a continuación en el esquema 1:



Esquema 1

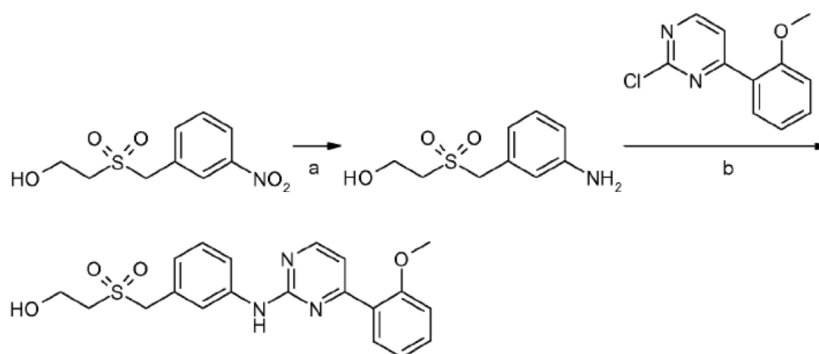
El acoplamiento cruzado catalizado por paladio de ácidos fenilborónicos (2, Y = B(OH)₂) o sus derivados con pirimidinas 2,4-dihalogenadas (1, por ejemplo, X¹ = X² = Cl) da 2-halogenopirimidinas 4-ariladas (3), que se aminan con anilinas (4).

Ejemplo 1: Síntesis de {3-[4(2metoxi-fenil)-pirimidin-2-ilamino]-fenil}-metanosulfonamida (Compuesto 1)



- 5 a. Se disolvió cloruro de (nitrofenil)metanosulfonilo (4,17 g, 20 mM) (Ziegler, Carl y Sprague, James M., J. of Org. Chem. (1951), 16, 621-5) en acetonitrilo (20 ml), se añadió amoniaco concentrado (20 ml), saturado con carbonato de amonio, y la mezcla se agitó vigorosamente durante 1 h a temperatura ambiente. Después el acetonitrilo se evaporó, el residuo se diluyó con agua fría (20 ml) produciendo la formación de un precipitado que se filtró y se lavó con agua (2x25 ml) y éter y se secó a presión reducida. Rendimiento de (3-nitro-fenil)metanosulfonamida: 3,5 g (80%).
- 10 b. Se hidrogenó (3-nitrofenil)metanosulfonamida (3,5 g, 16 mM) sobre níquel Raney (0,5 g) a 50°C y 70 psi durante 4 horas. Después el catalizador se filtró y lavó con metanol templado. Los filtrados combinados se evaporaron para dar 2,83 g (95%) de (3-amino-fenil)-metanosulfonamida.
- 15 c. Se disolvieron 4,6-dicloro-pirimidina (6 g, 0,04 mol) (Ranganathan, Subramania et al., Proceedings - Indian Academy of Sciences, Chemical Sciences (1994), 106(5), 1051-70. Maggiali, C. et al., Farmaco, Edizione Scientifica (1988), 43(3), 277-91. Gershon, Herman et al., J. of Med. Chem. (1963), 6, 87-9) y ácido (2-metoxi-fenil)-borónico (4,37 g, 0,029 mol) en dimetoxietano (120 ml) y agua (18 ml). A esta solución se añadieron NaHCO₃ (6,72 g, 0,08 mol), PdCl₂(PPh₃)₂ (0,84 g) y se dejó a reflujo durante 7 horas (control por TLC). A continuación la mezcla se enfrió a temperatura ambiente y los solventes se eliminaron a presión reducida. El sólido crudo obtenido se disolvió en diclorometano (100 ml), se lavó con agua (1 x 100 ml), la fase orgánica se separó, se secó sobre K₂CO₃, se filtró y el solvente se eliminó a presión reducida. El sólido obtenido se purificó adicionalmente por cromatografía rápida (eluyente diclorometano) para dar un producto crudo que se cristalizó de hexano para dar 2-cloro-4-(2-metoxi-fenil)-pirimidina (4,7 g, 73%).
- 25 d. Una solución de 2-cloro-4-(2-metoxi-fenil)-pirimidina (0,882 g, 0,004 mol) y (3-amino-fenil)-metanosulfonamida (0,865 g, 0,005 mol) en DMF (12 ml) se agitó durante 2 horas a 80°C (control por TLC). El solvente se eliminó a presión reducida para dar {3-[4-(2-metoxi-fenil)-pirimidin-2-ilamino]-fenil}-metanosulfonamida.

30 Ejemplo 2: Síntesis de 2-{3-[4-(2-metoxi-fenil)-pirimidin-2-ilamino]-fenil}metanosulfonil}-etanol (Compuesto 9)

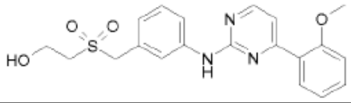
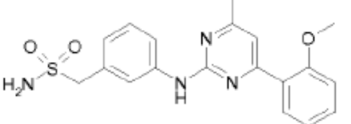
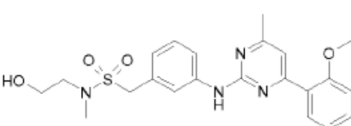
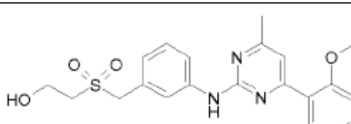
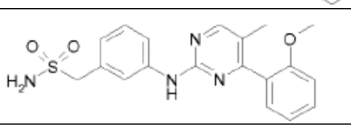
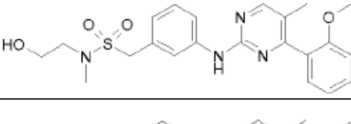
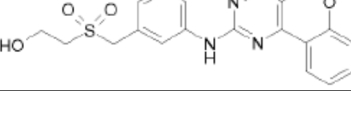


5 a. Se colocó 2-(3-nitro-fenilmetanosulfonyl)-etanol (0,8 g, 3,3 mmol) (Harms, Wolfgang et al., Ger. Offen. (1995), documento DE 4402189 A1, 19950727) en un matraz de hidrogenación y se disolvió en metanol (100 ml). Después de la adición de níquel Raney (200 mg), la mezcla se dejó agitar a una presión de hidrógeno de 70 psi a 50°C durante 4 horas. A continuación el catalizador se eliminó por filtración y se lavó con metanol. Las soluciones de metanol se combinaron y el solvente se evaporó a presión reducida. El producto crudo se purificó por cromatografía rápida (sistema eluyente: diclorometano/metanol - 10/1), las fracciones deseadas se combinaron, secaron y evaporaron. El residuo se lavó con éter dietílico para dar 2-(3-amino-fenilmetanosulfonyl)-etanol (0,51, rendimiento del 73%).

15 b. Una solución de 2-(3-amino-fenilmetanosulfonyl)-etanol (0,215 g, 1 mmol) y 2-cloro-4-(2-metoxi-fenil)-pirimidina (0,22 g, 1 mmol) en DMF (3 ml) se agitó durante 2 horas a 80°C (control por TLC). El solvente se eliminó a presión reducida para dar un residuo oleaginoso que se cristalizó de isopropanol dando 2-{3-[4-(2-metoxi-fenil)-pirimidin-2-ilamino]-fenil}-metanisulfonyl)-etanol (0,3 g, 75%).

En analogía, se han sintetizado los siguientes compuestos usando los materiales de partidas correspondientemente sustituidos.

