

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 583 853**

51 Int. Cl.:

**C07D 403/12** (2006.01)

**A61K 31/4155** (2006.01)

**A61K 31/506** (2006.01)

**C07D 491/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.10.2012 E 12772383 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2016 EP 2763984**

54 Título: **1-Pirazolil-3-(4-((2-anilino pirimidin-4-il)oxi)naftalen-1-il)ureas como inhibidores de p38 MAP cinasa**

30 Prioridad:

**03.10.2011 EP 11183682**

**03.10.2011 EP 11183688**

**16.05.2012 EP 12168396**

**16.05.2012 EP 12168395**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**22.09.2016**

73 Titular/es:

**RESPIVERT LIMITED (100.0%)**

**50-100 Holmers Farm Way**

**High Wycombe, Buckinghamshire HP12 4EG, GB**

72 Inventor/es:

**ITO, KAZUHIRO;**

**CHARRON, CATHERINE ELISABETH;**

**KING-UNDERWOOD, JOHN;**

**ONIONS, STUART THOMAS;**

**LONGSHAW, ALISTAIR IAN;**

**BROECKX, RUDY;**

**FILLIERS, WALTER y**

**COPMANS, ALEX**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

Observaciones :

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

**ES 2 583 853 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

1-Pirazolil-3-(4-((2-anilino pirimidin-4-il)oxi)naftalen-1-il)ureas como inhibidores de p38 MAP cinasa.

## Campo de la invención

La invención se refiere a compuestos que son inhibidores de la familia de las enzimas proteína cinasa activadas por mitógenos p38 (denominados en este documento inhibidores de p38 MAP cinasa), por ejemplo sus subtipos de alfa y gamma cinasa, y de Syk cinasa, y la familia Src de tirosina cinasas, y su uso en la terapia, incluidas combinaciones farmacéuticas, especialmente en el tratamiento de enfermedades inflamatorias, en particular enfermedades inflamatorias del pulmón, tales como asma y EPOC, así como también aquellas del tubo digestivo, tales como colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn, y del ojo, tal como uveítis.

## Antecedentes de la invención

Se han identificado cuatro isoformas de p38 MAPK (alfa, beta, gamma y delta respectivamente), cada una de las cuales exhibe diferentes patrones de expresión de tejido en el hombre. Las isoformas alfa y beta de p38 MAPK se encuentran en forma ubicua en el organismo, estando presentes en muchos tipos celulares distintos. La isoforma alfa se caracteriza bien en términos de su función en la inflamación. Si bien los estudios que usan un planteamiento genético químico en ratones indican que la isoforma beta de p38 MAPK no cumple una función en la inflamación (O'Keefe, S.J. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2007, 282(48):34663-71.), puede estar implicada en mecanismos de dolor a través de la regulación de la expresión de COX2 (Fitzsimmons, B.L. *et al.*, *Neuroreport*, 2010, 21(4):313-7). Estas isoformas son inhibidas por una serie de compuestos de bajo peso molecular previamente descritos. Las clases iniciales de inhibidores eran altamente tóxicas debido a la amplia distribución en los tejidos de estas isoformas que resultaban en múltiples efectos inespecíficos de los compuestos, distintos de los deseados. Asimismo, se ha discontinuado el desarrollo de una cantidad de inhibidores debido a los perfiles de seguridad inaceptables en los estudios clínicos (Pettus, L.H. y Wurz, R.P., *Curr. Top. Med. Chem.*, 2008, 8(16):1452-67.). Dado que estos efectos adversos varían con el quimiotipo, y los compuestos tienen patrones de selectividad de cinasa distintos, las toxicidades observadas pueden estar relacionadas con la estructura en lugar de estar basadas en el mecanismo de p38.

Se sabe menos acerca de las isoformas gamma y delta de p38 MAPK, las cuales, a diferencia de las isozimas alfa y beta, se expresan en tejidos y células específicos. La isoforma p38 MAPK-delta se expresa en mayor medida en páncreas, testículo, pulmón, intestino delgado y riñón. También abunda en macrófagos y es detectable en neutrófilos, linfocitos T CD4+ y en células endoteliales (Shmueli, O. *et al.*, *Comptes Rendus Biologies*, 2003, 326(10-11): 1067-1072; Smith, S. J. *Br. J. Pharmacol.*, 2006, 149:393-404; Hale, K. K., *J. Immunol.*, 1999, 162(7):4246-52; Wang, X. S. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 1997, 272(38):23668-23674.) Se sabe muy poco sobre la distribución de p38 MAPK gamma, aunque se expresa en mayor medida en cerebro, músculo esquelético y corazón, así como también en linfocitos y macrófagos (Shmueli, O. *et al.*, *Comptes Rendus Biologies*, 2003, 326(10-11): 1067-1072; Hale, K. K., *J. Immunol.*, 1999, 162(7):4246- 52; Court, N. W. *et al.*, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2002, 34(4):413-26; Mertens, S. *et al.*, *FEBS Lett.*, 1996, 383(3):273-6.).

Los inhibidores selectivos de moléculas pequeñas de p38 MAPK gamma y p38 MAPK delta no están actualmente disponibles, aunque se sabe que un compuesto previamente descrito, BIRB 796, posee actividad inhibitoria de la isoforma pan. La inhibición de las isoformas gamma y delta de p38 MAPK se observa en concentraciones mayores del compuesto que las requeridas para inhibir p38 MAPK alfa y p38 beta (Kuma, Y., *J. Biol. Chem.*, 2005, 280:19472-19479.). A su vez, BIRB 796 también afectó la fosforilación de las p38 MAPK o JNK por la cinasa MKK6 o MKK4 anterior. Kuma analizó la posibilidad de que el cambio conformacional causado por la unión del inhibidor a la proteína MAPK pudiese afectar la estructura tanto del sitio de fosforilación como del punto de interacción para el activador anterior, afectando de este modo la fosforilación de las p38 MAPK o JNK.

Se cree que la p38 MAP cinasa cumple una función pivotal en muchas de las vías de señalización implicadas en el inicio y el mantenimiento de inflamación crónica y persistente en enfermedad humana, por ejemplo, en asma grave y en EPOC (Chung, F., *Chest*, 2011, 139(6):1470-1479.). Existe ahora mucha bibliografía que demuestra que la p38 MAP cinasa es activada por una gama de citocinas pro-inflamatorias y que su activación produce la captación y liberación de citocinas proinflamatorias adicionales. De hecho, los datos de algunos estudios clínicos demuestran cambios beneficiosos en la actividad de la enfermedad en los pacientes durante el tratamiento con inhibidores de p38 MAP. Por ejemplo, Smith describe el efecto inhibitorio de los inhibidores de p38 MAP cinasa sobre la liberación de TNF $\alpha$  (pero no IL-8) de PBMC humanas.

También se ha propuesto el uso de inhibidores de p38 MAP cinasa en el tratamiento de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Se ha comprobado que los inhibidores de moléculas pequeñas dirigidos a p38 MAPK  $\alpha/\beta$  son eficaces para reducir diversos parámetros de inflamación en células y en tejidos obtenidos de pacientes con EPOC, que en general son insensibles a los corticoesteroides (Smith, S.J., *Br. J. Pharmacol.*, 2006, 149:393-404.) así como también en diversos modelos animales *in vivo* (Underwood, D.C. *et al.*, *Am. J. Physiol.*, 2000, 279:L895-902; Nath, P. *et al.*, *Eur. J. Pharmacol.*, 2006, 544:160-167.). Irusen y colegas también han sugerido la posible implicación de p38 MAPK  $\alpha/\beta$  con insensibilidad a los corticoesteroides mediante la reducción de afinidad de unión

del receptor de glucocorticoides (GR) en núcleos (Irusen, E. *et al.*, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2002, 109:649-657.). Se ha descrito la experiencia clínica con una gama de inhibidores de p38 MAP cinasa, incluidos AMG548, BIRB 796, VX702, SCIO469 y SCIO323 (Lee, M.R. y Dominguez, C., *Current Med. Chem.*, 2005, 12:2979-2994.).

5 La EPOC es una dolencia en la que se describe que la inflamación subyacente es sustancialmente resistente a los efectos antiinflamatorios de los corticoesteroides inhalados. En consecuencia, una estrategia superior para tratar la EPOC consistiría en desarrollar una intervención que tuviese tanto efectos antiinflamatorios inherentes como la capacidad de incrementar la sensibilidad de los tejidos pulmonares de pacientes con EPOC a los corticoesteroides inhalados. Una publicación reciente de Mercado (Mercado, N., *et al.*, *Mol. Pharmacol.*, 2011, 80(6): 1128-1135.) demuestra que silenciar la p38 MAPK y tiene el potencial de restaurar la sensibilidad a los corticoesteroides. En consecuencia puede existir un beneficio dual para los pacientes en el uso de un inhibidor de p38 MAP cinasa para el tratamiento de la EPOC y el asma grave. No obstante, el principal obstáculo que dificulta la utilidad de los inhibidores de p38 MAP cinasa en el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas humanas ha sido la toxicidad grave observada en los pacientes, que provocó la retirada del desarrollo clínico de muchos compuestos, incluidos todos aquellos precedentemente mencionados.

15 Muchos pacientes diagnosticados con asma o con EPOC siguen padeciendo síntomas descontrolados y exacerbaciones de su afección, que pueden provocar hospitalizaciones. Esto sucede a pesar del uso de los esquemas de tratamientos más avanzados existentes hoy en día, que comprenden productos combinados de un corticoesteroide inhalado y un  $\beta$ -agonista de larga duración. Los datos acumulados en la última década indican que la imposibilidad de controlar eficazmente el componente inflamatorio subyacente de la enfermedad en el pulmón es la razón más probable por la que ocurren las exacerbaciones. Dada la eficacia consolidada de los corticoesteroides como agentes antiinflamatorios y, en particular, de los corticoesteroides inhalados en el tratamiento del asma, estos hallazgos han dado lugar a una intensa investigación. Los estudios resultantes han identificado que algunas agresiones ambientales producen cambios inflamatorios insensibles a los corticoesteroides en los pulmones de los pacientes. Un ejemplo es la respuesta que surge de las infecciones de las vías respiratorias superiores mediadas por virus, que tienen importancia particular en el aumento de morbilidad asociada con asma y EPOC.

20 Las investigaciones epidemiológicas han revelado una fuerte asociación entre las infecciones víricas de las vías respiratorias superiores y un porcentaje importante de las exacerbaciones que sufren los pacientes ya diagnosticados con enfermedades respiratorias crónicas. Algunos de los datos más convincentes en este sentido derivan de estudios longitudinales de niños que padecen asma (Papadopoulos, N.G., Papi, A., Psarras, S. y Johnston, S.L., *Paediatr. Respir. Rev.*, 2004, 5(3):255-260.). Una diversidad de estudios adicionales respalda la conclusión de que una infección vírica puede precipitar exacerbaciones y aumentar la gravedad de la enfermedad. Por ejemplo, se ha descrito que las infecciones clínicas experimentales con rinovirus causan hiperreactividad bronquial a la histamina en pacientes asmáticos que no son sensibles al tratamiento con corticoesteroides (Grunberg, K., Sharon, R.F., *et al.*, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2001, 164(10): 1816-1822.). Otros datos derivan de la asociación observada entre exacerbaciones de la enfermedad en pacientes con fibrosis quística e infecciones por RVH (Wat, D., Gelder, C., *et al.*, *J. Cyst. Fibros.*, 2008, 7:320-328.). También coherente con este conjunto de datos está el hallazgo de que las infecciones víricas respiratorias, incluidos rinovirus, representan un factor de riesgo independiente que se correlaciona negativamente con la tasa de supervivencia de 12 meses en receptores pediátricos de trasplantes pulmonares (Liu, M., Worley, S., *et al.*, *Transpl. Infect. Dis.*, 2009, 11(4):304-312.).

30 La investigación clínica indica que la carga vírica es proporcional a los síntomas y complicaciones observados e, implícitamente, a la gravedad de la inflamación. Por ejemplo, después de la infección experimental por rinovirus, los síntomas de las vías respiratorias inferiores e hiperreactividad bronquial se correlacionaron significativamente con la carga vírica (Message, S.D., Laza-Stanca, V., *et al.*, *PNAS*, 2008; 105(36):13562-13567.). De modo similar, en ausencia de otros agentes víricos, las infecciones por rinovirus se asociaron comúnmente con infecciones de las vías respiratorias inferiores y estertores secos, cuando la carga vírica fue superior en pacientes pediátricos inmunocompetentes (Gerna, G., Piralla, A., *et al.*, *J. Med. Virol.*, 2009, 81(8):1498-1507.).

35 Cabe destacar que se ha descrito recientemente que la exposición previa al rinovirus redujo las respuestas de las citocinas provocadas por productos bacterianos en macrófagos alveolares humanos (Oliver, B.G., Lim, S., *et al.*, *Thorax*, 2008, 63:519-525.). Además, se ha documentado que la infección de células epiteliales nasales con rinovirus promueve la adhesión de bacterias, incluidas *S.aureus* y *H. influenzae* (Wang, J.H., Kwon, H.J. y Yong, J.J., *The Laryngoscope*, 2009, 119(7):1406-1411.). Dichos efectos celulares pueden contribuir a la mayor probabilidad de que los pacientes sufran una infección de las vías respiratorias inferiores después de una infección de las vías respiratorias superiores. Por consiguiente, es terapéuticamente relevante concentrarse en la capacidad de nuevas intervenciones para reducir la carga vírica en una diversidad de sistemas *in vitro*, como un indicador sustituto de su beneficio en un ámbito clínico.

40 Los grupos de alto riesgo, para quienes una infección por rinovirus en las vías respiratorias superiores puede provocar complicaciones secundarias graves, no se limitan a pacientes con enfermedad respiratoria crónica. Incluyen, por ejemplo, a los pacientes inmunocomprometidos propensos a contraer infecciones de las vías respiratorias inferiores, además de pacientes sometidos a quimioterapia, que enfrentan fiebre aguda y potencialmente mortal. También se ha sugerido que otras enfermedades crónicas, tales como la diabetes, están asociadas con una respuesta de inmunodefensas comprometidas. Esto incrementa tanto la probabilidad de adquirir

una infección de las vías respiratorias como de ser hospitalizado como consecuencia (Peleg, A.Y., Weerathna, T., *et al.*, *Diabetes Metab. Res. Rev.*, 2007, 23(1):3-13; Kornum, J.B., Reimar, W., *et al.*, *Diabetes Care*, 2008, 31 (8): 1541-1545.).

5 Si bien las infecciones víricas de las vías respiratorias superiores son una causa de considerable morbimortalidad en aquellos pacientes con enfermedad subyacente u otros factores de riesgo; también representan una importante carga económica de la atención sanitaria en la población general y son una causa importante de ausencias escolares y tiempo perdido en el lugar de trabajo (Rollinger, J.M. y Schmidtke, M., *Med. Res. Rev.*, 2010, Doi 10.1002/med.20176.). Estas consideraciones dejan en claro que se necesitan de manera urgente nuevas medicinas que posean mejor eficacia que las terapias actuales, con el fin de prevenir y tratar infecciones de las vías respiratorias superiores mediadas por rinovirus. En general, las estrategias adoptadas para el descubrimiento de agentes antivíricos mejorados han dirigido varias proteínas producidas por el virus, como el punto de intervención terapéutica. No obstante, la amplia gama de serotipos de rinovirus hace que este planteamiento sea particularmente complejo y puede explicar la razón por la cual, en la actualidad, los organismos reguladores aún no han aprobado un medicamento para la profilaxis y el tratamiento de infecciones por rinovirus.

15 El ingreso vírico en la célula hospedante se asocia con la activación de una serie de vías de señalización intracelular que se cree cumplen una función prominente en el inicio de procesos inflamatorios (revisado por Ludwig, S, 2007; *Signal Transduction*, 7:81-88.) y de propagación vírica y subsiguiente liberación. Dicho mecanismo, que se ha determinado que cumple una función en la propagación del virus de la gripe *in vitro*, es la activación de la vía fosfoinositida 3-cinasa / Akt. Se ha descrito que esta vía de señalización es activada por la proteína NS1 del virus (Shin, Y.K., Liu, Q. *et al.*, *J. Gen. Virol.*, 2007, 88:13-18.) y que su inhibición reduce las titulaciones del virus de la descendencia (Ehrhardt, C., Marjuki, H. *et al.*, *Cell Microbiol.*, 2006, 8:1336-1348.).