Compuesto No.	Estructura	Nombre de la IUPAC	Ms m/z
1		{3-[4-(2-Metoxi-fenil)-pirimidin-2-ilamino]-fenil}-metanosulfonamida	371 (M+1)
2		{3-[4-(2-Isopropoxi-fenil)-pirimidin-2-ilamino]-fenil}-metanosulfonamida	399 (M+1)
3		C-{3-[4-(2-Metoxi-fenil)-pirimidin-2-ilamino]-fenil}-N,N-dimetilmetanosulfonamida	399 (M+1)
4		C-{3-[4-(2-Metoxi-fenil)-pirimidin-2-ilamino]-fenil}-N-metil-metanosulfonamida	385 (M+1)
5		{3-[4-(4-Fluoro-2-metoxi-fenil)-pirimidin-2-ilamino]-fenil}-metanosulfonamida	389 (M+1)
6		N-Ciclopropil-C-{3-[4-(2-metoxi-fenil)-pirimidin-2-ilamino]-fenil}-metanosulfonamida	411 (M+1)
7		N-(2-Hidroxi-etil)-C-{3-[4-(2-metoxi-fenil)-pirimidin-2-ilamino]-fenil}-metanosulfonamida	415 (M+1)
8		N-(2-Hidroxi-etil)-C-{3-[4-(2-metoxi-fenil)-pirimidin-2-ilamino]-fenil}-N-metil-metanosulfonamida	429 (M+1)

9		2-{3-[4-(2-Metoxi-fenil)-pirimidin-2-ilamino]-fenilmetanosulfonil}-etanol	400 (M+1)
10		{3-[4-(2-Metoxi-fenil)-6-metil-pirimidin-2-ilamino]-fenil}-metanosulfonamida	367,9 (M+1) 365,6 (-MS)
11		N-(2-Hidroxi-etil)-C-{3-[4-(2-metoxi-fenil)-6-metil-pirimidin-2-ilamino]-fenil}-N-metil-metanosulfonamida	444 (M+1)
12		2-{3-[4-(2-Metoxi-fenil)-6-metil-pirimidin-2-ilamino]-fenilmetanosulfonil}-etanol	413,9 (M+1)
13		{3-[4-(2-Metoxi-fenil)-5-metil-pirimidin-2-ilamino]-fenil}-metanosulfonamida	384,9 (M+1)
14		N-(2-Hidroxi-etil)-C-{3-[4-(2-metoxi-fenil)-5-metil-pirimidin-2-ilamino]-fenil}-N-metil-metanosulfonamida	444 (M+1)
15		2-{3-[4-(2-Metoxi-fenil)-5-metil-pirimidin-2-ilamino]-fenilmetanosulfonil}-etanol	414, 416 (M+1)

Ejemplo 3

I. Modelos animales de comportamiento para el análisis de dolor inflamatorio y neuropático

- 5 Se conocen varios modelos animales para el análisis del dolor inflamatorio y neuropático, Dichos modelos comparten la característica común de que después de, por ejemplo, inducción de una lesión en un nervio (por ejemplo lesión del nervio conservado, SNI) o después de exponer animales experimentales a un estímulo nocivo (por ejemplo, inyección de formalina o carragenano), los signos del dolor inducido por dichas intervenciones se miden por componentes de comportamiento cuantificables tal como, por ejemplo, umbral de retirada de la pata a estimulación mecánica con filamentos de von Frey (o a la estimulación térmica usando una fuente laser o comportamiento de lamerse). Estas reacciones se interpretan como que son equivalentes a alodinia mecánica y térmica (hipersensibilidad a estímulos mecánicos) o hiperalgesia en seres humanos.
- 10 El modelo de la lesión del nervio conservado (modelo SNI, desarrollado por Decosterd y Woolf (2000), véase la figura 1) se caracteriza por la inducción de lesiones nerviosas clínicamente relevantes y después de la intervención quirúrgica, experimentos de comportamiento posteriores (por ejemplo, ensayo de von Frey). Dicho modelo constituye un modelo de lesión nerviosa común que consiste en la ligación y sección de dos ramas del nervio ciático (es decir, los nervios ciático poplíteo interno y safeno interno) dejando el nervio safeno externo intacto. El modelo de
- 15 SNI produce cambios tempranos (menos de 24 horas), prolongados y sustanciales en la sensibilidad mecánica y al frío que mimetizan estrechamente las características del dolor neuropático clínico. Se ha mostrado que los animales con estos tipos de lesión nerviosa desarrollan sensaciones de dolor anormales e hipersensibilidad a estímulos mecánicos (alodinia) similares a los descritos por pacientes de dolor neuropático.
- 20 Alternativamente, el ensayo de formalina es un modelo de comportamiento válido y fiable de nocicepción en dolor inflamatorio y neuropático. Es sensible a varias calases de fármacos analgésicos (Hunskar S, Hole K, Pain. 1987 Jul;30(1):103-14.) El estímulo nocivo consiste en una inyección de 10 µl de formalina diluida (2% en solución salina) bajo la piel de la superficie dorsal de la pata posterior izquierda (subcutánea o interplantar en la pata posterior izquierda). La respuesta es lamer y encoger la pata inyectada.
- 25 Para el ensayo del carragenano se aplica una inyección subcutánea de 25 µl de carragenano al 1% (en solución salina) en una única pata posterior (pata ipsilateral) de ratones. La posterior inflamación produce hinchazón de larga duración e hipersensibilidad (contra estímulos mecánicos y térmicos) de la pata. El ensayo del carragenano es un ensayo estándar de laboratorio para predecir actividad antiinflamatoria de compuestos de prueba. Se usan medidas

de edema y ensayo de Hargreaves (retirada de las patas debido a estimulación térmica a través de una fuente de luz) para la lectura.

5 Respecto a la presente invención, el efecto de la administración de compuestos inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (CDK) según la fórmula I sobre el desarrollo de dolor inflamatorio y neuropático se ensaya en un modelo de SNI, en un ensayo de carragenano y uno de formalina. El procedimiento experimental y los resultados se describen en detalle a continuación.

10 Ejemplo 4

10 A. *Lesión del nervio conservado (SNI) - Modelo de dolor neuropático crónico*

15 Como se ha esbozado anteriormente el modelo de la lesión del nervio conservado (véase la figura 1) implica una lesión de dos de las tres ramas terminales del nervio ciático (nervios ciático poplíteo interno y safeno interno) de animales experimentales, dejando el nervio safeno externo intacto. La SNI produce alodinia mecánica y térmica en el territorio de la piel del nervio safeno externo no lesionado (Decosterd y Woolf, Pain 2000; 87:149-158. (2) Tsujino et al., Mol. Cel. Neurosci. 2000; 15:170-182).

20 1. Inducción de lesión del nervio conservado (lesión nerviosa) en ratones de tipo salvaje

Se anestesiaron ratones de tipo salvaje (cepa C3HeB/FeJ) (edad, sexo y peso coincidentes) con Hypnorm (0,315 mg/ml de citrato de fentanilo + 10 mg/ml de fluanisona; Janssen)/Hypnovel (5 mg/ml de midazolam; Roche Applied Sciences)/agua en una proporción de 1:1:2 a 4 µl/g antes de preparación quirúrgica.

25 Posteriormente, se hizo una incisión con precauciones asépticas en la pata trasera derecha ipsilateral de todos los ratones justo por encima del nivel de la rodilla, exponiendo las tres ramas terminales el nervio ciático: los nervios safeno interno, ciático poplíteo interno y safeno externo. Los nervios safeno interno y ciático poplíteo interno se ligaron fuertemente con seda 7/0 y se seccionaron distales a la ligación eliminando ≈2 mm de fragmento de nervio distal. La rama safena externa se dejó sin tocar durante el procedimiento (denominado en el presente documento "SNI ipsi"). El músculo que recubre y la piel se suturaron, y los animales se dejaron recuperar y para permitir la cicatrización. En los mismos ratones las ramas del nervio ciático de la pata trasera izquierda contralateral se expusieron pero no se lesionaron (indicado aquí "SNI contralateral"). Los ratones que se sometieron a lesión de nervio conservado se indican de aquí en adelante "ratones SNI".

35 2. Administración de compuestos que inhiben CDK a ratones SNI

Después de la recuperación de la cirugía y la cicatrización, los ratones SNI recibieron inyecciones orales (v.o) de compuestos que inhiben CDK.

40 Se administraron 30 mg/kg de un inhibidor de CDK, disuelto en 400 µl de hidroxipropilcelulosa al 2%; ácido láctico al 0,25% (solución al 85%) mediante una aplicación por vía oral 30 minutos antes de las medidas de von Frey (alodinia mecánica). Como control negativo, se administró la misma cantidad de vehículo (400 µl) de hidroxipropilcelulosa al 2%; ácido láctico al 0,25% (solución al 85%) mediante una aplicación por vía oral única 30 minutos antes de las medidas de von Frey.