25 Asimismo, se ha documentado que el inhibidor de MEK U0126 inhibe la propagación vírica sin producir la emergencia de variantes resistentes del virus (Ludwig, S., Wolff, T. *et al.*, *FEBS Lett.*, 2004, 561(1-3):37-43.). Más recientemente, los estudios dirigidos a la inhibición de cinasa Syk han demostrado que la enzima cumple una función importante en mediar la entrada del rinovirus a las células y también las respuestas inflamatorias inducidas por virus, incluido el aumento de ICAM-1 (Sanderson, M.P., Lau, C.W. *et al.*, *Inflamm. Allergy Drug Targets*, 2009, 8:87-95.). Se informa que la actividad de Syk es controlada por c-Src como una cinasa anterior en la infección por RVH (Lau, C. *et al.*, *J. Immunol.*, 2008, 180(2):870-880.). Ha aparecido un pequeño número de estudios que vinculan la activación de Src celular (Src1 o p60-Src) o cinasas de la familia Src a la infección con virus. Estos incluyen un informe de que el adenovirus produce una activación mediada por PI3 cinasa de Akt a través del mecanismo dependiente de c-Src. También se ha sugerido que la producción de IL-8 inducida por el rinovirus 39 depende de la activación de Src cinasa (Bentley, J.K., Newcomb, D.C., *J. Virol.*, 2007, 81:1186-1194.). Finalmente, se ha propuesto que la activación de Src cinasa está implicada en la inducción de la producción de mucina por el rinovirus 14 en células epiteliales y glándulas submucosas (Inoue, D. y Yamaya, M., *Respir. Physiol. Neurobiol.*, 2006, 154(3):484-499.).

El documento WO 03/072569 describe inhibidores de p38 MAP cinasa cuya definición abarca ampliamente el compuesto actualmente reivindicado, pero no lo describe.

40 Se ha descrito previamente que los compuestos que inhiben la actividad de c-Src y Syk cinasa son agentes eficaces contra la replicación del rinovirus (Charron, C.E. *et al.*, WO 2011/158042.) y que los compuestos que inhiben p59-HCK son eficaces contra la replicación del virus de la gripe (Charron, C.E. *et al.*, WO 2011/070369.). Por los motivos expuestos anteriormente, se espera que los compuestos diseñados para tratar enfermedades respiratorias crónicas que combinan estas propiedades inherentes con la inhibición de las p38 MAPK, sean particularmente eficaces.

Ciertos inhibidores de p38 MAPK también se han descrito como inhibidores de la replicación del virus sincicial respiratorio (Cass, L. *et al.*, WO 2011/158039.).

45 A su vez, cabe destacar que se descubrió que un inhibidor de p38 MAPK proporciona beneficios para el paciente con enfermedad inflamatoria de los intestinos después de una semana de tratamiento, lo que no se sostuvo con un curso de tratamiento de cuatro semanas (Schreiber, S. *et al.*, *Clin. Gastro. Hepatology*, 2006, 4:325-334.).

50 Además de las funciones clave en los eventos de señalización celular que controlan la actividad de vías pro-inflamatorias, las enzimas cinasa son también reconocidas ahora por regular la actividad de una gama de funciones celulares. Entre las que se han analizado recientemente se encuentran el mantenimiento de la integridad del ADN (Shilo, Y. *Nature Reviews Cancer*, 2003, 3:155-168.) y la coordinación de los complejos procesos de división celular. Una ilustración de los hallazgos recientes es una publicación que describe el impacto de un conjunto de inhibidores que actúan en las llamadas "cinasas Olaharsky" sobre la frecuencia de la formación de micronúcleos *in vitro* (Olaharsky, A.J. *et al.*, *PLoS Comput. Biol.*, 2009, 5(7):e1000446.). La formación de micronúcleos está implicada en, o asociada con, la ruptura de procesos mitóticos y por ende es una manifestación indeseada de toxicidad potencial. Se halló que la inhibición de glucógeno sintasa cinasa 3 $\alpha$  (GSK3 $\alpha$ ) es un factor particularmente significativo que aumenta la probabilidad de que un inhibidor de cinasa promueva la formación de micronúcleos. Recientemente, se describió que la inhibición de la cinasa GSK3 $\beta$  con ARNi también promueve la formación de micronúcleos (Tighe, A. *et al.*, *BMC Cell Biology*, 2007, 8:34.).

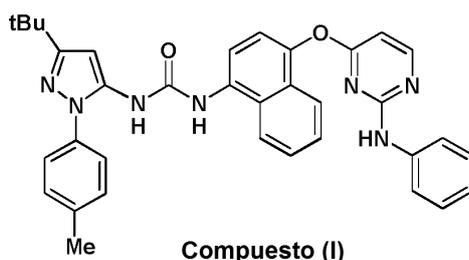
Puede ser posible atenuar los efectos adversos de las interacciones medicamentosas con las cinasas Olaharsky, tales como GSK3 $\alpha$ , por optimización de la dosis y/o cambiando la ruta de administración. No obstante, sería más ventajoso identificar moléculas terapéuticamente útiles que demuestren la baja o indetectable actividad contra estas enzimas inespecíficas no deseadas y en consecuencia produzcan poca o ninguna ruptura de los procesos mitóticos, según lo medido en ensayos de mitosis.

Es obvio a partir de la consideración de la bibliografía citada anteriormente en este documento que permanece la necesidad de identificar y desarrollar nuevos inhibidores de p38 MAP cinasa que tengan mejor potencial terapéutico que los tratamientos disponibles en la actualidad. Los compuestos deseables son aquellos que exhiben un índice terapéutico superior ejerciendo, por lo menos, un efecto igualmente eficaz que los agentes anteriores pero que, en uno o más sentidos, son menos tóxicos en las dosis terapéuticas relevantes. Un objetivo de la presente invención es entonces dar a conocer dichos compuestos nuevos que inhiben la actividad enzimática de la p38 MAP cinasa, por ejemplo con especificidades de ciertos subtipos, junto con Syk cinasa y tirosina cinasas dentro de la familia Src (particularmente c-Src), presentando de este modo buenas propiedades antiinflamatorias y adecuadas para uso en terapia.

El Compuesto (I) exhibe una duración de la acción y/o una persistencia de la acción más prolongada en comparación con el inhibidor de p38 MAP cinasa alostérico previamente descrito BIRB 796 (Pargellis, C. *et al.*, *Nature Struct. Biol.*, 2002, 9(4):268-272.). Una realización adicional proporciona dicho compuesto nuevo en una o más formas sólidas y cristalinas que poseen gran estabilidad físico-química para formulación como medicamentos inhalados.

Compendio de la invención

Por consiguiente, en un aspecto de la invención, se da a conocer un compuesto de fórmula (I):



o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables, incluidos todos sus estereoisómeros y tautómeros.

En la presente invención, se puede hacer referencia al "Compuesto de fórmula (I)" también como "Compuesto (I)".

En otro aspecto de la invención, se da a conocer el Compuesto (I) definido anteriormente, como la base libre.

En otro aspecto de la invención, se da a conocer el Compuesto (I) definido anteriormente, como la base libre anhidra.

En otro aspecto de la invención, se da a conocer el Compuesto (I) definido anteriormente, como la base libre anhidra en forma sólida, cristalina.

En otro aspecto de la invención, se da a conocer el Compuesto (I) definido anteriormente, como la base libre anhidra en la forma polimorfa sólida, cristalina A.

En otro aspecto de la invención, se da a conocer el Compuesto (I) definido anteriormente, como la base libre anhidra en la forma polimorfa sólida, cristalina B.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra un patrón de difracción de rayos X de polvos (XRPD) obtenido de una muestra del Compuesto (I) como la base libre anhidra en la forma polimorfa sólida, cristalina A.

La Figura 2 exhibe un patrón XRPD adquirido de una muestra del Compuesto (I) como la base libre anhidra en la forma polimorfa sólida, cristalina B, post-micronización.

La Figura 3 revela los resultados del análisis termogravimétrico de una muestra del Compuesto (I) como la base libre anhidra en la forma polimorfa sólida, cristalina B, post-micronización.

La Figura 4 representa gráficos de isotermas de sorción de vapor dinámica (DVS) de muestras del Compuesto (I) como la forma polimorfa sólida, cristalina B, post-micronización.

La Figura 5 representa los resultados de un experimento de histéresis realizado en el Compuesto (I) como la base libre anhidra en la forma polimorfa sólida, cristalina B, post-micronización, para determinar el grado y el índice de absorción/desorción de humedad con el tiempo frente a cambios en la humedad relativa.

5 La Figura 6 es el espectro de rayos infrarrojos (IR) obtenido de una muestra del Compuesto (I) como la base libre anhidra en la forma polimorfa sólida, cristalina B, post-micronización.

La Figura 7 muestra el análisis térmico de una muestra del Compuesto (I) como la base libre anhidra en la forma polimorfa sólida, cristalina B (micronizada) por calorimetría de barrido diferencial (DSC).

Descripción detallada de la invención

10 El compuesto de fórmula (I) descrito en este documento es: 1-(3-terc-butil-1-p-tolil-1H-pirazol-5-il)-3-(4-(2-(fenilamino)pirimidin-4-iloxi)naftalen-1-il)urea. Los ejemplos de sales del Compuesto (I) incluyen todas las sales farmacéuticamente aceptables, tales como, sin limitación, sales de adición de ácido de ácidos minerales fuertes tales como sales de HCl y HBr, y sales de adición de ácidos orgánicos fuertes tales como ácido metanosulfónico.

15 Como se emplea en lo sucesivo, la definición de un compuesto de fórmula (I) está destinada a incluir sales, solvatos y todos los tautómeros de dicho compuesto, a menos que el contexto indique concretamente lo contrario. Los ejemplos de solvatos incluyen hidratos.

La invención que se da a conocer en este documento se extiende a profármacos del compuesto de fórmula (I), es decir, compuestos que se descomponen y/o que son metabolizados *in vivo* para proporcionar un compuesto activo de fórmula (I). Los ejemplos generales de profármacos incluyen ésteres simples y otros ésteres tales como ésteres de carbonato mixtos, carbamatos, glucósidos, éteres, acetales y cetales.

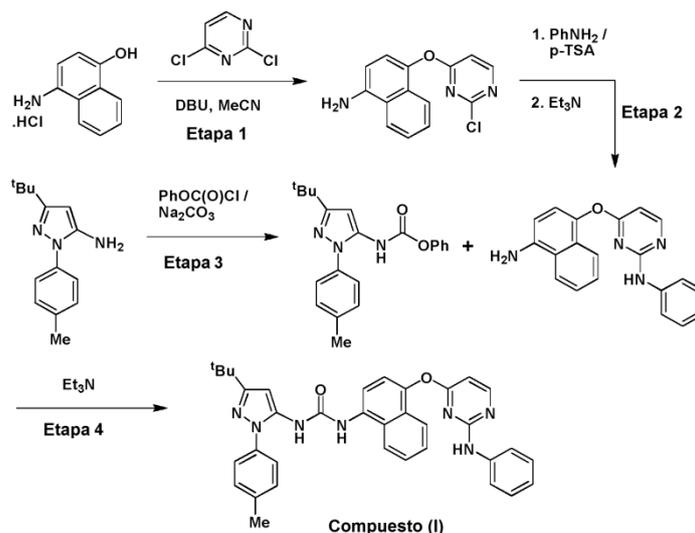
20 La invención abarca todos los derivados isotópicos del Compuesto (I). Por lo tanto, la invención abarca compuestos que son compuestos del Compuesto (I) que tienen uno o más átomos que han sido reemplazados por un átomo que tiene una masa atómica o número másico diferente de la masa atómica o el número másico que se halla más comúnmente en la naturaleza, o donde la proporción de un átomo que tiene una masa atómica o un número másico que se haya menos comúnmente en la naturaleza se ha aumentado (este último concepto se denomina "enriquecimiento isotópico"). Por ende, los compuestos de la descripción incluyen aquellos en los que el átomo especificado es un isótopo natural o no natural. En una realización, el isótopo es un isótopo estable. Por lo tanto, los compuestos de la descripción incluyen, por ejemplo, compuestos que contienen deuterio y similares. Por lo tanto, en una realización de la invención, el Compuesto (I) contiene un nivel enriquecido de deuterio en uno o más átomos de hidrógeno (p. ej., para un átomo de hidrógeno determinado, el nivel del isótopo de deuterio excede el 20%, 50%, 75%, 90%, 95% o 99% en número). Los ejemplos de otros isótopos que se pueden incorporar en el Compuesto (I) o enriquecerse en el Compuesto (I) incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, flúor, yodo y cloro tales como  $^3\text{H}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{123}\text{I}$  o  $^{125}\text{I}$ , que pueden ser isótopos naturales o no naturales.

35 En otro aspecto de la invención se dan a conocer uno o más metabolitos del compuesto de fórmula (I), en particular un metabolito que retiene una o más de las actividades terapéuticas del compuesto de fórmula (I). Un metabolito, tal como se emplea en este documento, es un compuesto que se produce *in vivo* a partir del metabolismo del compuesto de fórmula (I), tal como, sin limitación, metabolitos oxidativos y/o metabolitos generados, por ejemplo, a partir de O-desalquilación.

La descripción también se extiende a todas las formas polimorfas de los compuestos que se definen en esta memoria.

40 Una ruta adecuada para la preparación del compuesto de fórmula (I) se muestra a continuación (Esquema 1).

Esquema 1



Pueden requerirse grupos protectores para proteger grupos químicamente sensibles durante una o más de las reacciones anteriormente descritas, para garantizar que el proceso se lleve a cabo y/o sea eficiente. Por lo tanto, si se desea o es necesario, los compuestos intermedios pueden protegerse mediante el uso de grupos protectores convencionales. Los grupos protectores y los medios para su eliminación se describen en "Protective Groups in Organic Synthesis", de Theodora W. Greene y Peter G. M. Wuts, publicado por John Wiley & Sons Inc; 4<sup>a</sup> Rev Ed., 2006, ISBN-10: 0471697540.

Se expone una preparación detallada del Compuesto (I) en el Ejemplo 1.

Los intermedios nuevos descritos en este documento forman un aspecto de la invención.

En otro aspecto de la invención, se da a conocer el Compuesto (I) como la base libre anhidra en forma sólida, cristalina. En otro aspecto de la invención, se da a conocer el Compuesto (I) como la base libre anhidra en la forma polimorfa sólida, cristalina A que se puede obtener, por ejemplo, cristalizando el Compuesto (I) a partir de acetato de isopropilo. En un aspecto particular de la invención, se da a conocer el Compuesto (I) como la base libre anhidra en forma polimorfa sólida, cristalina B, que se puede obtener, por ejemplo, cristalizando el Compuesto (I) a partir de acetona y agua. Una relación típica de acetona a agua adecuada para este proceso es entre 5:1 y 200:1 p. ej., alrededor de 10:1. Alternativamente, la forma B se puede obtener cristalizando el Compuesto (I) a partir de acetona sola. Las descripciones detalladas del Compuesto (I) como la base libre anhidra en las formas polimorfas sólidas, cristalinas A y B se dan a conocer en los Ejemplos 1 y 3 de la Sección experimental, respectivamente.

En otro aspecto de la invención, las propiedades de estado sólido del Compuesto (I) pueden mejorarse con etapas adicionales de suspensión o recristalización para producir, por ejemplo, material con mejor morfología y/o que contiene un menor nivel de disolvente residual. Por ejemplo, el disolvente residual se puede eliminar del Compuesto (I) como la base libre anhidra en la forma polimorfa sólida, cristalina B, suspendiendo el Compuesto (I) en la forma polimorfa B, en agua, o alternativamente recristalizando más a partir de acetona. Una descripción detallada de un procedimiento de suspensión ilustrativo se da a conocer en el Ejemplo 3a de la Sección experimental.

En una realización, se da a conocer la forma polimorfa sólida, cristalina A del Compuesto (I) como la base libre anhidra que tiene un patrón XRPD sustancialmente como se muestra en la Figura 1. El método para obtener los datos XRPD se describe en Métodos analíticos y los datos se analizan en el Ejemplo 5.

Por lo tanto, se da a conocer el Compuesto (I) como la base libre anhidra en la forma polimorfa sólida, cristalina A que tiene un patrón XRPD con por lo menos un (por ejemplo uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince o los dieciséis) pico(s) en 7,8, 8,7, 10,3, 11,2, 12,4, 15,2, 16,2, 17,5, 19,7, 20,8, 22,6, 23,1, 24,6, 25,5, 26,7, 27,4 ( $\pm 0,2$  grados, valores 2-teta), en donde estos picos son característicos de la forma polimorfa sólida, cristalina A. Los picos en 10,3, 15,2, 17,5, 23,1, 24,6, 26,7 y 27,4 son particularmente característicos de la forma polimorfa sólida, cristalina A y en consecuencia es preferible que por lo menos uno (por ejemplo uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o los siete) de estos picos sea observable en el patrón XRPD.

En otra realización, se da a conocer una forma polimorfa sólida, cristalina B del Compuesto (I) como la base libre anhidra (micronizada) que tiene un patrón XRPD sustancialmente como se muestra en la Figura 2. El método de micronización se describe en el Ejemplo 4 y el método para obtener los datos de XRPD se describe en Métodos analíticos y los datos se analizan en el Ejemplo 5.

Por ende, se da a conocer el Compuesto (I) como la base libre anhidra en la forma polimorfa sólida, cristalina B (micronizada) que tiene un patrón XRPD con por lo menos un (por ejemplo uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete o los dieciocho) pico a 3,9, 6,1, 7,7, 8,6, 10,9, 11,8, 12,7, 14,3, 15,9, 16,7, 18,3, 18,7, 19,9, 20,9, 22,0, 22,6, 25,2, 28,9 ( $\pm$  0,2 grados, valores 2-teta), en donde estos picos son característicos de la forma polimorfa sólida, cristalina B. Los picos a 3,9, 6,1, 11,8, 14,3, 16,7, 18,3, 18,7 y 28,9 son particularmente característicos de la forma polimorfa sólida, cristalina B y en consecuencia es preferible que por lo menos uno (por ejemplo uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete o los ocho) de estos picos sea observable en el patrón XRPD.

Los puntos de fusión del Compuesto (I) como la base libre anhidra en las formas polimorfas sólidas, cristalinas A y B se determinaron usando calorimetría de barrido diferencial como se describe en el Ejemplo 6. Se halló que el Compuesto (I) como la base libre anhidra en la forma polimorfa sólida, cristalina A tiene un punto de fusión de 191,6 °C, y se halló que el Compuesto (I) como la base libre anhidra en la forma polimorfa sólida, cristalina B tiene un punto de fusión de 214 °C. Se halló también que la forma polimorfa B tiene un calor de fusión superior que la forma polimorfa A. Como se explica en el Ejemplo 6, estos resultados sugieren que la forma polimorfa B es termodinámicamente más estable que la forma polimorfa A.

Se investigaron las estabilidades físico-químicas del Compuesto (I) como la base libre anhidra en la forma polimorfa sólida, cristalina B, y los resultados se describen en este documento.

Con el fin de evaluar la estabilidad física, el Compuesto (I) como la base libre anhidra en la forma polimorfa sólida, cristalina B se micronizó siguiendo el procedimiento que se describe en el Ejemplo 4, y las muestras del material resultante se almacenaron en recipientes abiertos y se sometieron a diferentes temperaturas ambiente y humedades relativas. Las propiedades y estabilidades físicas de las muestras se investigaron usando TGA, DSC, DVS, espectroscopia de IR y análisis XRPD. Se exponen los procedimientos experimentales totales en la sección Procedimientos generales, y los resultados se resumen en el Ejemplo 7 (Tabla 8). Como se analizó en el Ejemplo 7, se halló que el Compuesto (I) como la base libre anhidra en la forma polimorfa sólida, cristalina B (micronizada) tiene buena estabilidad física. Se llevaron a cabo los mismos procedimientos experimentales usando el Compuesto (I) como la base libre anhidra en la forma polimorfa sólida, cristalina B en forma no micronizada y se halló que los resultados fueron prácticamente similares a aquellos obtenidos para el material micronizado, es decir, se halló que el Compuesto (I) como la base libre anhidra en la forma polimorfa sólida, cristalina B, en ambas formas micronizada y no micronizada, tiene buena estabilidad física.

Con el fin de evaluar la estabilidad química, el Compuesto (I) como la base libre anhidra en la forma polimorfa sólida, cristalina B se micronizó siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 4. Las muestras micronizadas se conservaron en recipientes abiertos y se sometieron a diferentes temperaturas ambiente y humedades relativas. Las estabilidades químicas de las muestras se analizaron por HPLC. Los resultados se resumen en el Ejemplo 8 (Tabla 9), en donde se indica que se halló que el Compuesto (I) como la base libre anhidra en la forma polimorfa sólida, cristalina B, post-micronización es químicamente estable, aunque se detectó cierta sensibilidad a la luz.

Como resultado de los estudios del estado sólido descritos en este documento, se concluyó que el Compuesto (I) como la base libre anhidra en la forma polimorfa sólida, cristalina B se puede micronizar y que el material resultante tiene buena estabilidad físico-química.

El compuesto de fórmula (I) es un inhibidor de p38 MAP cinasa (especialmente del subtipo alfa) y en un aspecto, el compuesto es útil en el tratamiento de enfermedades inflamatorias, por ejemplo EPOC y/o asma.

Sorprendentemente, el compuesto exhibe una larga duración de la acción y/o persistencia de la acción en comparación con el inhibidor de p38 MAP **BIRB796** previamente descrito.

La persistencia de la acción, tal como se emplea en la presente memoria, se refiere al índice de disociación o a la constante de disociación del compuesto de la diana (tal como un receptor). Un bajo índice de disociación puede llevar a persistencia.

Un bajo índice de disociación en combinación con un alto índice de asociación tiende a proporcionar potentes entidades terapéuticas.

Se espera que el compuesto de fórmula (I) sea potente *in vivo*.

De forma característica, los compuestos de la técnica anterior desarrollados hasta la fecha han sido destinados a la administración oral. Esta estrategia implica optimizar los compuestos que logran la duración de su acción mediante un perfil de farmacocinética adecuado, garantizando así que se establezca y mantenga una concentración del fármaco altamente suficiente entre las dosis para proporcionar un beneficio clínico. La consecuencia inevitable de este planteamiento es que todos los tejidos corporales, y especialmente el hígado y el intestino, están expuestos a concentraciones supra-terapéuticamente activas del fármaco, o bien adversamente afectados o no por la enfermedad que se esté tratando.

- 5 Una estrategia alternativa es diseñar paradigmas de tratamiento en los que el fármaco se dosifique directamente al órgano inflamado (terapia tópica). Si bien este planteamiento no es adecuado para tratar todas las enfermedades inflamatorias crónicas, se ha explotado extensamente en enfermedades de pulmón (asma, EPOC), afecciones de la piel (dermatitis atópica y psoriasis), enfermedades nasales (rinitis alérgica) y trastornos gastrointestinales (colitis ulcerosa).
- 10 En la terapia tópica, la eficacia se puede lograr asegurando que el fármaco tenga una duración sostenida de la acción y se retenga en el órgano relevante para minimizar los riesgos de toxicidad sistémica o produciendo una formulación que genere un “reservorio” del fármaco activo, que esté disponible para sostener sus efectos deseados. El primer planteamiento se ejemplifica mediante el fármaco anticolinérgico tiotropio (Spiriva). Este compuesto se administra tópicamente al pulmón como tratamiento para la EPOC, y tiene una afinidad excepcionalmente alta hacia su receptor diana, lo que produce una constante de disociación muy lenta y una consecuente duración sostenida de la acción.
- 15 En un aspecto de la descripción, el compuesto de fórmula (I) es particularmente adecuado para administración tópica, tal como administración tópica a los pulmones, en particular para el tratamiento de enfermedad respiratoria, por ejemplo enfermedades respiratorias crónicas tales como EPOC y/o asma.
- En una realización, el compuesto de fórmula (I) es adecuado para sensibilizar para el tratamiento con un corticoesteroide a pacientes que se han vuelto resistentes a dichos esquemas de tratamiento.
- El compuesto de fórmula (I) puede también ser útil para el tratamiento de artritis reumatoidea.
- 20 El compuesto de fórmula (I) puede tener propiedades antivíricas, por ejemplo la capacidad de prevenir la infección de las células (tal como las células epiteliales respiratorias) con un picornavirus, en particular un rinovirus, gripe o virus sincicial respiratorio.
- Por lo tanto, se cree que el compuesto es un agente antivírico, en particular adecuado para la prevención, el tratamiento o la mejoría de infecciones por picornavirus, tales como infección por rinovirus, gripe o el virus sincicial respiratorio.
- 25 En una realización, el compuesto de fórmula (I) es capaz de reducir la inflamación inducida por la infección vírica, tal como la infección por rinovirus y en particular infecciones víricas que producen la liberación de citocinas tales como IL-8, especialmente *in vivo*. Esta actividad puede, por ejemplo, ensayarse *in vitro* empleando un ensayo de IL-8 inducida por rinovirus como se describe en los Ejemplos de este documento.
- 30 En una realización, el compuesto de fórmula (I) es capaz de reducir la expresión de ICAM1 inducida por rinovirus, especialmente *in vivo*. ICAM1 es el mecanismo receptor utilizado por los llamados serotipos de rinovirus de surco mayor para infectar las células. Esta actividad se puede medir, por ejemplo, por el método descrito en los Ejemplos del presente documento.
- 35 Se espera que las propiedades anteriormente mencionadas tornen el compuesto de fórmula (I) particularmente adecuado para uso en el tratamiento y/o la profilaxis de exacerbaciones de enfermedades inflamatorias, en particular exacerbaciones víricas, en pacientes con una o más de las siguientes afecciones crónicas tales como insuficiencia cardíaca congestiva, EPOC, asma, diabetes, cáncer y/o en pacientes inmunodeprimidos, por ejemplo después del trasplante de un órgano.
- 40 En particular, el compuesto de fórmula (I) puede ser útil en el tratamiento de uno o más trastornos respiratorios que incluyen EPOC (incluidos bronquitis crónica y enfisema), asma, asma pediátrica, fibrosis quística, sarcoidosis, fibrosis pulmonar idiopática, rinitis alérgica, rinitis, sinusitis, especialmente asma y EPOC (incluidos bronquitis crónica y enfisema).
- El compuesto de fórmula (I) puede también ser útil en el tratamiento de una o más afecciones que se pueden tratar con terapia tópica o local, incluidas conjuntivitis alérgica, conjuntivitis, dermatitis alérgica, dermatitis de contacto, psoriasis, colitis ulcerativa, inflamación de articulaciones secundaria a artritis reumatoidea o a artrosis.
- 45 También se espera que el compuesto de fórmula (I) pueda ser útil en el tratamiento de ciertas otras afecciones que incluyen artritis reumatoidea, pancreatitis, caquexia, inhibición del crecimiento y metástasis de tumores, incluidos carcinoma pulmonar de células no pequeñas, carcinoma de mama, carcinoma gástrico, carcinomas colorrectales y melanoma maligno.
- 50 El compuesto de fórmula (I) puede ser útil en el tratamiento de enfermedades o trastornos oculares, incluidos conjuntivitis alérgica, conjuntivitis, retinopatía diabética, edema macular (incluido edema macular húmedo y edema macular seco), inflamación de cataratas postoperatoria o, particularmente, uveítis (incluidas uveítis posterior, anterior y panuveítis).
- El compuesto de fórmula (I) puede ser útil en el tratamiento de enfermedades o trastornos gastrointestinales, incluidas colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn.

El compuesto de fórmula (I) puede también re-sensibilizar el cuadro del paciente al tratamiento con un corticoesteroide, cuando el cuadro del paciente se ha vuelto resistente al mismo.

5 Asimismo, la presente invención da a conocer una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con la descripción opcionalmente combinado con uno o más diluyentes o vehículos farmacéuticamente aceptables.

La presente invención también da a conocer un procedimiento para preparar dicha composición farmacéutica, que comprende mezclar los ingredientes.

Los diluyentes y vehículos pueden incluir aquellos adecuados para administración parenteral, oral, tópica, mucosa y rectal.

10 Como se mencionó anteriormente, dichas composiciones se pueden preparar, p. ej., para administración parenteral, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intra-articular o peri-articular, particularmente en la forma de disoluciones o suspensiones líquidas, para administración oral, particularmente en la forma de comprimidos o cápsulas; para administración tópica, p. ej., pulmonar o intranasal, particularmente en la forma de polvos, gotas o aerosoles nasales y administración transdérmica; para administración mucosa, p. ej., bucal, sublingual o de la mucosa vaginal, y para  
15 administración rectal, p. ej., en la forma de un supositorio.

Las composiciones pueden administrarse convenientemente en una forma farmacéutica de dosis unitaria y se pueden preparar mediante cualquiera de los métodos conocidos en la técnica farmacéutica, por ejemplo, como se describe en Remington's Pharmaceutical Sciences, 17<sup>a</sup> ed., Mack Publishing Company, Easton, PA., (1985). Las formulaciones para administración parenteral pueden contener como excipientes agua estéril o disolución salina, alquilenglicoles tales como propilenglicol, polialquilenglicoles tales como polietilenglicol, aceites de origen vegetal, naftalenos hidrogenados y similares. Las formulaciones para administración nasal pueden ser sólidas y pueden contener excipientes, por ejemplo, lactosa o dextrano, o pueden ser disoluciones acuosas u oleosas para uso en la forma de gotas nasales o pulverizaciones dosificadas. Para administración bucal, los excipientes típicos incluyen azúcares, estearato de calcio, estearato de magnesio, almidón pregelatinizado y similares.

25 Las composiciones adecuadas para administración oral pueden comprender uno o más vehículos y/o excipientes fisiológicamente compatibles, y pueden estar en forma sólida o líquida. Se pueden preparar comprimidos o cápsulas con agentes aglutinantes, por ejemplo jarabe, goma arábiga, gelatina, sorbitol, tragacanto o polivinilpirrolidona; cargas tales como lactosa, sacarosa, almidón de maíz, fosfato de calcio, sorbitol o glicina; lubricantes tales como estearato de magnesio, talco, polietilenglicol o sílice; y tensioactivos tales como laurilsulfato sódico. Las  
30 composiciones líquidas pueden contener aditivos convencionales tales como agentes de suspensión, por ejemplo jarabe de sorbitol, metilcelulosa, jarabe de azúcar, gelatina, carboximetilcelulosa o grasas comestibles; agentes emulsionantes tales como lecitina o goma arábiga; aceites vegetales tales como aceite de almendras, aceite de coco, aceite de hígado de bacalao o aceite de cacahuete; conservantes tales como hidroxianisol butilado (BHA) e hidroxitolueno butilado (BHT). Las composiciones líquidas pueden encapsularse, por ejemplo, en gelatina para  
35 proporcionar una forma farmacéutica de dosis unitaria.

Las formas farmacéuticas orales sólidas incluyen comprimidos, cápsulas de gelatina dura de dos piezas y cápsulas de gelatina blanda elásticas (SEG).

Una formulación de recubrimiento seco habitualmente comprende aproximadamente 40% a 60% p/p concentración de gelatina, aproximadamente 20% a 30% concentración de plastificante (tal como glicerina, sorbitol o propilenglicol) y aproximadamente 30% a 40% concentración de agua. Otros materiales tales como conservantes, tintes, opacificantes y saporíferos también pueden estar presentes. El material de relleno líquido comprende un fármaco sólido que se ha disuelto, solubilizado o dispersado (con agentes de suspensión tales como cera de abeja, aceite de ricino hidrogenado o polietilenglicol 4000) o un fármaco líquido en vehículos o combinaciones de vehículos tales como aceite mineral, aceites vegetales, triglicéridos, glicoles, polioles y agentes activos de superficie.