45 La inyección de inhibidor o vehículo, y posteriores de medidas del umbral de retirada de la pata a estimulación mecánica en ensayos de von Frey se realizaron el 107 después de SNI. Las respuestas nociceptivas reflejas a la estimulación mecánica se midieron en un ensayo de von Frey 30 minutos después de cada inyección.

50 El efecto de la administración de inhibidores de CDK a ratones SNI sobre el desarrollo de alodinia mecánica se analizó en un ensayo de von Frey, como se describe a continuación.

55 3. Ensayo de comportamiento de ratones SNI después de la administración de compuestos que inhiben CDK (ensayo de von Frey)

Los ratones que se sometieron a SNI y posterior administración de los compuestos de la presente invención se probaron para signos de alodinia mecánica tras la lesión nerviosa y tras la administración en un ensayo de von Frey (Decosterd y Woolf, Pain 2000; 87:149-158). Este ensayo determina el umbral mecánico en el que un estímulo, que normalmente no es doloroso, es reconocido por un animal como incómodo o doloroso. Se establecieron líneas basales de SNI ipsi y SNI contra, respectivamente.

Los umbrales mecánicos de ratones SNI se cuantificaron usando el método arriba-abajo basado en Chaplan et al. (1994) y Malmberg y Basbaum (1998).

65 Los ratones se colocaron en cilindros de plexiglás de aproximadamente 9,5 cm de diámetro, 14 cm de altura con cuatro agujeros de ventilación hacia arriba y una tapa de plexiglás. Los cilindros se colocaron en una superficie de

5 malla elevada (cuadrados de 7x7 cm). Antes del día del ensayo, los ratones se aclimataron a los cilindros de prueba durante 1-2 horas. El día del ensayo los ratones se aclimataron a los cilindros durante aproximadamente una hora, en donde el tiempo de aclimatación depende de factores tales como la cepa del ratón y el número de veces que se habían ensayado previamente. En general, el ensayo puede empezar una vez que los ratones están calmados y dejan de explorar el nuevo medio.

10 Para ensayar los ratones, se usaron filamentos 2,44, 2,83, 3,22, 3,61, 3,84, 4,08 y 4,31 (intervalo de fuerza = de 0,04 a 2,0 g). El filamento 3,61 mN se aplicó primero. Dicho filamento se aplicó suavemente a la superficie plantar de una pata, se dejó doblar, y se mantuvo en posición durante 2-4 segundos. Cuando se produjo una respuesta positiva al estímulo (reacción de flexión) se aplicó el siguiente filamento de von Frey más débil; cuando se produjo una respuesta negativa se aplicó la siguiente fuerza más fuerte. La prueba siguió hasta que se hubo obtenido la respuesta a 4 estímulos más después del primer cambio en respuesta. La fuerza más alta probada fue 4,31. El umbral de valor de corte fue 2 g.

15 La serie de puntuaciones (es decir, "reacción de flexión" y "sin reacción") y la fuerza del último filamento aplicado se usaron para determinar el umbral mecánico como se describe en Chaplan et al., Journal of Neuroscience Methods. 53(1):55-63, Jul. 1994. El umbral determinado es ese al que se esperaría que el animal respondiera el 50% de las veces. Los ratones se sacrificaron después de lograr las medidas de von Frey.

20 4. Efectos de la administración de compuestos que inhiben CDK en el desarrollo de dolor neuropático

25 Se administraron compuestos que inhiben CDK a ratones SNI como se ha descrito anteriormente. Se realizaron medidas de von Frey en patas ipsilaterales y contralaterales de los animales el día 107 después de la cirugía como se ha descrito anteriormente. Sin tratamiento farmacológico los ratones SNI muestran una alodinia estable después de la cirugía SNI. Los animales tratados con compuesto muestran un aumento significativo de los valores umbral lo que indica sensibilidad reducida a estímulos mecánicos (alodinia reducida). La observación de alodinia reducida significa que un compuesto que inhibe CDK es eficaz como un fármaco hipoalgesico en modelos de dolor neuropático crónico.

30 Ejemplo 5

Ensayo de formalina - Modelo de procesos de inflamación/ dolor inflamatorio y neuropático crónico

35 El ensayo de formalina en ratones es un modelo de comportamiento válido y fiable de nocicepción y es sensible a varias clases de fármacos analgésicos (Hunskar S, Hole K, Pain. 1987 Jul;30(1):103-14.) El estímulo nocivo consiste en una inyección de 10 µl de formalina diluida (2% en solución salina) subcutánea o intraplantar en la pata posterior izquierda. La respuesta es lamer y encoger la pata inyectada. La respuesta muestra dos fases, que reflejan diferentes partes del proceso inflamatorio (Abbott et al 1995), una fase temprana/aguda 0-5 minutos después de la inyección, y una fase tardía/crónica 5-30 después de la inyección. El siguiente protocolo describe una posible manera para realizar el experimento.

1. Inyección de formalina y administración del compuesto que inhibe CDK

45 Se usaron ratones de tipo salvaje de edad, sexo y peso coincidente (C3HeB/FeJ) en este ensayo. Antes de la inyección de formalina los animales se subdividen al azar en grupos experimentales de 10 animales cada uno. Treinta minutos antes de la inyección de formalina, se puede administrar una dosis adecuada de un inhibidor de CDK disuelto en (400 µl) de hidroxipropilcelulosa al 2%; ácido láctico al 0,25% (solución al 85%) mediante inyección i.p. Similarmente, se puede administrar inhibidor de Ik quinasa (IKK) (30 mg/kg) en (400 µl) de hidroxipropilcelulosa al 2%; ácido láctico al 0,25% (solución al 85%) (control positivo), o vehículo solo (400 µl) de hidroxipropilcelulosa al 2%; ácido láctico al 0,25% (solución al 85%) (control negativo) mediante inyección i.p. 30 minutos antes de la inyección de formalina.

50 Para la inyección de formalina el ratón se sujeta con una toalla de papel, para evitar problemas de la inyección por los movimientos. La pata posterior inyectada se mantiene entre el dedo pulgar y el índice y se inyectan 10 µl de formalina (2%) por vía subcutánea (s.c.) entre los dos rodetes frontales en la pata posterior plantar usando una jeringuilla de Hamilton. El comportamiento de los ratones tratados con formalina e inhibidor se analiza como se describe a continuación.

2. Análisis de comportamiento de ratones después de la inyección de formalina y la administración de compuesto que inhibe CDK

60 El comportamiento de los ratones tratados con formalina, es decir, lamer y encoger, se sigue mediante un sistema de seguimiento automatizado (Ethovision 3.0 Color Pro, Noldus, Wageningen, Países Bajos) durante un periodo de tiempo definido: la medida se inicia 5 minutos después de la inyección de formalina y se termina 30 minutos después de la inyección de formalina. Este marco de tiempo cubre la fase II de la nocicepción inducida por formalina (dolor), que es hiperalgesia.

Se usan dos colorantes diferentes para marcar tópicamente la pata posterior inyectada (colorante amarillo (Lumogenyellow; BASF Pigment, Colonia, Alemania) y la pata contralateral (colorante azul (Lumogenviolet; Kremer Pigmente, Aischstetten, Alemania) respectivamente. Para determinar el comportamiento de lamer, los ratones se siguen con una cámara CCD. Después de seguir y registrar, el video se analiza usando el software EthoVision (Ethovision 3.0 Color Pro, Noldus, Wageningen, Países Bajos) o por análisis manual. Los tamaños de las manchas fluorescentes y las intensidad de fluorescencia se midieron y se calculó la reducción del tamaño de la mancha fluorescente a través del lamido y mordida. La intensidad del tiempo de lamido total se calculó automáticamente por comparación de la reducción del tamaño de la mancha de patas tratadas frente a sin tratar.

Como otra variante de la lectura del ensayo el comportamiento de lamer de los animales individuales se siguió manualmente basado en ficheros de video. Se registraron los tiempos de lamido durante 30 minutos después de la inyección de formalina y se subdividió por tres zonas de lamido diferentes (dorso, plantar, dedos). Los tiempos de lamido totales se pueden calcular para cada animal así como cada grupo experimental y usarse como un parámetro para la determinación de la eficacia del compuesto.

Como resultado se encontró que los ratones que recibieron tratamiento con vehículo antes de la inyección de formalina (control negativo) mostraron un tiempo de lamido prolongado y una reducción significativa del tamaño de la mancha fluorescente en la pata tratada con formalina.