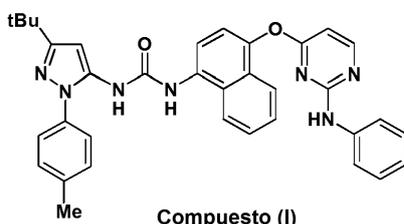
45 Adecuadamente, el compuesto de fórmula (I) se administra por la ruta tópica al pulmón. En consecuencia, se da a conocer de acuerdo con la presente invención una composición farmacéutica que comprende el Compuesto (I) de la descripción opcionalmente en combinación con uno o más diluyentes o vehículos tópicamente aceptables. La administración tópica al pulmón se puede lograr con el uso de una formulación en aerosol. Las formulaciones en aerosol típicamente comprenden el ingrediente activo suspendido o disuelto en un propulsor de aerosol adecuado, tal como un clorofluorocarbono (CFC) o un hidrofurocarbono (HFC). Los propulsores de CFC adecuados incluyen tricloromonofluorometano (propulsor 11), diclorotetrafluorometano (propulsor 114) y diclorodifluorometano (propulsor 12). Los propulsores de HFC adecuados incluyen tetrafluoroetano (HFC-134a) y heptafluoropropano (HFC-227). El propulsor típicamente comprende 40% a 99,5%, p. ej., 40% a 90% en peso de la composición de inhalación total. La formulación puede comprender excipientes que incluyen codisolventes (p. ej., etanol) y tensioactivos (p. ej., lecitina, sorbitan trioleato y similares). Las formulaciones en aerosol se envasan en latas, y se suministra una dosis  
50 adecuada mediante una válvula de dosificación (p. ej., como la provista por Bepak, Valois o 3M).  
55

La administración tópica al pulmón también se puede lograr con el uso de una formulación no presurizada tal como una disolución o suspensión acuosa. Esta se puede administrar mediante un nebulizador. Los nebulizadores pueden

ser portátiles o no portátiles La administración tópica al pulmón también se puede lograr con el uso de una formulación en polvo seco. Una formulación en polvo seco contendrá el compuesto de la descripción en forma finamente dividida, habitualmente con un diámetro aerodinámico mediano de masa (MMAD) de 1-10  $\mu\text{m}$ . La formulación típicamente contendrá un diluyente aceptable desde el punto de vista tópico tal como lactosa, usualmente de tamaño de partícula más grande, p. ej., un MMAD de 50  $\mu\text{m}$  o más, p. ej., 100  $\mu\text{m}$  o más. Un diluyente aceptable desde el punto de vista tópico alternativo es manitol. Los ejemplos de sistemas de administración de polvo seco incluyen SPINHALER, DISKHALER, TURBOHALER, DISKUS y CLICKHALER. Otros ejemplos de sistemas inhaladores de polvo seco incluyen los inhaladores de polvo seco ECLIPSE, ROTAHALER, HANDIHALER, AEROLISER, CYCLOHALER, BREEZHALER/NEOHALER, FLOWCAPS, TWINCAPS, X-CAPS, TURBOSPIN, ELPENHALER, TURBUHALER, MIATHALER, TWISTHALER, NOVOLIZER, SKYEHALER, ORIEL, MICRODOSE, ACCUHALER, PULVINAL, EASYHALER, ULTRAHALER, TAIFUN, PULMOJET, OMNIHALER, GYROHALER, TAPER, CONIX, XCELOVAIR y PROHALER.

Un aspecto de la invención se refiere a una formulación farmacéutica de polvo seco para inhalación que comprende:

(i) Compuesto (I)



que es 1-(3-terc-butil-1-p-tolil-1H-pirazol-5-il)-3-(4-(2-(fenilamino)pirimidin-4-iloxi)naftalen-1-il)urea o su sal farmacéuticamente aceptable, incluidos todos sus estereoisómeros y tautómeros, en forma particulada (p. ej., la Forma sólida, cristalina B) como ingrediente activo;

(ii) lactosa particulada como vehículo; y

(iii) una sal metálica particulada de ácido esteárico, tal como estearato de magnesio.

La invención también da a conocer un dispositivo de inhalación que comprende una o más dosis de dicha formulación.

El compuesto de fórmula (I) posee actividad terapéutica. En otro aspecto, la presente invención da a conocer un compuesto de la descripción para uso como medicamento. Por lo tanto, en otro aspecto, la presente invención da a conocer un compuesto descrito en este documento para uso en el tratamiento de una o más de las afecciones anteriormente mencionadas.

En otro aspecto, la presente invención da a conocer el uso del Compuesto (I) descrito en este documento para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de una o más de las afecciones anteriormente mencionadas.

En otro aspecto, la presente invención da a conocer un método de tratamiento de una o más de las afecciones precedentemente mencionadas, que comprende administrar a un sujeto una cantidad eficaz del Compuesto (I) de la descripción o una composición farmacéutica del compuesto.

La palabra "tratamiento" está destinada a abarcar profilaxis, además de tratamiento terapéutico.

El Compuesto (I) de la invención puede también administrarse en combinación con uno o más de otros ingredientes activos, p. ej., ingredientes activos adecuados para tratar las afecciones anteriormente mencionadas. Por ejemplo, las posibles combinaciones para el tratamiento de trastornos respiratorios incluyen combinaciones con esteroides (p. ej., budesónida, dipropionato de beclometasona, propionato de fluticasona, furoato de mometasona, furoato de fluticasona), beta-agonistas (p. ej., terbutalina, salbutamol, salmeterol, formoterol) y/o xantinas (p. ej., teofilina). Otros activos adecuados incluyen anticolinérgicos tales como tiotropio y agentes antiviricos tales como, aunque sin limitarse a ello, zanamivir u oseltamivir, por ejemplo como el fosfato. Otros agentes antiviricos incluyen peramivir y laninamivir. Otras posibles combinaciones para el tratamiento de trastornos respiratorios incluyen combinaciones con esteroides tales como flunisolida, ciclesonida y triamcinolona; beta-agonistas tales como bambuterol, levalbuterol, clenbuterol, fenoterol, broxaterol, indacaterol, reproterol, procaterol y vilanterol; antagonistas muscarínicos, (p. ej., ipratropio, tiotropio, oxitropio, glucopirronio, glucopirrolato, aclidinio, tropsio) y antagonistas de leucotrieno (p. ej., zafirlukast, pranlukast, zileuton, montelukast). Se ha de entender que cualquiera de los ingredientes activos anteriormente mencionados se puede emplear en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable.

En una realización, el compuesto de fórmula (I) y el otro ingrediente(s) activo se co-formulan en la misma formulación farmacéutica. En otra realización, el otro ingrediente(s) activo se administra en una o más formulaciones farmacéuticas separadas.

En consecuencia, otro aspecto de la invención da a conocer un producto combinado que comprende:

- 5 (A) un compuesto de la presente invención (es decir, un compuesto de fórmula (I) como se definió precedentemente, o su sal farmacéuticamente aceptable); y

(B) otro agente terapéutico,

en donde cada uno de los componentes (A) y (B) se formula en mezcla con un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 10 En este aspecto de la invención, el producto combinado puede ser o bien una formulación farmacéutica individual (combinación) o un kit de partes.

Por lo tanto, este aspecto de la invención abarca una formulación farmacéutica que incluye un compuesto de la presente invención y otro agente terapéutico en mezcla con un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable (cuya formulación se denomina en lo sucesivo "preparación combinada").

- 15 También abarca un kit de partes que comprende los siguientes componentes:

(i) una formulación farmacéutica que incluye un compuesto de la presente invención en mezcla con un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable; y

(ii) una formulación farmacéutica que incluye otro agente terapéutico, en mezcla con un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable,

- 20 en donde los componentes (i) y (ii) se proveen cada uno en forma adecuada para administración en conjunta con el otro componente.

El componente (i) del kit de partes es por lo tanto el componente (A) anteriormente mencionado en mezcla con un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable. De modo similar, el componente (ii) es el componente (B) anteriormente mencionado en mezcla con un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 25 El otro agente terapéutico (es decir, el componente (B) anteriormente mencionado) puede ser, por ejemplo, cualquiera de los ingredientes anteriormente mencionados en relación al tratamiento de trastornos respiratorios. Los datos indicados a continuación en relación con las propiedades antivíricas del compuesto de fórmula (I) ofrecen pruebas de que otras terapias antivíricas combinadas con un compuesto de fórmula (I) serían útiles en el tratamiento o la prevención de exacerbaciones inducidas por virus (por ejemplo infecciones víricas respiratorias) que padecen los pacientes con enfermedad respiratoria tal como EPOC y/o asma, y/o una o más de las indicaciones precedentemente mencionadas. Por consiguiente, en un aspecto, se da a conocer el uso del Compuesto (I) combinado con una terapia antivírica tal como, aunque sin limitarse a ello, zanamavir u oseltamivir (por ejemplo fosfato de oseltamivir) en el tratamiento o la prevención de infecciones víricas respiratorias que sufren los pacientes con enfermedad respiratoria tal como EPOC y/o asma.

- 35 Los inventores también creen que otras terapias antivíricas combinadas con el Compuesto (I) serían útiles en el tratamiento o la prevención de exacerbaciones inducidas por virus (por ejemplo, infecciones víricas respiratorias) en pacientes con afecciones crónicas que no sean enfermedades respiratorias, por ejemplo afecciones tales como insuficiencia cardiaca congestiva, diabetes, cáncer o afecciones que padecen los pacientes inmunodeprimidos, por ejemplo post-trasplante de órganos. Por lo tanto, en otro aspecto, se da a conocer el uso de un compuesto de la invención combinado con una terapia anti-vírica, tal como, aunque sin limitarse a ello, zanamavir o oseltamivir (por ejemplo fosfato de oseltamivir), en el tratamiento o la prevención de infecciones víricas respiratorias en pacientes con afecciones crónicas tales como insuficiencia cardiaca congestiva, diabetes, cáncer, o en afecciones que padecen los pacientes inmunodeprimidos, por ejemplo, post-trasplante de órganos.

#### Sección experimental

- 45 Las abreviaturas empleadas en este documento se definen a continuación (Tabla 1). Cualquier abreviatura no definida deberá transmitir su significado generalmente aceptado.

Tabla 1: Abreviaturas

AcOH	ácido acético glaciar
Ac	acuoso
50 ATP	adenosina-5'-trifosfato

	BALF	fluido de lavaje broncoalveolar
	BEGM	medio de crecimiento de células epiteliales bronquiales
	br	amplio
	BSA	albúmina de suero bovino
5	CatCart®	cartucho catalítico
	CDI	1,1-carbonil-diimidazol
	EPOC	enfermedad pulmonar obstructiva crónica
	CXCL1	ligando de quimiocina (motivo C-X-C) 1
	d	doblete
10	DCM	diclorometano
	DMSO	sulfóxido de dimetilo
	DSC	calorimetría de barrido diferencial
	células d-U937	células U-937 diferenciadas en PMA
	DVS	sorción de vapor dinámica
15	(ES <sup>+</sup> )	ionización por electropulverización, modo positivo
	Et	etilo
	EtOAc	acetato de etilo
	FCS	suero de ternero fetal
	FRET	transferencia resonante de energía en fluorescencia
20	GSK3 $\alpha$	glucógeno sintasa cinasa 3 $\alpha$
	HBEC	células epiteliales bronquiales humanas primarias
	h	hora(s)
	HRP	peroxidasa de rábano picante
	RVH	rinovirus humano
25	ICAM-1	molécula de adhesión intercelular 1
	IR	infrarrojo
	JNK	cinasa N-terminal c-Jun
	KC	quimioatrayante de queratinocitos
	Kd	constante de disociación
30	LPS	Lipopolisacárido
	(M+H) <sup>+</sup>	ión molecular protonado
	MAPK	proteína cinasa activada por mitógenos
	MAPKAP-K2	proteína cinasa 2 activada por MAP cinasas
	Me	metilo
35	MeCN	acetonitrilo
	MeOH	metanol
	MHz	megahertz

	min	minuto(s)
	MIP1 $\alpha$	proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa
	MMAD	diámetro aerodinámico mediano de masa
	MOI	multiplicidad de infección
5	m.p.	punto de fusión
	MTT	bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
	m/z:	relación masa a carga
	RMN	resonancia magnética nuclear (espectroscopia)
	PBMC	célula mononuclear de sangre periférica
10	PBS	disolución salina tamponada con fosfato
	Ph	fenilo
	PHA	fitohematoglutinina
	PMA	acetato de forbol miristato
	pTSA	ácido 4-metilbencenosulfónico
15	q	cuarteto
	TA	temperatura ambiente
	RP HPLC	cromatografía de líquidos de alto rendimiento de fase inversa
	VSR	virus sincicial respiratorio
	s	singlete
20	sat	saturado/a
	SCX	(resina) de intercambio catiónico de soporte sólido
	SDS	dodecilsulfato sódico
	S <sub>N</sub> Ar	sustitución aromática nucleófila
	t	triplete
25	TCID <sub>50</sub>	50% dosis infecciosa de cultivo tisular
	TGA	análisis termogravimétrico
	THF	tetrahidrofurano
	TNF $\alpha$	factor de necrosis tumoral alfa
	XRPD	difracción de rayos X de polvos
30	Procedimientos generales	

- Todos los materiales de partida y disolventes se obtuvieron o bien de fuentes comerciales o se prepararon de acuerdo con las citas de la bibliografía. A menos que se especifique lo contrario, todas las reacciones se agitaron. Las disoluciones orgánicas se secaron rutinariamente sobre sulfato de magnesio anhidro. Se realizaron hidrogenaciones en un reactor de flujo Thales H-cube bajo las condiciones especificadas. La cromatografía en columna se llevó a cabo en cartuchos de sílice pre-empaquetada (malla 230-400, 40-63  $\mu\text{m}$ ) usando la cantidad indicada. Se adquirió SCX de Supelco y se trató con ácido clorhídrico 1M antes del uso. A menos que se indique específicamente lo contrario, la mezcla de reacción a purificar se diluyó primero con MeOH y se tornó ácida con algunas gotas de AcOH. Esta disolución se cargó directamente al SCX y se lavó con MeOH. El material deseado se eluyó luego lavando con NH<sub>3</sub> al 1% en MeOH.
- 35 *Cromatografía de líquidos de alto rendimiento de fase inversa:* columna Agilent Scalar C18, 5  $\mu\text{m}$  (21,2 x 50 mm), caudal 28 ml. min<sup>-1</sup> eluyendo con un gradiente de H<sub>2</sub>O-MeCN que contiene ácido fórmico al 0,1% v/v en 10 min

usando detección UV a 215 y 254 nm. Información del gradiente: 0,0-0,5 min; 95% H<sub>2</sub>O-5% MeCN; 0,5-7,0 min; en rampa de 95% H<sub>2</sub>O-5% MeCN a 5% H<sub>2</sub>O-95% MeCN; 7,0-7,9 min; se mantiene a 5% H<sub>2</sub>O-95% MeCN; 7,9-8,0 min; se retorna a 95% H<sub>2</sub>O-5% MeCN; 8,0-10,0 min; se sostiene a 95% H<sub>2</sub>O-5% MeCN.

#### Métodos analíticos

5 *Cromatografía de líquidos de alto rendimiento de fase inversa:* (Método 1): columna Agilent Scalar C18, 5 µm (4,6 x 50 mm) o Waters XBridge C18, 5 µm (4,6 x 50 mm) caudal 2,5 ml. min<sup>-1</sup> eluyendo con un gradiente de H<sub>2</sub>O-MeCN que contiene o bien ácido fórmico al 0,1% v/v (ácido del Método 1) o NH<sub>3</sub> (básico del Método 1) en 7 min empleando detección UV a 215 y 254 nm.

10 Información del gradiente: 0,0-0,1 min, 95% H<sub>2</sub>O-5% MeCN; 0,1-5,0 min, en rampa de 95% H<sub>2</sub>O-5% MeCN a 5% H<sub>2</sub>O-95% MeCN; 5,0-5,5 min, se mantiene a 5% H<sub>2</sub>O-95% MeCN; 5,5-5,6 min, se mantiene a 5% H<sub>2</sub>O-95% MeCN, se aumenta el caudal a 3,5 ml min<sup>-1</sup>; 5,6-6,6 min, se mantiene a 5% H<sub>2</sub>O-95% MeCN, caudal 3,5 ml min<sup>-1</sup>; 6,6-6,75 min, se retorna a 95% H<sub>2</sub>O-5% MeCN, caudal 3,5 ml min<sup>-1</sup>; 6,75-6,9 min, se mantiene a 95% H<sub>2</sub>O-5% MeCN, caudal 3,5 ml.min<sup>-1</sup>; 6,9-7,0 min, se mantiene a 95% H<sub>2</sub>O-5% MeCN, se reduce el caudal a 2,5 ml min<sup>-1</sup>.

15 *Cromatografía de líquidos de alto rendimiento de fase inversa:* (Método 2): columna Agilent Extend C18, 1,8 µm (4,6 x 30 mm) a 40°C; caudal 2,5-4,5 ml min<sup>-1</sup> eluyendo con un gradiente de H<sub>2</sub>O-MeCN que contiene ácido fórmico al 0,1% v/v en 4 min empleando detección de UV a 254 nm. Información del gradiente: 0-3,00 min, en rampa de 95% H<sub>2</sub>O-5% MeCN a 5% H<sub>2</sub>O-95% MeCN; 3,00-3,01 min, se mantiene a 5% H<sub>2</sub>O-95% MeCN, se aumenta el caudal a 4,5 ml min<sup>-1</sup>; 3,01-3,50 min, se mantiene a 5% H<sub>2</sub>O-95% MeCN; 3,50-3,60 min, se retorna a 95% H<sub>2</sub>O-5% MeCN, se reduce el caudal a 3,50 ml min<sup>-1</sup>; 3,60-3,90 min, se mantiene a 95% H<sub>2</sub>O-5% MeCN; 3,90-4,00 min, se mantiene a 95% H<sub>2</sub>O-5% MeCN, se reduce el caudal a 2,5 ml min<sup>-1</sup>.

20 *Espectroscopia de RMN <sup>1</sup>H:* Los espectros se adquirieron en un espectrómetro Bruker Avance III a 400 MHz usando disolvente no deuterado residual como referencia.

25 *Sorción de vapor dinámica:* se obtuvieron gráficos usando un modelo para sorción de vapor dinámica de Surface Measurement Systems, DVS-1, que emplea aproximadamente 10 mg de la muestra. Se registró el cambio de peso con respecto a la humedad atmosférica a 25°C y se determinó usando los siguientes parámetros: secado: 60 min bajo nitrógeno seco; equilibrio: 60 min/paso; intervalo de datos: 0,05% o 2,0 min. Los puntos de la medición de humedad relativa [% HR] fueron los siguientes:

primer conjunto: 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 5

segundo conjunto: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 5, 0.

30 *Patrones de difracción de rayos X de polvos:* los patrones se obtuvieron en un difractor PANalytical (Philips) X'PertPRO MPD equipado con un tubo de rayos X Cu LFF (45 kV; 40 mA; Bragg-Brentano; etapa de agitación) y se adquirieron usando radiación Cu Kα bajo las siguientes condiciones de medición: modo de barrido: continuo; intervalo de barrido: 3 a 50° 2θ; tamaño del paso: 0,02°/paso; tiempo de recuento: 30 seg/paso; tiempo de revolución del agitador: 1 seg; trayecto del haz incidente: programa, rendija de divergencia: 15 mm; rendija Soller: 0,04 rad; máscara del haz: 15 mm; rendija antidisipación: 1°; cuchilla del haz: +; trayecto de haz difractado: escudo largo antidisipación: +; rendija Soller: 0,04 rad; filtro de Ni: +; detector: X'Celerator. Las muestras se prepararon propagando en un soporte de muestras sin ruido de fondo.

35 *Espectroscopia infrarroja:* se usó reflectancia total micro atenuada (microATR) y la muestra se analizó usando un accesorio adecuado microATR y las siguientes condiciones de medición: aparato: espectrómetro Thermo Nexus 670 FTIR; número de barridos: 32; resolución: 1 cm<sup>-1</sup>; intervalo de longitud de onda: 4000 a 400 cm<sup>-1</sup>; detector: DTGS con ventanas KBr; divisor de haz: Ge en KBr; accesorio de micro ATR: Harrick Split Pea con cristal Si.

40 *Calorimetría de barrido diferencial:* los datos se obtuvieron en un aparato TA-Instruments Q1000 MTDSC equipado con una unidad de refrigeración RCS. Típicamente, 3 mg de cada compuesto, en una cubeta de muestra de aluminio estándar TA-Instrument, se calentó a 10 °C/min de 25 C a 300°C. Se mantuvo una purga de nitrógeno a 50 ml/min sobre la muestra.

45 *Análisis termogravimétrico:* los datos se obtuvieron en un medidor termogravimétrico TA-Instruments Q500. Típicamente, 10 mg de cada muestra se transfirieron a una cubeta de aluminio pre-pesada y se calentó a 20 °C/min de temperatura ambiente a 300 °C o < 80[(p/p)%] a menos que se indique otra cosa.

50 *Estabilidad química por HPLC:* se llevaron a cabo análisis en una columna Waters Xbridge C<sub>18</sub> (3,0 x 150 mm; 3,5 µm) usando las siguientes condiciones operativas: temperatura de la columna: 40°C; temperatura de la muestra: 5°C; caudal: 0,45 ml/min; volumen de inyección: 7 µl; detección UV a 260 nm; composición de la fase móvil comprendida por la Fase A: acetato de amonio 10 mM + ácido trifluoroacético al 0,1%, v/v en agua, y la Fase B: acetonitrilo, usando el gradiente definido por los parámetros que siguen (Tabla 2).

Tabla 2: Condiciones del gradiente para estudios de estabilidad química por HPLC.

	% Composición en tiempo de ejecución (min)				
	0	20	25	26	32
Eluyente	0	20	25	26	32
Fase A	70	0	0	70	70
Fase B	30	100	100	30	30

## Métodos experimentales para pruebas biológicas

## Ensayos de inhibición enzimática

- 5 Las actividades de unión de la enzima cinasa de los compuestos descritos en este documento se determinaron usando un ensayo exclusivo que mide la unión competitiva de sitio dirigido activo a un ligando inmovilizado (Fabian, M.A. *et al.*, *Nature Biotechnol.*, 2005, 23:329-336). Estos ensayos se realizaron mediante DiscoverX (antes Ambit; San Diego, CA). El valor Kd (valor de la constante de disociación) se calculó como el índice de afinidad de los compuestos hacia cada cinasa.

## Ensayos de inhibición enzimática

- 10 Las actividades inhibitoras de enzimas de los compuestos descritos en este documento se determinaron por FRET usando péptidos sintéticos con fluoróforos donantes y aceptores (Z-LYTE, Invitrogen Ltd., Paisley, Reino Unido).

Inhibición de la enzima p38 MAPK $\alpha$ 

- 15 Las actividades inhibitoras de los compuestos de ensayo contra la isoforma p38 MAPK $\alpha$  (MAPK14: Invitrogen) se evaluaron indirectamente determinando el nivel de activación / fosforilación de la molécula posterior, MAPKAP-K2. La proteína p38 MAPK $\alpha$  (80 ng/ml, 2,5  $\mu$ l) se mezcló con el compuesto de ensayo (2,5  $\mu$ l de 4  $\mu$ g/ml, 0,4  $\mu$ g/ml, 0,04  $\mu$ g/ml o 0,004  $\mu$ g/ml) durante 2 h a TA. La disolución mezclada (2,5  $\mu$ l) de la diana inactiva de p38 $\alpha$ , MAPKAP-K2 (Invitrogen, 600 ng/ml) y el péptido de FRET (8  $\mu$ M; una diana de fosforilación para MAPKAP-K2) se añadieron luego y se inició la reacción de la cinasa por adición de ATP (40  $\mu$ M, 2,5  $\mu$ l). La mezcla se incubó durante 1 h a TA. Se añadió reactivo de desarrollo (proteasa, 5  $\mu$ l) durante 1 hora antes de la detección en un lector de microplacas para fluorescencia (Varioskan® Flash, ThermoFisher Scientific).
- 20

Inhibición de la enzima p38 MAPK $\gamma$ 

- 25 Las actividades inhibitoras de los compuestos de la invención contra p38MAPK $\gamma$  (MAPK12: Invitrogen) se evaluaron en un modo similar a aquel descrito anteriormente en el presente documento. La enzima (800 ng/ml, 2,5  $\mu$ l) se incubó con el compuesto de ensayo (2,5  $\mu$ l a 4  $\mu$ g/ml, 0,4  $\mu$ g/ml, 0,04  $\mu$ g/ml o 0,004  $\mu$ g/ml) durante 2 h a TA. Los péptidos de FRET (8  $\mu$ M, 2,5  $\mu$ l) y la disolución de ATP adecuada (2,5  $\mu$ l, 400  $\mu$ M) se añadieron luego a la mezcla de enzimas/compuesto y se incubó durante 1 hora. Se añadió reactivo de desarrollo (proteasa, 5  $\mu$ l) durante 1 h antes de la detección en un lector de microplacas para fluorescencia (Varioskan® Flash, Thermo Scientific).

## Inhibición de las enzimas c-Src y Syk

- 30 Las actividades inhibitoras de los compuestos de la invención contra las enzimas c-Src y Syk (Invitrogen) se evaluaron en un modo similar a aquel descrito anteriormente en este documento. La enzima relevante (3000 ng/ml o 2000 ng/ml respectivamente, 2,5  $\mu$ l) se incubó con el compuesto de ensayo (o bien 4  $\mu$ g/ml, 0,4  $\mu$ g/ml, 0,04  $\mu$ g/ml o 0,004  $\mu$ g/ml, 2,5  $\mu$ l cada una) durante 2 h a TA. Los péptidos de FRET (8  $\mu$ M, 2,5  $\mu$ l) y las disoluciones de ATP adecuadas (2,5  $\mu$ l, 800  $\mu$ M para c-Src, y 60  $\mu$ M ATP para Syk) se añadieron luego a las mezclas de enzima/compuesto y se incubaron durante 1 h. Se añadió reactivo de desarrollo (proteasa, 5  $\mu$ l) durante 1 h antes de la detección en un lector de microplacas para fluorescencia (Varioskan® Flash, ThermoFisher Scientific).
- 35

Inhibición de la enzima GSK 3 $\alpha$ 

- 40 Las actividades inhibitoras de los compuestos de ensayo contra la isoforma de la enzima GSK 3 $\alpha$  (Invitrogen) se evaluaron determinando el nivel de activación/fosforilación del péptido diana. La proteína GSK3- $\alpha$  (500 ng/ml, 2,5  $\mu$ l) se mezcló con el compuesto de ensayo (2,5  $\mu$ l o bien a 4  $\mu$ g/ml, 0,4  $\mu$ g/ml, 0,04  $\mu$ g/ml o a 0,004  $\mu$ g/ml) durante 2 h a TA. El péptido de FRET (8  $\mu$ M, 2,5  $\mu$ l), que es una diana de fosforilación para GSK3 $\alpha$ , y ATP (40  $\mu$ M, 2,5  $\mu$ l) se añadieron a la mezcla de enzima/compuesto y la mezcla resultante se incubó por 1 h. Se añadió reactivo de desarrollo (proteasa, 5  $\mu$ l) durante 1 h antes de la detección en un lector de microplacas para fluorescencia (Varioskan® Flash, ThermoFisher Scientific).

- 45 En todos los casos, la proteasa específica del sitio escinde el péptido no fosforilado solamente y elimina la señal de FRET. Los niveles de fosforilación de cada reacción se calcularon usando la relación de emisión de cumarina (donante) frente a la emisión de fluoresceína (aceptor), en donde las bajas relaciones indican una alta fosforilación y

las altas relaciones indican bajos niveles de fosforilación. El porcentaje de cada reacción se calculó en relación al control no inhibido y la concentración del 50% de inhibición (valor  $CI_{50}$ ) se calculó luego a partir de la curva de concentración y respuesta.

#### Ensayos celulares

##### 5 Liberación de TNF $\alpha$ / IL-8 inducida por LPS en células d-U937

Las células U937, una línea celular monocítica humana, se diferenciaron en células de tipo macrófagos por incubación con PMA (100 ng/ml) durante 48 a 72 horas. Las células se preincubaron con concentraciones finales del compuesto de ensayo durante 2 h y luego se estimularon con LPS (0,1  $\mu$ g/ml; de *E. Coli*: 0111: B4, Sigma) durante 4 horas. El sobrenadante se recogió para determinación de concentraciones de TNF $\alpha$  e IL-8 por ELISA sándwich (Duo-set, R&D systems). La inhibición de la producción de TNF $\alpha$  se calculó como un porcentaje de aquella lograda por 10  $\mu$ g/ml de **BIRB796** en cada concentración del compuesto de ensayo por comparación frente al vehículo control. La concentración 50% efectiva relativa ( $REC_{50}$ ) se determinó a partir de la curva de concentración y respuesta resultante. La inhibición de la producción de IL-8 se calculó en cada concentración del compuesto de ensayo por comparación con el vehículo control. La concentración de 50% de inhibición ( $CI_{50}$ ) se determinó a partir de la curva de concentración y respuesta resultante.

##### Liberación de TNF $\alpha$ inducida por LPS en células THP-1

Células THP-1, una línea celular monocítica humana, se estimularon con 3  $\mu$ g/ml de LPS (de *E. Coli*; 0111: B4, Sigma) durante 4 h y se recogió el sobrenadante para determinación de la concentración de TNF $\alpha$  por ELISA sándwich (Duo-set, R&D systems). La inhibición de la producción de TNF $\alpha$  se calculó en cada concentración por comparación con vehículo control. La concentración de 50% de inhibición ( $CI_{50}$ ) se determinó a partir de la curva de concentración y respuesta resultante.

##### Expresión de ICAM-1 inducida por Poly I:C en células BEAS2B

Se usó Poly I:C en estos estudios como un imitador vírico de ARN simple. Se transfectó una mezcla de Poly I:C-Oligofectamine (1  $\mu$ g/ml Poly I:C,  $\pm$  2% Oligofectamine, 25  $\mu$ l; Invivogen Ltd., San Diego, CA, e Invitrogen, Carlsbad, CA, respectivamente) en células BEAS2B (células epiteliales bronquiales humanas, ATCC). Las células se preincubaron con concentraciones finales de los compuestos de ensayo durante 2 horas y se determinó el nivel de expresión de ICAM-1 sobre la superficie celular mediante ELISA celular. En un punto de tiempo 18 horas después de la transfección de poly I:C, las células se fijaron con formaldehído al 4% en PBS (100  $\mu$ l) y luego se inactivó la peroxidasa endógena por adición de tampón de lavado (100  $\mu$ l, 0,05% Tween en PBS: PBS-Tween) que contenía 0,1% de azida de sodio y 1% de peróxido de hidrógeno. Las células se lavaron con tampón de lavado (3 x 200  $\mu$ l) y, después de bloquear los pocillos con leche 5% en PBS-Tween (100  $\mu$ l) durante 1 h, las células se incubaron con anticuerpo ICAM-1 anti-humano (50  $\mu$ l; Cell Signaling Technology, Danvers, MA) en BSA PBS al 1% durante toda la noche a 4°C.

Las células se lavaron con PBS-Tween (3 x 200  $\mu$ l) y se incubaron con el anticuerpo secundario (100  $\mu$ l; IgG anti-conejo conjugado a HRP, Dako Ltd., Glostrup, Dinamarca). Las células se incubaron luego con sustrato (50  $\mu$ l) durante 2-20 min, seguidas de adición de disolución de cese (50  $\mu$ l, 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). La señal de ICAM-1 se detectó leyendo la absorbancia a 450 nm contra una longitud de onda de referencia de 655 nm usando un espectrofotómetro. Las células después se lavaron con PBS-Tween (3 x 200  $\mu$ l) y se determinaron los números de células totales en cada pocillo, leyendo la absorbancia a 595 nm después de la tinción con cristal violeta (50  $\mu$ l de una disolución al 2% en PBS) y elución por disolución de SDS al 1% (100  $\mu$ l) en agua destilada. Las lecturas de OD 450-655 medidas se corrigieron para el número de células dividiendo con la lectura de OD595 en cada pocillo. La inhibición de la expresión de ICAM-1 se calculó en cada concentración del compuesto de ensayo por comparación con el vehículo control. La concentración del 50% de inhibición ( $CI_{50}$ ) se determinó a partir de la curva de concentración y respuesta resultante.