En contraste, se pudo observar una reducción en el tiempo de lamido y en consecuencia reducción no significativa del tamaño de la mancha fluorescente de la pata tratada con formalina en los ratones tratados con compuesto de prueba/formalina. El mismo efecto, es decir, una reducción en el tiempo de lamido y un cambio menor en el tamaño de la mancha fluorescente, se observó en ratones control tratados con inhibidor de Ikappa quinasa (IKK; para la función de IKK véase la figura 2, control positivo).

Esta observación es indicativa para la percepción reducida de dolor inflamatorio/inflamatorio crónico en ratones tratados con inhibidor de CDK9 y para un efecto hipoalérgico del compuesto ensayado.

Ejemplo 6

Ensayo de carragenano en ratones - Modelo de inflamación y dolor inflamatorio

El modelo de edema en la pata inducido por carragenano es un ensayo estándar de laboratorio usado para predecir la actividad antiinflamatoria y la reducción de la percepción del dolor inducido por inflamación de los compuestos respectivos. El siguiente protocolo describe una posible manera de realizar el experimento.

La medida básica constituye en la medida de edema e hipersensibilidad mecánica así como térmica en respuesta a irritantes, tal como carragenano.

La inflamación y el dolor inflamatorio resultante se inducen por inyección subcutánea de 25 µl de carragenano al 1% (en solución salina) en la pata trasera de ratones (pata ipsilateral). Cada grupo de 10 ratones recibe la administración de un compuesto según la fórmula I, 30 mg/kg de peso corporal, vehículo ((400 µl) de hidroxipropilcelulosa al 2%; ácido láctico al 0,25% (solución al 85%)) y solución salina (NaCl fisiológica) por inyección i.p. 30 minutos antes de la inyección de carragenano. Las patas contralaterales no recibieron inyección de carragenano.

1.1 Efectos de la administración de un compuesto inhibidor de CDK en ratones tratados con carragenano

El edema en la pata inducido por inyección de carragenano se detecta por tamaño de la pata aumentado medido de dorsal a plantar en la región del metatarso de las patas inyectadas (ipsilateral). Los tamaños de las patas ipsi y contralaterales sirven como marcadores sustitutos para inflamación y se miden en varios puntos temporales después de la inyección de carragenano: antes de la inyección (-1), 2 h (2), 3 h (3), 4 h (4), 5 h (5), 6 h (6), 24 h (24) después de la inyección.

El tamaño de la pata de todos los ratones puede aumentar, por ejemplo de 2 a 3 mm (+10%) en la primera hora después de la inyección de carragenano, independiente del tipo de sustancia de tratamiento inyectada 30 minutos antes del carragenano. Durante la evolución temporal, los ratones que recibieron tratamiento con un compuesto inhibidor de CDK antes de la inyección de carragenano pueden mostrar una reducción del edema hasta 24 horas después de la inyección de carragenano: el aumento en el tamaño de la pata podría caer, por ejemplo, desde el 10% hasta el 8%. En contraste, el tamaño de la pata de los ratones control podría aumentar en el 30% de media en este tiempo. Después de 24 h tras la inyección de carragenano, el tamaño de todas las patas tratadas con carragenano puede aumentar hasta alcanzar su máximo 96 horas después de la inyección.

Como lectura del ensayo de carragenano, se puede realizar un ensayo de Hargreaves, en donde dicho ensayo permite la medida de la sensibilidad térmica a calor radiante. El ensayo de Hargreaves (Hargreaves et al., 1988)

mide la sensibilidad nociceptiva en un animal que se mueve libremente enfocando una fuente de calor radiante en la superficie plantar de la pata trasera del animal según está situado en una cámara de plexiglás. Específicamente, el lado inferior de una pata se expone a una fuente luminosa, que genera una temperatura de, por ejemplo, 55°C. La sensibilidad térmica se mide como latencia entre el inicio de la exposición y llevar/arrastrar la pata expuesta.

Los ratones tratados con un inhibidor de CDK9 como se divulga en el presente documento y carragenano, o con naproxeno y carragenano, o con solvente y carragenano, respectivamente, se someten al ensayo de Hargreaves. Los ratones tratados con un inhibidor de CDK y carragenano podrían mostrar una latencia más larga, comparados con los ratones control negativo. Esta observación sería indicativa para un efecto hipoalgésico de los inhibidores de CDK como se divulga en el presente documento.

Ejemplo 7

Ensayo de carragenano en ratas - Modelo de inflamación y dolor inflamatorio

A continuación se representa una posible manera de realizar el ensayo del carragenano en ratas.

Dicho ensayo detecta actividad analgésica/antiinflamatoria en ratas con dolor inflamatorio, según el protocolo descrito por Winter et al (Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 111, 544-547, 1962).

Se inyectan ratas (200-250 g) con una suspensión de carragenano en la superficie inferior de la pata posterior derecha (0,75 mg por pata en 0,05 ml de solución salina fisiológica). Dos horas después las ratas se someten consecutivamente a estimulación táctil y térmica de ambas patas posteriores.

Para la estimulación táctil, el animal se coloca bajo una caja de plástico acrílico invertida (18 x 11,5 x 13 cm) en un suelo de rejilla. La punta de una sonda electrónica de von Frey (Bioseb, Modelo 1610) se aplica después con fuerza creciente primero a la pata posterior no inflamada y después a la inflamada y la fuerza requerida para inducir la retirada de la pata se registra automáticamente. Este procedimiento se lleva a cabo 3 veces y se calcula la fuerza media por pata.

Para la estimulación térmica, el aparato (Ugo Basile, Referencia: 7371) consiste en cajas de plástico acrílico individuales (17 x 11 x 13 cm) colocadas sobre una suelo de vidrio elevado. Se coloca una rata en la caja y se deja libre para habituarse durante 10 minutos. A continuación se enfoca una fuente radiante infrarroja móvil (96 ± 10 mW/cm²) primero bajo la pata posterior no inflamada y después la inflamada y se registra automáticamente la latencia de retirada de la pata. Para prevenir daño tisular la fuente de calor se apaga automáticamente después de 45 segundos.

Después de las medidas de comportamiento, el edema en la pata se evalúa midiendo el volumen de cada pata posterior usando un plethismómetro digital (Letica, modelo 7500), que indica desplazamiento de agua (en ml) inducido por inmersión de la pata.

Se estudian 10 ratas por grupo. La prueba se realiza a ciegas.

La sustancia de prueba, tal como un inhibidor de CDK según la fórmula I como se presenta en el presente documento, se evaluará a 2 dosis (10 y 30 mg/kg), administrada por v.o. 60 minutos antes de la prueba, y comparada con un grupo control vehículo.

Morfina (128 mg/kg, v.o.) y ácido acetilsalicílico (512 mg/kg v.o.), administrados en las mismas condiciones experimentales, se usarán como sustancias de referencia.

Por tanto, el experimento incluirá 6 grupos. Los datos se analizarán comparando los grupos tratados con el vehículo control usando pruebas de la t de Student para datos independientes.

Las ratas tratadas con un inhibidor de CDK9 como se divulga en el presente documento y carragenano, o con naproxeno y carragenano, o con solvente y carragenano, respectivamente, se someten a un ensayo de Hargreaves. Las ratas tratadas con un inhibidor de CDK y carragenano deben mostrar una latencia más larga, comparadas con las ratas control negativo. Esta observación sería indicativa para un efecto hipoalgésico de los inhibidores de CDK como se divulga en el presente documento.

Ejemplo 8

A. Ensayo in vivo de LPS (PLS) - Modelo de represión de citoquinas in vivo

Para el modelo de choque séptico inducido por LPS, los ratones recibieron una inyección intraperitoneal (i.p.) de 30 µg de lipopolisacárido bacteriano (LPS; L2630 SIGMA) en solución salina. Dicha iniciación de la cascada de señalización inflamatoria mediada por LPS produce concentraciones crecientes en suero sanguíneo de citoquinas tal

como, por ejemplo, TNF α , IL-6 e IL1 β . Se puede sacar sangre de estos animales a tiempos definidos. Después de ello, el suero se separará y las muestras se pueden almacenar a -80°C hasta que se midan las concentraciones de citoquina usando ensayos ELISA comerciales (AL Moreira et al., Braz J Med Biol Res 1997; 30:1199-1207).

5 Se ha reconocido que los mediadores inflamatorios tal como las citoquinas TNF α , IL-6 e IL1 β pueden contribuir a estados de dolor persistentes así como a trastornos inflamatorios. Después de ser liberados de las células inmunitarias como macrófagos en tejidos periféricos y microglia en el SCN, estos mediadores parecen desempeñar un papel central no solo en dolor inflamatorio y neuropático sino también en trastornos inflamatorios tal como artritis reumatoide (F Marchand et al., Nat Rev Neurosci 2005; 6 (7); 521-532). Por tanto, la inhibición del factor de necrosis tumoral α (TNF α) representa una diana relevante también para el tratamiento de enfermedades inflamatorias [Lavagno et al., Eur J Pharmacol 2004; 501, 199-208].

El ensayo de LPS in vivo se puede usar como un modelo poderoso para abordar la represión de la expresión de citoquinas por tratamientos farmacológicos.

1. Inducción de la expresión de citoquinas en ratones de tipo salvaje

Se inyectaron ratones de tipo salvaje (cepa C3HeB/FeJ) (edad, sexo y peso coincidentes) con 30 μ g de LPS (SIGMA) por vía intraperitoneal. 90 minutos después de la administración de LPS estos animales se anestesiaron con 0,1 ml/10 g de peso corporal de ketamina-rompun (50/20 mg/ml) y se sacó sangre para la preparación de suero a través de punción cardíaca.

2. Administración de compuestos inhibidores de CDK a ratones LPS

25 Los grupos de tratamiento farmacológico (n=4) de ratones LPS recibieron por vía oral (v.o.) inyecciones de compuestos inhibidores de CDK o el vehículo (control negativo), respectivamente.

Se administraron 10 o 30 mg/kg (compuesto por peso corporal) de un inhibidor de CDK, disuelto en carboximetilcelulosa al 1% (SIGMA) como una única dosis v.o. 30 minutos antes de la estimulación con LPS. Se administró vehículo control de la misma manera.

90 minutos (min) después de la estimulación con LPS, se sacaron muestras de sangre de los ratones. Previamente, el tiempo de 90 min se había identificado como el pico de expresión de TNF alfa en este modelo animal mediante un experimento de evolución temporal.

El efecto del tratamiento farmacológico con inhibidores de CDK sobre los niveles de citoquinas en ratones LPS se analizó en ensayos ELISA comerciales como se describe a continuación.

3. Determinación de las concentraciones de citoquinas en suero sanguíneo en ratones LPS después de la administración de compuestos inhibidores de CDK

Se incubaron muestras de sangre (~500 μ l/animal) de los animales LPS en hielo durante 30 min después de la punción cardíaca. Después de ello las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a 13.000 rpm. El suero se separó del coágulo y se almacenó congelado a -80°C.

Las concentraciones en suero de TNF alfa e IL6 en las muestras se midieron usando kits comerciales de ELISA (Natutec) según las instrucciones del fabricante.

4. Efectos de la administración de compuestos inhibidores de CDK sobre la expresión de proteína de citoquinas

Se administraron compuestos a ratones LPS como se ha descrito anteriormente. Se realizaron determinaciones basadas en ELISA de las concentraciones en suero de citoquinas como se ha descrito anteriormente. La comparación de animales tratados con compuestos inhibidores de CDK frente a controles tratados con vehículo mostró un efecto represivo significativo sobre la concentración de proteína TNF α e IL6 en el suero sanguíneo, lo que indica que los compuestos inhibidores de CDK son eficaces como fármacos supresores de las citoquinas TNF alfa e IL6 en modelos de expresión de citoquinas.

Ejemplo 9

A. Ensayo en THP-1 in vitro - Modelo in vitro de inhibición de citoquinas

La línea celular THP-1 humana se puede utilizar como un modelo in vitro de expresión de citoquinas mediada por lipopolisacárido (LPS) o factor de necrosis tumoral α [TNF α].

Las células monocíticas THP-1 (ATCC; TIB-202) se pueden diferenciar a células similares a macrófagos que expresan citoquinas proinflamatorias como TNF α , IL6 e IL1 β tras la inducción con LPS o por TNF α (inducción autocrina) mismo.

5 Se ha reconocido que los mediadores inflamatorios tal como las citoquinas TNF α , IL6 e IL1 β pueden contribuir a estados de dolor persistentes así como a trastornos inflamatorios. Después de ser liberados de las células inmunitarias como macrófagos en tejidos periféricos y microglia en el SNC, estos mediadores parecen desempeñar un papel central no solo en el dolor neuropático e inflamatorio sino también en trastornos inflamatorios tal como artritis reumatoide (F Marchand et al., Nat Rev Neurosci 2005; 6 (7); 521-532). Por tanto la inhibición del factor de necrosis tumoral α (TNF α) representa una diana relevante también en el tratamiento de trastornos inflamatorios [Lavagno et al., Eur J Pharmacol 2004; 501, 199-208].

10 Por tanto, el ensayo in vitro en THP-1 se puede usar como un modelo de cribado poderoso para abordar la inhibición farmacológica de la expresión de citoquinas (U Singh et al, Clin Chem 2005; 51 (12); 2252-6], K Rutault et al., J Biol Chem 2001; 276 (9); 6666-74].

1. Crecimiento y diferenciación de células THP-1

20 Las células THP-1 se hacen crecer en medio RPMI-1640 modificado (ATCC, No. de Cat. 30-2001) suplementado con SFT al 10% y Pen/Strep al 1%. Para los ensayos de inhibición de citoquinas, las células se siembran a una densidad de 5×10^5 células/ml en placas de 6 pocillos en medio de crecimiento estándar suplementado con PMA 100 ng/ml (Sigma, P1585) para inducir la diferenciación a células similares a macrófagos. Después de 24 horas, el medio se sustituye con medio de crecimiento estándar (sin PMA) y las células se incuban durante otras 48 horas para completar la diferenciación.

25 *2. Tratamiento de células THP-1 diferenciadas con compuestos inhibidores de CDK y estimulación con LPS*

30 Después de 72 horas de diferenciación, el medio se sustituye con medio de crecimiento sin suero, y se añaden compuestos inhibidores de CDK así como compuestos de referencia tal como controles positivos y negativos, disuelto cada uno en DMSO, a concentraciones que varían desde 0,5 a 5 μ M (la concentración final de DMSO en el pocillo es 0,1%). Las células se incuban durante 60 minutos con los compuestos antes de la estimulación con LPS 10 ng/ml (Sigma, L2630) durante otras 4-48 horas. Los sobrenadantes se recogen y se ensaya inmediatamente la expresión de citoquinas, por ejemplo, para TNF α , IL6 e IL1 β usando ensayos de ELISA sándwich comercialmente disponibles (eBioscience, No. Cat. 88-7346, 88-7066, 88-7010) o se mantienen congelados a 20°C hasta su evaluación.

35 *3. Determinación de las concentraciones de citoquinas en sobrenadante de THP-1 después de la administración de compuestos inhibidores de CDK*

40 Las concentraciones de TNF α , IL6 e IL1 β en los sobrenadantes del cultivo celular se miden usando kits de ELISA comerciales (eBioscience) según las instrucciones del fabricante.

45 *4. Efectos del tratamiento con compuestos inhibidores de CDK sobre la expresión de proteína de citoquinas en sobrenadantes de células THP-1*

Se administraron compuestos inhibidores de CDK # 1, 5, 6, 8 y 9 a células THP-1 diferenciadas en triplicados como se ha descrito anteriormente (véase la sección 2). Después de 60 minutos de preincubación con el compuesto de prueba o referencia (SB203580, un inhibidor de p38 y BMS345541, un inhibidor de IKK) solo, las células se estimularon con LPS. Después de la incubación durante 4-48 horas, los sobrenadantes se recogieron y se realizaron determinaciones de las concentraciones de citoquinas en sobrenadantes basadas en ELISA como se describe en la sección 3, anteriormente.