##### 45 Ensayo de mitosis celular

Mononucleocitos de sangre periférica (PBMC) de sujetos humanos se separaron de sangre completa (Quintiles, Londres, Reino Unido) usando un gradiente de densidad (Histopaque®-1077, Sigma-Aldrich, Poole, Reino Unido). Las PBMC (3 millones de células por muestra) se trataron posteriormente con 2% PHA (Sigma-Aldrich, Poole, Reino Unido) durante 48 h, seguidas de una exposición de 20 horas a concentraciones variables de los compuestos de ensayo. 2 horas antes de la recolección, las PBMC se trataron con demecolcina (0,1  $\mu$ g/ml; Invitrogen, Paisley, Reino Unido) para detener las células en metafase. Para observar las células mitóticas, las PBMC se permeabilizaron y fijaron añadiendo Intraprep (50  $\mu$ l; Beckman Coulter, Francia), y se tiñeron con anti-fosfo-histona 3 (0,26 ng/l; #9701; Cell Signalling, Danvers, MA) y yoduro de propidio (1 mg/ml; Sigma-Aldrich, Poole, Reino Unido,) como se describió previamente (Muehlbauer P.A. y Schuler M.J., *Mutation Research*, 2003, 537:117-130). Se observó la fluorescencia usando un citómetro de flujo ATTUNE (Invitrogen, Paisley, Reino Unido), seleccionando los linfocitos. Se calculó el porcentaje de inhibición de mitosis para cada tratamiento en relación al tratamiento con vehículo (0,5% DMSO).

## Liberación de IL-8 y expresión de ICAM-1 inducidas por rinovirus

Se obtuvo el rinovirus humano RV16 de la American Type Culture Collection (Colección Estadounidense de Cultivos Tipo) (Manassas, VA). Se generaron disoluciones virales del virus infectando células Hela con RVH hasta que el 80% de las células fueron citopáticas.

- 5 Se infectaron células BEAS2B con RVH a una MOI de 5 y se incubaron durante 2 h a 33°C con agitación moderada para promover la absorción. Las células se lavaron luego con PBS, se añadió medio nuevo, y las células se incubaron durante otras 72 h. Se recogió el sobrenadante para ensayo de las concentraciones de IL-8 usando un kit de desarrollo de ELISA Duoset (R&D systems, Minneapolis, MN).

- 10 El nivel de expresión de ICAM-1 en la superficie celular se determinó con un ensayo ELISA de las células. A las 72 horas de la infección, las células se fijaron con formaldehído al 4% en PBS. Después de inactivar la peroxidasa endógena añadiendo azida de sodio al 0,1% y peróxido de hidrógeno al 1%, los pocillos se lavaron con tampón de lavado (0,05% Tween en PBS: PBS-Tween). Después de bloquear el pocillo con 5% leche en PBS-Tween durante 1 h, las células se incubaron con anticuerpo antihumano ICAM-1 en 5% BSA PBS-Tween (1:500) durante la noche. Los pocillos se lavaron con PBS-Tween y se incubaron con el anticuerpo secundario (IgG anti-conejo conjugado a HRP, Dako Ltd.). Se detectó la señal de ICAM-1 añadiendo sustrato y leyendo a 450 nm con una longitud de onda de referencia de 655 nm, mediante el uso de un espectrofotómetro. Los pocillos se lavaron luego con PBS-Tween y se determinaron los números de células totales en cada pocillo leyendo la absorbancia a 595 nm después de la tinción con cristal violeta y elución con disolución de SDS al 1%. Las lecturas de OD<sub>450-655</sub> que se midieron se corrigieron para el número celular dividiendo con la lectura de OD<sub>595</sub> en cada pocillo. Los compuestos se añadieron 2 h antes de la infección por RVH y 2 h después de la infección cuando se lavó el RVH no infectado.

## Evaluación de CPE inducido por RVH16 en células MRC5

- 25 Se infectaron células MRC-5 con RVH16 a una MOI de 1 en DMEM que contenía FCS al 5% y MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, luego se incubó durante 1 h a 33°C para promover la adsorción. Se aspiraron los sobrenadantes y se añadió medio nuevo seguido de incubación durante 4 días. De proceder, las células se pre-incubaron con el compuesto o con DMSO durante 2 h, y los compuestos y el DMSO se añadieron nuevamente después del periodo de lavado del virus.

- 30 Los sobrenadantes se aspiraron e incubaron con disolución de azul de metileno (100 µl, formaldehído al 2%, metanol al 10% y azul de metileno al 0,175%) durante 2 h a TA. Después de lavar, se añadió SDS al 1% en agua destilada (100 µl) a cada pocillo, y las placas se agitaron ligeramente durante 1-2 h antes de leer la absorbancia a 660 nm. Se calculó el porcentaje de inhibición de cada pocillo. El valor CI<sub>50</sub> se calculó a partir de la curva de concentración y respuesta mediante varias diluciones seriales de los compuestos de ensayo.

Carga del virus VSR *in vitro* en células epiteliales bronquiales primarias.

- 35 Células epiteliales bronquiales humanas normales (NHBE) desarrolladas en placas de 96 pocillos se infectaron con VSR A2 (Cepa A2, HPA, Salisbury, Reino Unido) a una MOI de 0,001 en el medio de LHC8;RPMI-1640 (50:50), que contenía cloruro de magnesio 15 mM, y se incubó durante 1 h a 37°C para adsorción. Las células luego se lavaron con PBS (3 x 200 µl), se añadió medio nuevo (200 µl) y se siguió incubando durante 4 días. De proceder, las células se pre-incubaron con el compuesto o con DMSO durante 2 h y después se añadieron nuevamente después del lavado del virus.

- 40 Las células se fijaron con formaldehído al 4% en disolución de PBS (50 µl) durante 20 min, se lavaron con tampón de lavado (3 x 200 µl; PBS que incluía BSA al 0,5% y 0,05% Tween-20) y se incubaron con disolución de bloqueo (leche condensada 5% en PBS) durante 1 h. Las células después se lavaron con tampón de lavado (3 x 200 µl) y se incubaron durante 1 h a TA con anticuerpo de proteína F-fusión anti- RSV (2F7) (40 µl; monoclonal de ratón, lote 798760, Cat. núm. ab43812, Abeam) en BSA al 5% en PBS-tween). Después de lavar, las células se incubaron con una disolución de anticuerpo secundario conjugado a HRP (50 µl) en BSA al 5% BSA en PBS-Tween (lote 00053170, Cat. núm. P0447, Dako) y luego se añadió sustrato TMB (50 µl; paquete de reactivo de sustrato, lote 269472, Cat. núm. DY999, R&D Systems, Inc.). Esta reacción cesó con la adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N (50 µl) y la señal resultante se determinó por colorimetría (OD: 450 nm con una longitud de onda de referencia de 655 nm) en un lector de microplacas (Varioskan® Flash, ThermoFisher Scientific).

- 50 Las células luego se lavaron y se aplicó una disolución de cristal violeta al 2,5% (50 µl; lote 8656, Cat. núm. PL7000, Pro-Lab Diagnostics) durante 30 min. Después de lavar con tampón de lavado, se añadió SDS al 1% en agua destilada (100 µl) a cada pocillo, y las placas se agitaron ligeramente en el agitador por 1 h antes de la lectura de la absorbancia a 595 nm. Las lecturas de OD<sub>450-655</sub> medidas se corrigieron al número de células dividiendo las lecturas de OD<sub>450-655</sub> por OD<sub>595</sub>. Se calculó el porcentaje de inhibición para cada pocillo y se calculó el valor IC<sub>50</sub> de la curva de concentración de dosis y respuesta generada a partir de las diluciones seriales del compuesto.

## Efecto de los compuestos de ensayo sobre la viabilidad celular: Ensayo MTT

- 55 Se preincubaron células U937 diferenciadas con cada compuesto de ensayo (concentración final 1 µg/ml o 10 µg/ml en 200 µl del medio que se indica a continuación) bajo dos protocolos: el primero durante 4 h en 5% medio FCS

RPMI1640 y el segundo en 10% medio FCS RPMI1640 durante 24 h. El sobrenadante se reemplazó con medio nuevo (200 µl) y se añadió disolución madre de MTT (10 µl, 5 mg/ml a cada pocillo. Después de la incubación durante 1 h, se eliminó el medio, se añadió DMSO (200 µl) a cada pocillo y las placas se agitaron ligeramente durante 1 h antes de leer la absorbancia a 550 nm. Se calculó el porcentaje de pérdida de viabilidad celular de cada pocillo en relación al tratamiento con vehículo (DMSO al 0,5%). En consecuencia, un incremento aparente de la viabilidad celular para el tratamiento con el fármaco en relación con el vehículo se tabula como porcentaje negativo.

Producción de citocinas en macrófagos de esputo de EPOC.

Pacientes con EPOC inhalaron una disolución nebulizada de disolución salina hipertónica al 3% (p/v) usando un nebulizador ultrasónico (Devlbiss, Carthage, MO) con respiración tidal durante 5 min. Este procedimiento se repitió un máximo de tres veces hasta que se obtuvo suficiente esputo. Las muestras de esputo se homogeneizaron y mezclaron vigorosamente usando un mezclador en vórtex en disolución al 0,02% v/v de ditiotreitól (DTT). Las muestras se resuspendieron en PBS (40 ml) y luego se centrifugaron a 1500 rpm a 4°C durante 10 min para obtener los sedimentos de células de esputo. Los sedimentos se lavaron dos veces con PBS (40 ml). Las células de esputo luego se resuspendieron en medio libre de suero con macrófagos (macrophage-SFM, Life technologies, Paisley, Reino Unido; para lograr  $2 \times 10^6$ /célula en una placa de 24 pocillos) que contenía 20 U/ml de penicilina, 0,02 mg/ml de estreptomina y 5 µg/ml de anfotericina B y se sembró en una placa de 96 pocillos de gran unión y luego se incubó durante 2 h a 37°C y a 5% CO<sub>2</sub> para posibilitar que los macrófagos se adhirieran al fondo de la placa. Las células en la placa se lavaron con macrófagos-SFM frescos (200 µl/pocillo) para eliminar los neutrófilos y otras células contaminadas. Las células adherentes (principalmente macrófagos de esputo) en la placa se usaron para análisis posterior. La inducción y el aislamiento de los esputos se realizaron en una Unidad de Investigación de Fármacos Quintiles en Guys Hospital y se obtuvieron la aprobación ética y el consentimiento informado escrito de Quintiles.

De proceder, se añadió 1 µl de una disolución que contenía o bien el compuesto de ensayo o el artículo de referencia en las concentraciones establecidas o alternativamente 1 µl de DMSO como el vehículo control a cada pocillo (200 µl en medio) y las células se incubaron durante 2 h. Las células se estimularon con disolución LPS (50 µl, concentración final: 1 µg/ml) y se incubaron durante 4 h a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. El sobrenadante se recogió luego y se mantuvo a -80°C. Se usaron kits luminex de Millipore para medir los cuatro analitos. Después de descongelar el sobrenadante, se multiplexaron las esferas magnéticas de anticuerpo y se incubaron en una placa de 96 pocillos con disolución de fondo estándar o con el volumen adecuado de muestra durante la noche, agitando a 4°C. Después de lavar dos veces con 200 µl de tampón de lavado provisto por el kit por pocillo, usando una lavadora de placas magnéticas, las esferas se incubaron durante 1 h a TA con 25 µl de la disolución de anticuerpo conjugada a biotina provista por el kit con agitación. Se añadió disolución de estreptavidina durante 30 min agitando a TA. Después de lavar con 200 µl de tampón de lavado por pocillo, las esferas se resuspendieron en fluido envolvente (150 µl) y se analizaron de inmediato. El nivel de cada analito en el sobrenadante se calculó usando el software Xcel Fit con una ecuación de 4 o 5 parámetros usando cada curva estándar. Las inhibiciones de cada producción de citocinas se calcularon en cada concentración por comparación con el vehículo control. Los valores CI<sub>50</sub> se determinaron a partir de las curvas de concentración e inhibición usando XL-Fit (idbs, Guildford, Reino Unido)

Producción de citocinas en células epiteliales bronquiales primarias de EPOC.

Se obtuvieron células epiteliales primarias de las vías respiratorias de pacientes con EPOC adquiridas de Asterand (Royston, Reino Unido) y se mantuvieron en medio de desarrollo de células epiteliales bronquiales que se preparó mezclando juntos LHC8 (Invitrogen) (500 ml) con LHC9 (Invitrogen) (500 ml) y 3 µl de disolución de ácido retinoico (5 mg/ml) en DMSO puro. El medio se eliminó por aspiración y se añadió BEGM nuevo (200 µl) a cada pocillo. De proceder, se añadió 1 µl de una disolución del compuesto de ensayo en las concentraciones indicadas o 1 µl de DMSO como el vehículo control, y las células se incubaron durante 2 h. Las células se estimularon con TNFα (50 µl; concentración final de 50 ng/ml) y después se incubaron durante 4 h a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Se recogió luego el sobrenadante y se mantuvo a -20°C.

Se determinaron los niveles de IL-6 e IL-8 por ELISA usando los kits Elisa DuoSet® de IL-6 e IL-8 humanas de R&D Systems. Se calculó la inhibición de la producción de IL-6 e IL-8 en cada concentración por comparación con el vehículo control. El 50% de las concentraciones inhibitoras (CI<sub>50</sub>) se determinó a partir de las curvas de concentración y respuesta resultantes usando XL-Fit (idbs, Guildford, Reino Unido).

Ensayo in vivo: Farmacodinámica y actividad antiinflamatoria

Acumulación de neutrófilos inducida por LPS en ratones

A ratones Balb/c no en ayunas se les administró, por vía intra traqueal, o bien vehículo o la sustancia de ensayo en los momentos indicados (dentro del intervalo de 2-8 h) antes de la estimulación de la respuesta inflamatoria por aplicación de una exposición a LPS. A T = 0, los ratones se dispusieron en una cámara de exposición y se expusieron a LPS (7,0 ml, 0,5 mg/ml disolución en PBS) por 30 min. Después de otras 8 h, los animales fueron anestesiados, se les canularon las tráqueas y se extrajo BALF infundiéndolo y luego extrayendo de los pulmones 1,0 ml de PBS con la sonda traqueal. Se midieron los recuentos de glóbulos blancos totales y diferenciales en las muestras de BALF usando un hemocitómetro Neubaur. Se prepararon frotis de Cytospin de las muestras de BALF

por centrifugación a 200 rpm durante 5 min a TA y se tiñeron usando un sistema de tinción DiffQuik (Dade Behring). Las células se contaron empleando microscopia de inmersión en aceite. Los datos de los números de neutrófilos en BAL se muestran como  $\pm$  SEM (error estándar de la media). Se calculó el porcentaje de inhibición de acumulación de neutrófilos para cada tratamiento en relación al tratamiento con vehículo.

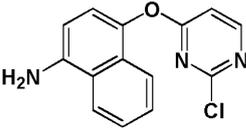
## 5 Modelo de humo de cigarrillo

Se expusieron ratones A/J (machos, 5 semanas de vida) a humo de cigarrillo (4% humo de cigarrillo, diluido con aire) durante 30 min/día durante 11 días usando un sistema de experimento de inhalación de humo de tabaco para animales pequeños (Modelo SIS-CS; Sibata Scientific Technology, Tokio, Japón). Las sustancias de ensayo se administraron por vía intranasal (35  $\mu$ l de disolución en 50% DMSO/PBS) una vez por día durante 3 días después de la exposición a humo de cigarrillo final. 12 horas después de la última dosis, se anestesió a cada uno de los animales, se les canuló la tráquea y se recogió fluido de lavaje broncoalveolar (BALF). Los números de macrófagos y neutrófilos alveolares se determinaron por análisis FACS (EPICS® ALTRA II, Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, EE. UU.) usando anticuerpo MOMA2 antirratón (macrófagos) o anticuerpo 7/4 antirratón (neutrófilos). Se centrifugó BALF y se recogió el sobrenadante. El nivel de quimioatrayente de queratinocitos (KC; CXCL1) en BALF se cuantificó usando un kit ELISA KC de ratón Quentikine® (R&D systems, Inc., Minneapolis, MN, EE. UU.).

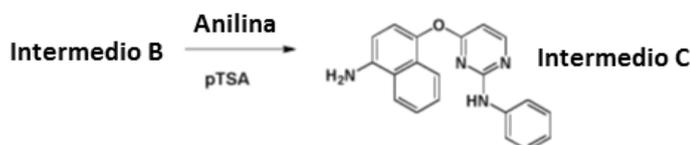
### Ejemplo 1- Preparación del compuesto (I)

Los siguientes intermedios utilizados para preparar el Compuesto (I) de la invención se han descrito previamente y se prepararon usando los procedimientos que figuran en las referencias citadas a continuación (Tabla 3).

20 Tabla 3: Intermedios previamente descritos

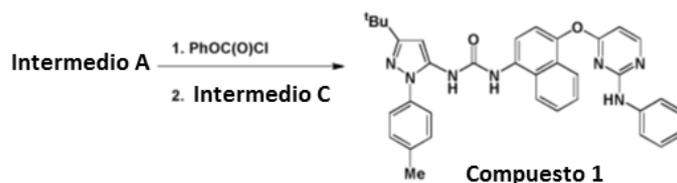
Intermedio	Estructura	Nombre, datos de LCMS y referencias
A		3-terc-butil-1-p-tolil-1H-pirazol-5-amina. R <sup>t</sup> 2,46 min (Método 1 básico); m/z 230 (M+H) <sup>+</sup> , (ES <sup>+</sup> ). Cirillo, P. F. <i>et al</i> , WO 2000/43384, 27 Jul 2000.
B		4-((2-cloropirimidin-4-il)oxi)naftalen-1-amina. R <sup>t</sup> 1,80 min (Método 2); m/z 272/274 (M+H) <sup>+</sup> , (ES <sup>+</sup> ). Cirillo, P. F. <i>et al</i> , WO 2002/92576, 21 Nov 2000.

Intermedio C: 4-((4-Aminonaftalen-1-il)oxi)-N-fenilpirimidin-2-amina.



A una disolución purgada de nitrógeno de la mezcla del Intermedio B (50,0 g, 184 mmol) y anilina (42,0 ml, 460 mmol) en THF (200 ml) se le añadió pTSA (17,5 g, 92,0 mmol) en una sola porción. La mezcla de reacción se calentó a 70 °C durante 1,5 h, tiempo durante el cual se formó un precipitado. La mezcla se enfrió hasta TA y se diluyó con THF (200 ml). El precipitado se recogió por filtración, se lavó con THF (2 x 100 ml) y luego se suspendió en una mezcla heterogénea de DCM (600 ml) y NaOH ac. (2M, 200 ml) y se agitó vigorosamente durante 1 h, tiempo durante el cual los sólidos suspendidos se disolvieron. Las capas se separaron y la capa acuosa se extrajo con DCM (200 ml). Los extractos de DCM se combinaron, se secaron y se evaporaron al vacío. El residuo se trituroó con éter (150 ml) y el sólido resultante se lavó con éter (2 x 50 ml) para proporcionar el Intermedio C en forma de un sólido blanquecino (26 g, 43%); R<sup>t</sup> 1,95 min (Método 2); m/z 329 (M+H)<sup>+</sup> (ES<sup>+</sup>).

Compuesto (I): 1-(3-(terc-Butil)-1-(p-tolil)-1H-pirazol-5-il)-3-(4-((2-(fenilamino) pirimidin-4-il)oxi)naftalen-1-il)urea.



Una mezcla heterogénea de una disolución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (3,84 g, 36 mmol) en agua (42 ml) y el Intermedio A (10,5 g, 45,7 mmol) en acetato de isopropilo (130 ml, 1,082 mol) se agitó vigorosamente a TA durante 5 min y luego se trató con clorocarbonato de fenilo (5,77 ml, 45,7 mmol). Se siguió agitando la mezcla durante otras 4 h después de lo cual se separaron las capas. La fase orgánica se añadió a una disolución del Intermedio C (10,0 g, 30,5 mmol) y trietilamina (423  $\mu\text{l}$ , 3,05 mmol) en acetato de isopropilo (60 ml, 511 mmol). La mezcla de reacción se calentó hasta 48 °C durante 1 h, luego se diluyó con acetato de isopropilo (190 ml) y se enfrió hasta TA por otras 18 h, momento durante el cual se formó un precipitado. El precipitado se aisló por filtración, se lavó con acetato de isopropilo y luego se secó al vacío a 40 °C para proporcionar el compuesto del título, Compuesto (1), en forma de un sólido blanco (base libre anhidra, forma polimorfa A) (16,5 g, 92%);  $R^t$  2,74 min (Método 2);  $m/z$  584 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup> ( $\text{ES}^+$ );  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$ : 1,30 (9H, s), 2,41 (3H, s), 6,43 (1H, s), 6,58 (1H, d), 6,78 (1H, t), 6,97 (2H, t), 7,28 (2H, br m), 7,39 (2H, d), 7,40 (1H, d), 7,49 (2H, d), 7,56 (1H, m), 7,63 (1H, m), 7,82 (1H, dd), 7,95 (1H, d), 8,10 (1H, d), 8,40 (1H, d), 8,77 (1H, s), 9,16 (1H, brs), 9,50 (1H, brs).

#### Ejemplo 2 – Resumen de resultados de estudios *in vitro* e *in vivo*

El perfil *in vitro* del Compuesto (I) descrito en este documento, según lo determinado usando los protocolos anteriormente descritos, se expone a continuación (Tablas 4a-f) en comparación con un compuesto de referencia estructuralmente relacionado que es N-(4-(4-(3-(3-terc-butil-1-p-tolil-1H-pirazol-5-il)ureido) naftalen-1-iloxi)piridin-2-il)-2-metoxiacetamida, que se ha descrito previamente como un agente antiinflamatorio potente con actividad antivírica (Ito, K. *et al.*, WO 2010/112936, PCT/GB2010/050575, 7 de oct 2010 e Ito, K. *et al.*, WO 2010/067130, PCT/GB2009/051702, 17 de jun 2010).

El compuesto de la presente invención demuestra un perfil inhibidor muy similar al Compuesto de referencia en la gama de ensayos de cinasa con la marcada excepción de la actividad inhibidora del Compuesto (I) contra la enzima GSK3 $\alpha$ , que es mucho más débil que la del Compuesto de referencia (Tabla 4a).

Tabla 4a: Perfil enzimático de p38 MAPK, c-Src, Syk y GSK3 $\alpha$  del compuesto (I)

Compuesto de ensayo	Valores $\text{CI}_{50}$ para inhibición enzimática (nM)				
	p38 MAPK $\alpha$	p38 MAPK $\gamma$	c-Src	Syk	GSK3 $\alpha$
Compuesto (I)	60	3739	22	334	>17000
Compuesto de referencia	12	344	5	42	45

El perfil de unión de cinasa del Compuesto (I) de la presente invención también se comparó con el Compuesto de referencia contra p38 MAPK, HCK, cSrc, Syk y GSK3 $\alpha/\beta$ . El Compuesto (I) exhibió un fenotipo muy diferente, demostrando la inhibición profunda de la unión frente a las cinasas p38MAPK, HCK, cSrc y Syk, sin efecto significativo contra GSK3 $\alpha$  (Tabla 4b).

Tabla 4b: Comparación del perfil de unión enzimática del Compuesto (I) con el Compuesto de referencia.

Compuesto de ensayo	Valor Kd para unión de cinasa (nM)						
	p38 MAPK $\alpha$	p38 MAPK $\gamma$	HCK	cSrc	Syk	GSK3 $\alpha$	GSK3 $\beta$
Compuesto (I)	20	43	8	10	14	20000	1200
Compuesto de referencia	1	5	5	4	9	180	24

5 El compuesto de la presente invención demuestra un perfil similar al Compuesto de referencia en ensayos celulares que revelan propiedades antiinflamatorias contra la liberación mediada por endotoxinas tanto de TNF $\alpha$  como de IL-8 (Tabla 4c). Los perfiles de los compuestos son también similares en sistemas celulares que miden sus efectos sobre la replicación del virus respiratorio (expresión de ICAM1 y CPE inducida por RVH y expresión estimulada por VSR de proteína F) así como también inflamación inducida por virus (liberación evocada por RVH de IL-8; Tabla 4d).

10 Tabla 4c: Inhibición de liberación de TNF $\alpha$  e IL-8 inducida por LPS y expresión de ICAM inducida por PolyIC para el Compuesto (I)

Compuesto de ensayo	Liberación inducida por LPS (nM)			PolyIC /
	TNF $\alpha$		IL-8	ICAM1 (nM)
	CI <sub>50</sub> (THP1)	REC <sub>50</sub> (dU937)	CI <sub>50</sub> (dU937)	CI <sub>50</sub> (BEAS2B)
Compuesto (I)	3,4	2,3	2,2	10,2
Compuesto de referencia	13	0,13	1,3	2,1

Tabla 4d: Efecto del Compuesto (I) sobre la propagación de RVH-16 (CPE) e inflamación (Expresión de ICAM-1 y liberación de IL-8) y sobre la propagación del VSR (expresión de proteína F).

Sustancia de ensayo	Valores CI <sub>50</sub> (nM) para liberación/expresión estimulada por el RVH			Valores CI <sub>50</sub> (nM) para expresión estimulada por el VSR
	Liberación/expresión estimulada			
	IL-8 (BEAS2B)	ICAM1 (BEAS2B)	CPE (MRC5)	Proteína F (HBEC)
Compuesto (I)	0,036	0,023	17,1	15,4
Compuesto de referencia	0,065	0,37	4,7	22,0

15 El compuesto de la presente invención demostró mayor eficacia en la producción de citocinas pro-inflamatorias en macrófagos y de esputo y células epiteliales bronquiales que se obtuvieron de pacientes con EPOC, que fueron en gran medida insensibles al propionato de fluticasona, un corticoesteroide. (Tabla 4e).

Tabla 4e: Efecto del Compuesto (I) y propionato de fluticasona sobre la liberación de citocinas pro-inflamatorias en macrófagos de esputo y células epiteliales bronquiales de pacientes con EPOC.

Tipo de células	Citocina	Valores CI <sub>50</sub> (nM) y/o E máx (% entre paréntesis) <sup>1</sup> para la sustancia de ensayo indicada	
		Compuesto (I)	Propionato de fluticasona
Macrófago de esputo	IL-6	43 (79)	(26)
	IL-8	68 (64)	(19)
	TNFα	17 (86)	(18)
	MIP1α	7,5 (89)	(20)
Célula epitelial bronquial	IL-6	1,7 (100)	(38)
	IL-8	0,85 (100)	(17)

1. Los valores e-máx (inhibición máxima) se calcularon como el % de inhibición obtenido a 0,1 µg/ml

5 No obstante, ventajosamente, el Compuesto (I) exhibe marcadamente menos actividad en sistemas de ensayo que miden su impacto sobre la viabilidad celular y la división celular (mitosis) indicando que es probable que el compuesto posea un índice terapéutico superior que el Compuesto de referencia (Tabla 4f).

Tabla 4f: Efecto del Compuesto (I) sobre la viabilidad celular y la división celular

Sustancia de prueba	Ensayo MTT <sup>1</sup>		Ensayo de mitosis
	Viabilidad celular en el punto de tiempo indicado en células d-U937		% de inhibición a 5 µg/ml en células PBMC
	4h	24h	
Compuesto (I)	-ve	-ve	31,3
Compuesto de referencia	-ve	+ve	87,8

10 1. Estudio de viabilidad celular: -ve y +ve indican que el valor está debajo y encima, respectivamente, del umbral de efecto no significativo definido como el 30% de inhibición a 1 µg/ml en el punto de tiempo indicado.

Se descubrió que el tratamiento de ratones con el Compuesto (I) produce una inhibición dependiente de la dosis sobre la acumulación de neutrófilos inducida por LPS, y un experimento de curso de tiempo reveló que la sustancia del fármaco tenía una larga duración de la acción (Tabla 5).

Tabla 5: Efectos del tratamiento con el Compuesto (I) sobre la neutrofilia de las vías respiratorias inducida por LPS en ratones.

Compuesto (I) (mg/ml)	Número de neutrófilos en BALF ( $\times 10^5$ /ml) en el tiempo pre-dosis indicado (% inhibición) <sup>1</sup>		
	2 h	8 h	12 h
Vehículo	18,9 $\pm$ 2,5	-	-
0,05	15,6 $\pm$ 2,1 (18)	-	-
0,2	9,8 $\pm$ 1,6 (48)	-	-
1,0	4,4 $\pm$ 0,89 (77)	9,9 $\pm$ 1,8 (48)	18,3 $\pm$ 2,3 (4)

1. N = 8 por grupo

- 5 Se investigó el resultado del tratamiento con el Compuesto (I) sobre la acumulación de macrófagos y neutrófilos en BALF en el modelo de humo de cigarrillos en ratones (Tabla 6a). Se describe que el modelo de humo de cigarrillo empleado para este estudio es un sistema resistente a los coricoesteroides, (Medicherla S. *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2008, 324(3):921-9.) y se confirmó que el propionato de fluticasona no inhibió la acumulación ni de neutrófilos ni de macrófagos en las vías respiratorias a 1,75  $\mu$ g/ratón (35  $\mu$ l, dos veces al día, i.n.), la misma dosis que produjo >80% de inhibición de la acumulación de neutrófilos inducida por LPS.
- 10 Se descubrió que el tratamiento de ratones con el Compuesto (I) produce una inhibición dependiente de la dosis en la acumulación tanto de macrófagos como de neutrófilos en BALF inducida por humo de cigarrillo.

Tabla 6a: Efectos del tratamiento con el Compuesto (I) sobre el humo del tabaco en ratones.

Compuesto de tratamiento (I) ( $\mu$ g/ml)	Número de células en BALF $\times 10^4$ /ml (% de inhibición)	
	Macrófago	Neutrófilo
Vehículo + Aire	4,3 $\pm$ 0,45	2,6 $\pm$ 0,21
Vehículo + Humo de tabaco	14,4 $\pm$ 0,33	13,7 $\pm$ 0,31
0,32	13,3 $\pm$ 0,20 (11)	12,4 $\pm$ 0,32 (12)
1,6	11,6 $\pm$ 0,42 (28)	10,5 $\pm$ 0,06 (29)
8,0	10,1 $\pm$ 0,42 (43)	9,1 $\pm$ 0,28 (41)
40	7,9 $\pm$ 0,20 (64)	7,9 $\pm$ 0,34 (52)

Los datos de los números de células se exponen como  $\pm$  SEM, N=5

- 15 El tratamiento de ratones con el Compuesto (I) también inhibió la producción de CXCL1 (KC) inducida por humo de cigarrillo en BALF en un modo dependiente de la dosis (Tabla 6b).

Tabla 6b: Efectos del tratamiento con el Compuesto (I) en la liberación de CXCL1 (KC) en BALF en ratones sobre el humo de tabaco.

Tratamiento Compuesto (I) (µg/ml)	CXCL1 en BALF pg/ml (% inhibición)
Vehículo + Aire	8.2 ± 0.30
Vehículo + Humo de tabaco	13,6 ± 1,69
0,32	13,6 ± 1,69 (0)
1,6	12,2 ± 0,96 (26)
8,0	11,4 ± 0,15 (41)
40	9,5 ± 0,84 (76)

Los datos del nivel de CXCL se exponen como ± SEM, N=5

5 En síntesis, estos resultados sugieren que el Compuesto (I) tiene propiedades antiinflamatorias similares al Compuesto de referencia descrito anteriormente y, ventajosamente, se asocia con un índice terapéutico superior.

Ejemplo 3: Preparación del Compuesto (I) como la base libre anhidra en la forma polimorfa sólida, cristalina B

10 El Compuesto (I) (398 g, en la forma polimorfa A) se recogió en acetona (3,98 l) y la disolución se calentó a 50°C. Se añadió luego NORIT A SUPRA (19,9 g, un carbono activado) tierra diatomácea calcinada (3,98 g; un agente de filtro), y la mezcla se calentó a reflujo (56°C) durante 15 min. La mezcla se filtró y el sólido resultante se lavó con acetona (100 ml). El filtrado combinado y el lavado se calentaron a reflujo (56°C), y se eliminaron 900 ml de disolvente por destilación bajo presión atmosférica a 56°C. La mezcla se enfrió a 50°C y se añadió luego agua (398 ml) en un periodo de 1 h mientras se mantenía la temperatura a 50°C. Después de 30 min adicionales a 50°C, la mezcla heterogénea se enfrió a 20°C durante 6 h y luego se agitó a 20°C durante 10 h. El producto resultante se filtró y la torta se lavó con acetona (318 ml). El producto se secó al vacío a 45°C durante 20 h para producir el  
15 Compuesto (I) como la base libre anhidra en la forma polimorfa sólida, cristalina B (240,9 g; 60,5% de rendimiento).