50 La comparación de las células tratadas con los compuestos # 1, 5, 6, 8 y 9 y compuestos de referencia frente a células tratadas con vehículo (DMSO) mostró un efecto inhibitorio significativo del compuesto # 1, 5, 6, 8 y 9 en la concentración de proteína TNF α e IL6 en el sobrenadante celular. Comparados a los compuestos de referencia, SB203580 o BMS345541, estos compuestos mostraron una inhibición similar o mejor de la expresión TNF α /IL6.

55 Los efectos de la administración de los compuestos # 1, 5, 6, 8 y 9 sobre la expresión de TNF α en macrófagos THP-1 inducidos con LPS se muestran en la figura 3.

60 Estos descubrimientos indican que los compuestos inhibidores de CDK # 1, 5, 6, 8 y 9 son supresores eficaces de la expresión de la citoquina TNF α .

Ejemplo 10

65 *A. Ensayos de inhibición de quinasas in vitro*

Se determinaron los perfiles CI50 de los compuestos 1-15 para las quinasas dependientes de ciclinas CDK2/CycA, CDK4/CycD1, CDK5/p35NCK, CDK6/CycD1 y CDK9/CycT en ensayos de inhibición de quinasas enzimáticos *in vitro*. Los valores de CI50 obtenidos en estos ensayos se usaron para evaluar la selectividad y potencia específicas de los compuestos con respecto a la inhibición de CDK9.

Los resultados obtenidos en estos ensayos se usaron para seleccionar compuestos que muestran especificidad para CDK9. Específicamente, se pretendía distinguir los compuestos específicos de CDK9 de otros compuestos que tienen potencia inhibidora significativa también con respecto a otras CDK, es decir, en algunas o todas de CDK 2, 4, 5 y 6. Esta separación es esencial para evitar efectos (citostáticos/citotóxicos) adversos, que se pueden producir tras la inhibición de las CDK 2, 4, 5 y 6 relevantes para el ciclo celular.

Además, estos datos se usaron para establecer relaciones de estructura y actividad (SAR) que apoyen el diseño de estructuras/compuestos nuevos e incluso mejorados con respecto a potencia y selectividad.

1. Compuestos de prueba

Los compuestos se usaron como soluciones madre 1×10^{-02} M en DMSO al 100%, 100 μ l de cada uno en la columna 2 de tres placas de microtitulación con forma en V de 96 pocillos (a continuación dichas placas se denominan como "placas principales")

Posteriormente, las soluciones madre 1×10^{-02} M en la columna 2 de las placas principales se sometieron a un dilución en serie semilogarítmica usando DMSO como solvente, produciendo 10 concentraciones diferentes, la dilución final es 1×10^{-07} M/DMSO al 100% en la columna 12. Las columnas 1 y 7 se rellenaron con DMSO al 100% como controles. Posteriormente, se hicieron $2 \times 5 \mu$ l alícuotas de cada pocillo de placas copia diluidas en serie en 2 conjuntos idénticos de "placas de dilución de compuestos", usando una pipeta de 96 canales.

El día del ensayo de inhibición de quinasas, se añadieron 45 μ l de H₂O a cada pocillo de un conjunto de placas de dilución de compuestos. Para minimizar la precipitación, el H₂O se añadió a las placas solo unos minutos antes de transferir las soluciones de compuestos a las placas de ensayo. Las placas se agitaron por completo, produciendo "placas de dilución de compuestos/DMSO al 10%" con una concentración de 1×10^{-03} M/DMSO al 10% a 3×10^{-08} M/DMSO al 10% en pasos semilogarítmicos. Estas placas se usaron para la transferencia de 5 μ l de solución de compuesto a las "placas de ensayo". Las placas de dilución del compuesto se desecharon al final del día. Para los ensayos (véase a continuación), se transfirieron 5 μ l de solución de cada pocillo de las placas de dilución del compuesto en las placas de ensayo. El volumen final del ensayo era 50 μ l. Todos los compuestos se ensayaron a 10 concentraciones de ensayo finales en el intervalo de 1×10^{-04} M a 3×10^{-09} M. La concentración final de DMSO en las mezclas de reacción era del 1% en todos los casos.

2. Proteínas quinasas recombinantes

Para la determinación de los perfiles de inhibición, se usaron las siguientes 5 proteínas quinasas: CDK2/CycA, CDK4/CycD1, CDK5/p35NCK, CDK6/CycD1 y CDK9/CycT. Dichas proteínas quinasas se expresaron en células de insecto Sf9 como proteínas de fusión con GST recombinantes humanas o proteínas etiquetadas con His por medio del sistema de expresión de baculovirus. Las quinasas se purificaron por cromatografía de afinidad usando bien GSH-agarosa (Sigma) o Ni-NTH-agarosa (Qiagen). La pureza de cada quinasa se determinó por SDS-PAGE/tinción con plata y la identidad de cada quinasa se verificó por análisis de inmunotransferencia con anticuerpos específicos de las quinasas o por espectrometría de masas.

3. Ensayo de proteína quinasa

Todos los ensayos de quinasas se realizaron en FlashPlates™ de 96 pocillos de Perkin Elmer/NEN (Boston, MA, EE UU) en un volumen de reacción de 50 μ l. La mezcla de reacción se pipeteó en cuatro pasos en el siguiente orden:

- 20 μ l de tampón de ensayo (tampón estándar)
- 5 μ l de solución de ATP (en H₂O)
- 5 μ l de compuesto de prueba (en DMSO al 10%)
- 10 μ l de de sustrato / 10 μ l de solución de enzima (premezclado)

Los ensayos para todas las enzimas contenían HEPES-NaOH 60 mM, pH 7,53, MgCl₂ 3 mM, MnCl₂ 3 mM, ortovanadato de Na 3 μ M, DTT 1,2 mM, PEG20000 50 μ g/ml, [³³P]-ATP 1 μ M (aprox. 5×1005 cpm por pocillo).

Se usaron las siguientes cantidades de enzima y sustrato por pocillo:

#	Quinasa	Quinasa lote #	Quinasa ng/50 μ l	Sustrato	Sustrato ng/50 μ l
---	---------	----------------	-----------------------	----------	------------------------

1	CDK2/CycA	SP005	100	Histona H1	250
2	CDK4/CycD1	SP005	50	Rb-CTF (lote 009)	500
3.	CDK5/p35NCK	SP001	50	Rb-CTF (lote 009)	1000
3	CDK6/CycD1	SP003	400	Rb-CTF (lote 009)	500
4	CDK9/CycT	003	100	Rb-CTF (lote 009)	1000

Las mezclas de reacción se incubaron a 30°C durante 80 minutos. La reacción se paró con 50 µl de H₃PO₄ al 2% (v/v), las placas se aspiraron y lavaron dos veces con 200 µl de H₂O o 200 µl de NaCl al 0,9% (p/v). Se determinó la incorporación de ³³P con un contador de centelleo de microplacas (Microbeta, Wallac).

5

Todos los ensayos se realizaron con un sistema robótico BeckmanCoulter/Sagian.

4. Evaluación de los datos sin elaborar

10 El valor mediana de las cuentas en la columna 1 (n=8) de cada placa de ensayo se definió como “control bajo”. Este valor refleja la unión inespecífica de radioactividad a la placa en ausencia de una proteína quinasa pero en presencia del sustrato. El valor mediana de las cuentas en la columna 7 de cada placa de ensayo (n=8) se tomó como el “control alto”, es decir, actividad completa en ausencia de cualquier inhibidor. La diferencia entre el control alto y bajo se denomina actividad al 100%. Como parte de la evaluación de los datos, el valor del control bajo de una placa particular se restó del valor del control alto así como de todos los 80 “valores de compuesto” de la placa correspondiente. La actividad residual (en %) para cada pocillo de una placa particular se calculó usando la siguiente fórmula:

15

$$\text{Actividad res. (\%)} = 100 \times [(\text{cpm del compuesto} - \text{control bajo}) / (\text{control alto} - \text{control bajo})]$$

20

Las actividades residuales para cada concentración y los valores CI50 del compuesto se calcularon usando Quattro Workflow V2.0.1.3 (Quattro Research GmbH, Múnich, Alemania; www.quattro-research.com). El modelo usado fue “Respuesta sigmoidea (pendiente variable)” con parámetros “superiores” fijados al 100% e “inferiores” al 0%.

25 Resulta que los valores de CI50 de los compuesto 1-15 están comprendidos todos entre 1 nM y 10 µM.

Referencias

30 Barboric M. et al., NfκB Binds P-TEFb to Stimulate Transcriptional Elongation by RNA Polymerase II. *Molecular Cell*, 2001, Vol. 8, 327-337

Besson J.M., The neurobiology of pain. *Lancet*, 1999, 353(9164), 1610-1615

35 Brower, New paths to pain relief. *Nat Biotechnol*, 2000, 18(4), 387-391

Chao S.H. y Price D.H., Flavopiridol inactivates P-TEFb and blocks most RNA polymerase II transcription in vivo. *J Biol Chem*, 2001, 276(34), 31793-9

40 Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, y Yaksh, TL. (1994) Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods* 53: 55-63.

Dai Y. y Grant S., Cyclin-dependent kinase inhibitors. *Curr Opin Pharmacol*, 2003, 3(4), 362-370

45 Falco G.D. et al., CDK9, a member of the cdc2-like family of kinases, binds to gp130, the receptor of the IL-6 family of cytokines. *Oncogene*, 2002, 21(49), 7464-7470

Feldmann y Maini, *NatMed*, 2003, 9 (10); 356-61

50 Firestein, 2003, *Nature* 423, 356-361

Han et al.; 2003, *Autoimmunity*, 28, 197-208

Hargreaves, K: *Pain* 32(1) (Enero 1988) 77-88

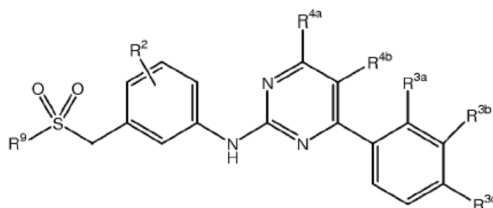
55 Huwe et al., Small molecules as inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2003, 42(19), 2122-2138

60 Kim et al., Phosphorylation of the RNA polymerase II carboxyl-terminal domain by CDK9 is directly responsible for human immunodeficiency virus type 1 Tat-activated transcriptional elongation. *Mol Cell Biol*, 2002, 22(13), 4622-4637.

- Koltzenburg M, Neural mechanisms of cutaneous nociceptive pain. *Clin J Pain*, 2000, 16(3 Supl), 131-138
- Laufer S., Gay S. y Brune K., Inflammation and Rheumatic Diseases — The molecular basis of novel therapies, Thieme, 2003
- 5 Lee K.M. et al., Spinal NfκB activation induces COX-2 upregulation and contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *European Journal of Neuroscience*, 2004, Vol. 19, 3375-3381
- 10 Liu H. y Herrmann C., Differential Localization and Expression of the CDK9 42k and 55k Isoforms. *J Cell Physiol*, 2004, 203, 251-260
- MacLachlan T.K. et al., Binding of CDK9 to TRAF2. *J Cell Biochem*, 1998, 71(4), 467-478
- 15 Malmberg AB y Basbaum AI. (1998) Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain: behavioral and neuroanatomical correlates. *Pain* 76: 215-2
- Meijer L, Leclerc S., Leost M., Properties and potential applications of chemical inhibitors of cyclin-dependent kinases, *Pharmacol Ther* 1999, 82(2-3):279-284
- 20 Sausville, E.A. *Trends Molec. Med.* 2002, 8, S32-S37
- Tian B. et al., Identification of direct genomic targets downstream of the NfκB transcription factor mediating TNF signaling. *JBC*, 2005, como manuscrito M500437200
- 25 Wang D, et al., Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 transcription by chemical cyclin-dependent kinase inhibitors. *J. Virol.* 2001; 75: 7266-7279
- Watkins L.R. et al., Glial proinflammatory cytokines mediate exaggerated pain states: implications for clinical pain. *Adv Exp Med Biol.*, 2003, 521, 1-21
- 30 West et al.; 2001, *Journal of Virology* 75(18), 8524-8537
- Zhou M. et al., Coordination of transcription factor phosphorylation and histone methylation by the P-TEFb Kinase during human immunodeficiency virus type I transcription, *J. Virol* 2004, 78(24):13522-13533
- 35

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto según la fórmula general Ia



Fórmula Ia

en donde

R⁹ es -NR⁵R⁶ o R⁸

R⁵ y R⁶ independientemente entre si son hidrógeno, alquilo de C₁₋₄, hidroxi-alquilo de C₁₋₄ o alqueno de C₃₋₄, cicloalquilo de C₃₋₈, cicloalquilo de C₃₋₈-alquilo de C₁₋₄ o heterocicloalquilo de C₄₋₇-alquilo de C₀₋₄, arilo de C₄₋₇-alquilo de C₁₋₄, heteroarilo de C₄₋₇-alquilo de C₀₋₄ o

en donde R⁵ y R⁶ junto con el átomo de N al que están unidos también pueden formar un heterocicloalquilo de 5 a 8 miembros,

en donde dicho cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo o alquilo está además opcionalmente sustituido por hasta 2 radicales seleccionados del grupo que consiste en halo, hidroxi, aminocarbonilo, alquilo de C₁₋₄, hidroxi-alquilo de C₁₋₄, alquilo de C₁₋₄-O-alquilo de C₁₋₄, alquilo de C₁₋₄-O- y -NR⁵R⁶;

R⁸ es alquilo de C₁₋₄, hidroxi-alquilo de C₂₋₄ o alqueno de C₃₋₄, cicloalquilo de C₃₋₈, cicloalquilo de C₃₋₈-alquilo de C₁₋₄ o heterocicloalquilo de C₄₋₇-alquilo de C₀₋₄;

en donde dicho cicloalquilo, heterocicloalquilo o alquilo está además opcionalmente sustituido por hasta 2 radicales seleccionados del grupo que consiste en halo, hidroxi, alquilo de C₁₋₄, hidroxi-alquilo de C₁₋₄, alquilo de C₁₋₄-O-alquilo de C₁₋₄, alquilo de C₁₋₄-O- y -NR⁵R⁶;

R² es uno o dos sustituyentes independientemente seleccionados de halógeno e hidrógeno;

R^{3a} representa hidrógeno, halo o alcoxi de C₁₋₄;

R^{3b} representa hidrógeno;

R^{3c} representa hidrógeno o halógeno;

R^{4a} representa hidrógeno; y

R^{4b} representa hidrógeno o metilo;

o un compuesto seleccionado de los derivados N-óxidos, las sales farmacéuticamente aceptables y solvatos (por ejemplo, hidratos) de tales compuestos.

2. El compuesto según la reivindicación 1

en donde:

R² es hidrógeno o halógeno;

R⁵ y R⁶ son cada uno independientemente hidrógeno, cicloalquilo o alquilo de C₁₋₄ opcionalmente sustituido con hidroxilo o dialquilamino;

y R⁸ es hidroxi-alquilo de C₂₋₄;

o un compuesto seleccionado de los derivados N-óxidos, las sales farmacéuticamente aceptables y solvatos (por ejemplo, hidratos) de tales compuestos.

3. El compuesto según la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en donde R^{3a} representa metoxi o isopropoxi.

4. El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en donde R^9 representa NR^5R^6 .
5. El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en donde R^9 representa R^8 .
- 5 6. El compuesto según la reivindicación 4 en donde R^5 y R^6 son cada uno independientemente hidrógeno, metilo, ciclopropilo, 2-hidroxietilo, 2-dimetilaminoetilo o 3-dimetilaminopropilo.
7. El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en donde R^{4b} representa hidrógeno.
- 10 8. El compuesto según la reivindicación 1, que se elige del grupo que consiste en:
- {3-[4-(2-Metoxi-fenil)-pirimidin-2-ilamino]-fenil}-metanosulfonamida (Compuesto 1);
- 15 {3-[4-(2-Isopropoxi-fenil)-pirimidin-2-ilamino]-fenil}-metanosulfonamida (Compuesto 2);
- C-{3-[4-(2-Metoxi-fenil)-pirimidin-2-ilamino]-fenil}-N,N-dimetilmetanosulfonamida (Compuesto 3);
- C-{3-[4-(2-Metoxi-fenil)-pirimidin-2-ilamino]-fenil}-N-metil-metanosulfonamida (Compuesto 4);
- 20 {3-[4-(4-Fluoro-2-metoxi-fenil)-pirimidin-2-ilamino]-fenil}-metanosulfonamida (Compuesto 5);
- N-Ciclopropil-C-{3-[4-(2-metoxi-fenil)-pirimidin-2-ilamino]-fenil}-metanosulfonamida (Compuesto 6);
- N-(2-Hidroxi-etil)-C-{3-[4-(2-metoxi-fenil)-pirimidin-2-ilamino]-fenil}-metanosulfonamida (Compuesto 7);
- 25 N-(2-Hidroxi-etil)-C-{3-[4-(2-metoxi-fenil)-pirimidin-2-ilamino]-fenil}-N-metil-metanosulfonamida (Compuesto 8);
- 2-{3-[4-(2-Metoxi-fenil)-pirimidin-2-ilamino]-fenilmetanosulfonil}-etanol (Compuesto 9);
- 30 {3-[4-(2-Metoxi-fenil)-5-metil-pirimidin-2-ilamino]-fenil}-metanosulfonamida (Compuesto 13);
- N-(2-Hidroxi-etil)-C-{3-[4-(2-metoxi-fenil)-5-metil-pirimidin-2-ilamino]-fenil}-N-metil-metanosulfonamida (Compuesto 14);
- 35 2-{3-[4-(2-Metoxi-fenil)-5-metil-pirimidin-2-ilamino]-fenilmetanosulfonil}-etanol (Compuesto 15);
- y los derivados N-óxidos, las sales farmacéuticamente aceptables y solvatos (por ejemplo, hidratos) de tales compuestos.
- 40 9. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, para uso médico.
10. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, para su uso en el tratamiento de cualquier tipo de dolor, trastornos inflamatorios, enfermedades inmunológicas, enfermedades proliferativas, enfermedades infecciosas, enfermedades cardiovasculares y enfermedades neurodegenerativas.
- 45 11. El compuesto según la reivindicación 10, en donde cualquier tipo de dolor comprende dolor crónico, dolor inflamatorio y/o neuropático.
- 50 12. Una composición farmacéutica que contiene un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-8 junto con un soporte farmacéuticamente aceptable.

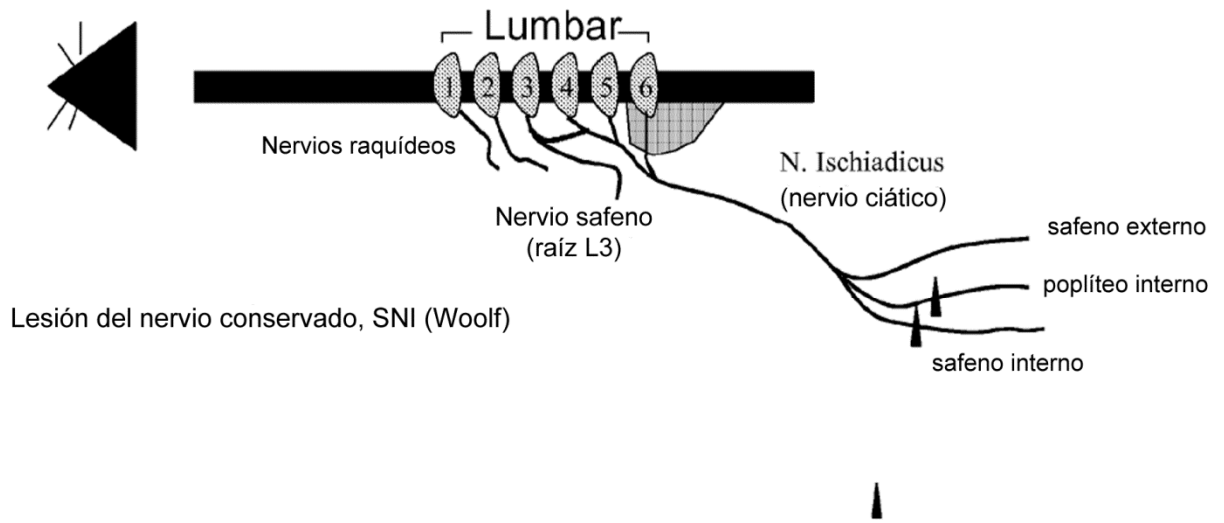


Figura 1

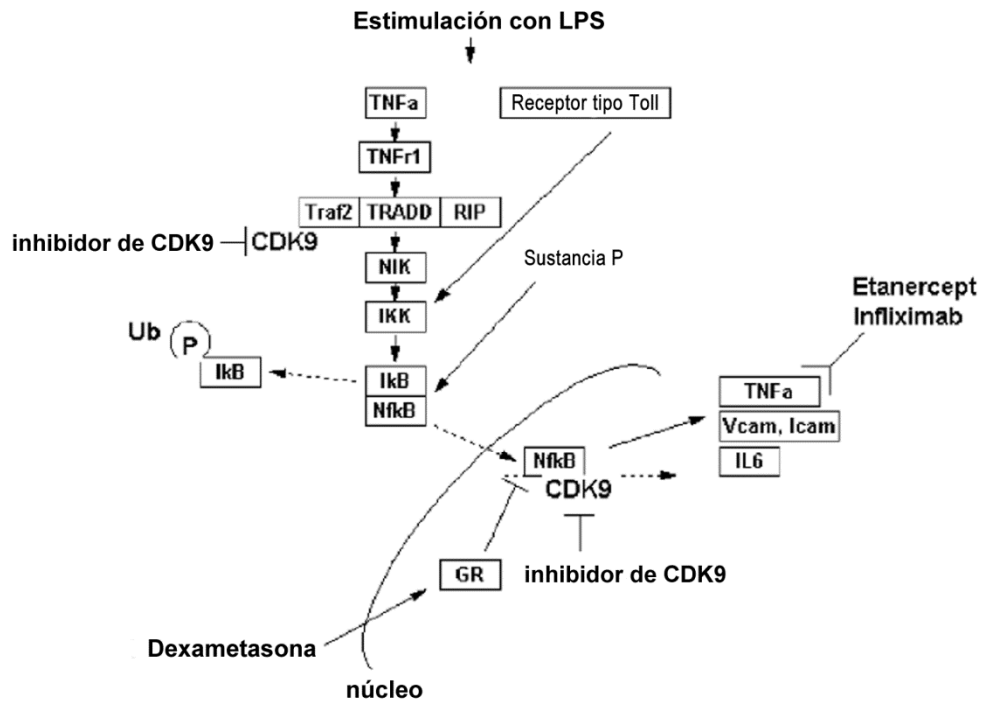


Figura 2

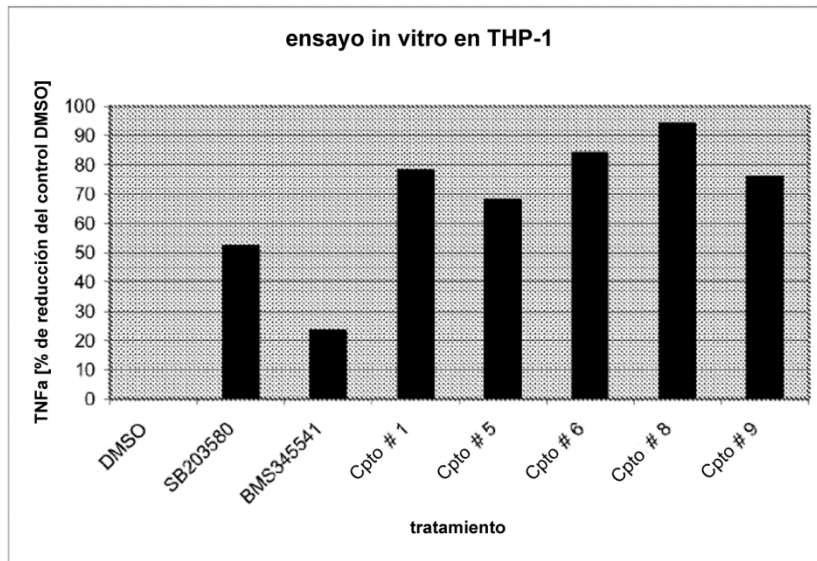


Figura 3