El método anterior puede adaptarse opcionalmente para facilitar la cristalización con siembra.

Ejemplo 3a: Preparación del Compuesto (I) como la base libre anhidra en la forma polimorfa sólida, cristalina B que contiene disolvente residual reducido

20 Opcionalmente, el Compuesto (I) como la base libre anhidra en la forma polimorfa sólida, cristalina B, preparado de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente (Ejemplo 3) o método similar, se puede resuspender del agua con el fin de reducir el disolvente residual de la siguiente manera:

25 El Compuesto (I) como la base libre anhidra en la forma polimorfa sólida, cristalina B (230 g, preparado de acuerdo con el Ejemplo 3) se suspendió en agua desionizada (2,30 l) y se agitó a 20°C durante 4 h. La mezcla se filtró y el producto se lavó con agua desionizada (2 x 115 ml) y luego se secó a 45°C al vacío para producir el Compuesto (I) como la base libre anhidra en la forma polimorfa sólida, cristalina B que contiene disolvente residual reducido (227 g, 98,7%).

Ejemplo 4: Micronización del Compuesto (I) como la base libre anhidra en la forma polimorfa sólida, cristalina B

30 Se preparó la forma polimorfa cristalina micronizada B del Compuesto (I) como la base libre anhidra usando un dispositivo de micronización de molino a chorro (1,5 bar que emplea un alimentador manual con una presión del inyector de 1,5 bar) (fabricado por Hosokawa Alpine). La distribución del tamaño de partícula se midió usando difracción láser (instrumento Malvern Mastersizer 2000S). Las distribuciones de los tamaños de partículas pueden representarse usando valores  $D_{10}$ ,  $D_{50}$  y  $D_{90}$ . El valor  $D_{50}$  de la media de las distribuciones de los tamaños de partículas se define como el tamaño de partícula en micrómetros que divide la distribución a la mitad. La medición derivada de la difracción láser se describe de manera más precisa como una distribución del volumen y en  
35 consecuencia el valor  $D_{50}$  obtenido usando este procedimiento se denomina más eficazmente valor  $Dv_{50}$  (mediana para una distribución de volumen). Tal como se emplean en este documento, los valores  $Dv$  hacen referencia a las distribuciones de tamaños de partículas medidas usando difracción láser. De modo similar, los valores  $D_{10}$  y  $D_{90}$ , utilizados en el contexto de difracción láser, significan valores  $Dv_{10}$  y  $Dv_{90}$  y hacen referencia al tamaño de partícula en el cual 10% de la distribución yace debajo del valor  $D_{10}$  y 90% de la distribución yace debajo del valor  $D_{90}$ ,

respectivamente. La forma polimorfa cristalina micronizada B del Compuesto (I) como la base libre anhidra tuvo la siguiente distribución del tamaño de partícula: D<sub>10</sub> de 0,850 µm; D<sub>50</sub> de 1,941 µm y D<sub>90</sub> de 4,563 µm.

Ejemplo 5: Análisis XRPD del Compuesto (I) como la base libre anhidra en las formas polimorfas sólidas, cristalinas A y B

- 5 El análisis XRPD del Compuesto (I) como la base libre anhidra en las formas polimorfas sólidas, cristalinas A y B (la forma polimorfa B se micronizó siguiendo el procedimiento del Ejemplo 4) se emprendió usando el método descrito en los Procedimientos generales. Los patrones de difracción resultantes se exponen en las Figuras 1 y 2 respectivamente. Ambos patrones de XRPD exhibieron picos de difracción sin la presencia de un halo, indicando así que ambos materiales son cristalinos. Los picos y sus intensidades se exponen a continuación (Tabla 7a y Tabla 10 7b).

Tabla 7a: Picos característicos de XRPD y sus intensidades para el Compuesto (I) como la base libre anhidra en la forma sólida, cristalina A

Picos de XRPD	
Valores 2-teta <sup>1</sup>	Intensidades
7,8	19,7
8,7	20,8
10,3	22,6
11,2	23,1
12,4	24,6
15,2	25,5
16,2	26,7
17,5	27,4

1. Los valores son en grados ± 0,2

15

Tabla 7b: Picos característicos de XRPD para el Compuesto (I) como la base libre anhidra en la forma sólida, cristalina B, post-micronización.

Picos de XRPD	
Valores 2-teta <sup>1</sup>	Intensidades
3,9	16,7
6,1	18,3
7,7	18,7
8,6	19,9
10,9	20,9
11,8	22,0
12,7	22,6
14,3	25,2

Valores 2-teta <sup>1</sup>	Intensidades
15,9	28,9

1. Los valores son en grados  $\pm 0,2$

Ejemplo 6: Determinación del punto de fusión del Compuesto (I) como la base libre anhidra en las formas polimorfas sólidas, cristalinas A y B

5 Los puntos de fusión del Compuesto (I) como la base libre anhidra en las formas polimorfas sólidas, cristalinas A y B (la última post-micronización) se obtuvieron empleando calorimetría de barrido diferencial (DSC), como se describe en los Procedimientos generales. La forma polimorfa A se fundió a 191,6°C y la forma polimorfa B se fundió a 214,0°C. A partir de los datos de la DSC, se calculó que la forma B tenía un calor de fusión superior que la forma A. Dado que la forma B también tiene un punto de fusión superior que la forma A, esto indica que las formas polimorfas A y B se relacionan en forma monotrópica, lo que significa que la forma polimorfa B de fusión superior será más estable que la forma polimorfa A de fusión inferior, con todas las temperaturas. Como tal, puede esperarse que la forma polimorfa B sea termodinámicamente más estable que la forma polimorfa A.

Ejemplo 7: Análisis térmico del Compuesto (I) como la base libre anhidra en la forma polimorfa sólida, cristalina B, post-micronización.

15 Se llevó a cabo el análisis térmico del Compuesto (I) como la base libre anhidra en la forma polimorfa cristalina B (micronizada) usando análisis TGA, DVS, XRPD, espectroscopia IR y DSC como se describe en los Procedimientos generales. De proceder, se comparó una muestra a temperatura ambiente y humedad relativa (muestra de referencia / "0 días") con las muestras almacenadas a distintas temperaturas y humedades relativas (muestras comparativas).

20 *Análisis termogravimétrico:* La muestra de referencia ( $t = 0$ ) y las muestras comparativas que se expusieron antes del análisis a diferentes condiciones de almacenamiento, se calentaron a un índice de 20°C/min de TA a 300°C. La curva de TGA de la muestra de referencia ( $t = 0$ ) se ilustra en la Figura 3 y los resultados de todas las muestras se resumen a continuación (Tabla 8). Como se puede ver a partir de la Figura 3, se observó una pérdida de peso de 0,6% en el intervalo de temperatura de TA a 180°C, que se debió a la evaporación del disolvente. La pérdida de peso que ocurrió por encima de 180°C se debió a la evaporación y descomposición del producto. Comparando este perfil de pérdida de peso con aquellos de las muestras comparativas en la Tabla 8, no se observaron diferencias significativas.

30 *Sorción de vapor dinámica:* El gráfico de isotermas de DVS para la muestra de referencia micronizada se ilustra en la Figura 4 y el cambio de DVS en el gráfico de masas para la muestra de referencia micronizada se ilustra en la Figura 5. Durante la etapa de secado inicial, no se registró pérdida de peso y el producto no exhibió comportamiento higroscópico. El producto adsorbió hasta 0,4% de humedad, dependiendo de la humedad atmosférica. Se halló que el producto se secaba completamente y permanecía en el mismo estado sólido cristalino (forma B) durante la prueba, según lo evidenciado por el espectro de IR y el patrón de XRPD que es sustancialmente el mismo antes y después del análisis de DVS.

35 *Análisis de XRPD y espectroscopia de IR.* El patrón de difracción de XRPD de la muestra de referencia ( $t = 0$ ) se ilustra en la Figura 2 y el trazo de IR se ilustra en la Figura 6. El patrón de difracción y el trazo de IR se compararon con aquellos de las muestras comparativas (expuestas a diferentes condiciones de almacenamiento) y los resultados se resumen en la Tabla 8. Los patrones de difracción y los trazos de IR fueron idénticos para todas las muestras.

40 *Calorimetría de barrido diferencial.* La muestra de referencia ( $t = 0$ ) y las muestras comparativas, previamente expuestas a diferentes condiciones de almacenamiento, se calentaron a un índice de 10°C/min de 25°C a 300°C. La curva de DSC de la muestra de referencia se ilustra en la Figura 7 y los resultados de todas las muestras se resumen a continuación (Tabla 8). A partir de la Figura 7, es obvio que la muestra de referencia se fundió con la descomposición a 214,0°C.

Tabla 8: Análisis térmico del Compuesto (I) como la base libre anhidra en la forma polimorfa, sólida, cristalina B post-micronización.

Condiciones de almacenamiento	TGA		XRD <sup>1,2</sup>	IR	DSC <sup>3</sup>	Aspecto
	<100°C	<180°C				
T = cero		0,6	Crist. Ref	Crist. Ref	214	blanquecino
1 semana / 80°C	NE	NE	~Ref	~Ref	NE	blanquecino
1 semana/70°C / 75% HR	NE	NE	~Ref	~Ref	NE	blanquecino
4 semanas / TA / <5 % HR	0,8	0,5	~Ref	~Ref	214	blanquecino
4 semanas / TA / 56% HR	0,5	0,4	~Ref	~Ref	214	blanquecino
4 semanas / TA / 75 % HR	0,9	0,5	~Ref	~Ref	214	blanquecino
4 semanas / 50°C	1,3	0,5	~Ref	~Ref	214	blanquecino
4 semanas /40°C / 75% HR	0,8	0,3	~Ref	~Ref	214	blanquecino

1. Crist.: cristalino; 2.~Ref: patrón idéntico con la muestra de referencia, 3. máx (°C); NE: No ensayado en este estudio

- 5 En síntesis, es obvio que el Compuesto (I) como la base libre anhidra en la forma polimorfa sólida, cristalina B tiene buena estabilidad física.

Ejemplo 8: Análisis de HPLC del Compuesto (I) como la base libre anhidra en la forma polimorfa sólida, cristalina B post-micronización.

- 10 La estabilidad química del Compuesto (I) como la base libre anhidra en la forma polimorfa sólida, cristalina B, después de la micronización, se determinó comparando una muestra mantenida a temperatura ambiente y humedad relativa (muestra de referencia) con muestras almacenadas a las distintas temperaturas y humedades relativas que se expusieron aquí previamente (las muestras comparativas, Tabla 8). Las muestras de referencia y comparativas se analizaron luego por HPLC usando el método descrito en los Procedimientos generales y por inspección visual.
- 15 Los resultados de este estudio (datos resumidos en la Tabla 9) revelan que el Compuesto (I), preparado como la base libre anhidra en la forma polimorfa sólida, cristalina B es químicamente estable aunque se observó cierta sensibilidad a la luz.

Tabla 9: Estabilidad química del Compuesto (I) como la base libre anhidra en la forma polimorfa sólida, cristalina B, post-micronización.

Condiciones de almacenamiento	Suma de impurezas por HPLC (%) <sup>1</sup>		Aspecto <sup>1</sup>	
	1 semana	4 semanas	1 semana	4 semanas
T = cero	0,66	NE	blanquecino	NE
0,3 día, luz ICH <sup>2</sup>	1,44	NE	blanquecino	NE
80°C	0,73	NE	blanquecino	NE
70°C / 75% HR	0,73	NE	blanquecino	NE
40°C / 75% HR	0,66	0,68	blanquecino	blanquecino
50°C	0,69	0,66	blanquecino	blanquecino
RT / <5% HR	NE	0,67	NE	blanquecino
RT / 56% HR	NE	0,67	NE	blanquecino
RT / 75% HR	NE	0,67	NE	blanquecino

1. NE en este sistema de ensayo; 2. Luz del día estimulada: recinto claro 700 W/m<sup>2</sup>.

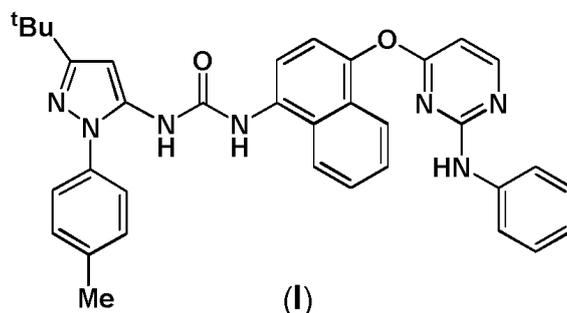
#### Ejemplo 9 – Preparación de formulaciones farmacéuticas

- 5 Una formulación farmacéutica ilustrativa de la invención consistiría en 0,4% en peso del Compuesto (I) (como la base libre anhidra en la forma polimorfa sólida, cristalina B), 98,6% en peso de monohidrato de lactosa (grado de inhalación) y 1,0% en peso de estearato de magnesio, en donde el % en peso de todos los componentes se basa en el peso de la formulación farmacéutica seca.

- 10 En toda la memoria y las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera otra cosa, se entenderá que la palabra 'que comprenden', y variaciones tales como 'que comprende' y 'comprende/n', implica la inclusión de un entero, etapa, grupo de enteros o grupo de etapas establecido, pero no la exclusión de ningún otro entero, etapa, grupo de entero o grupo de etapas.

## REIVINDICACIONES

1 Un compuesto de fórmula (I)



o su sal farmacéuticamente aceptable, incluidos todos sus estereoisómeros y tautómeros.

- 5 2 Un compuesto según la reivindicación 1, como la base libre.
- 3 Un compuesto según la reivindicación 2, como la base libre anhidra en forma cristalina, sólida.
- 4 Un compuesto según la reivindicación 3, en donde el compuesto de fórmula (I) como la base libre anhidra está en la forma sólida, cristalina que tiene un patrón de difracción de rayos X de polvos que contiene siete picos seleccionados entre ( $\pm 0,2$ ) 10,3, 15,2, 17,5, 23,1, 24,6, 26,7 y 27,4 grados 2-teta.
- 10 5 Un compuesto según la reivindicación 3, en donde el compuesto de fórmula (I) como la base libre anhidra está en la forma cristalina sólida que tiene un patrón de difracción de rayos X de polvos que contiene ocho picos seleccionados entre ( $\pm 0,2$ ) 3,9, 6,1, 11,8, 14,3, 16,7, 18,3, 18,7 y 28,9 grados 2-teta.
- 6 Una composición farmacéutica que comprende un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en combinación con uno o más diluyentes o vehículos farmacéuticamente aceptables.
- 15 7 Una composición farmacéutica según la reivindicación 6, que es una formulación en polvo seco que contiene el compuesto de fórmula (I) en forma finamente dividida.
- 8 Una composición farmacéutica según la reivindicación 6, que es una formulación farmacéutica en polvo seco para inhalación, que comprende:
- (i) el compuesto de fórmula (I) en forma particulada como ingrediente activo;
- 20 (ii) lactosa particulada como vehículo; y
- (iii) una sal metálica particulada de ácido esteárico.
- 9 Un compuesto de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para uso como medicamento.
- 10 Un compuesto de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o una composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8 para uso en el tratamiento o la prevención de exacerbaciones en
- 25 pacientes que padecen enfermedad respiratoria crónica, tal como EPOC (incluidos bronquitis crónica y enfisema), asma, asma pediátrica, fibrosis quística, sarcoidosis, fibrosis pulmonar idiopática.
- 11 Un compuesto de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o una composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8 para uso en el tratamiento o la prevención de una afección seleccionada entre: EPOC (que incluye bronquitis crónica y enfisema), asma, asma pediátrica, fibrosis quística,
- 30 sarcoidosis, fibrosis pulmonar idiopática, rinitis alérgica, rinitis, sinusitis, conjuntivitis alérgica, conjuntivitis, dermatitis alérgica, dermatitis de contacto, psoriasis, colitis ulcerosa, inflamación de las articulaciones secundaria a artritis reumatoidea o artrosis, artritis reumatoidea, pancreatitis, caquexia, inhibición del crecimiento y metástasis de tumores que incluyen carcinoma de células no pequeñas, carcinoma de mama, carcinoma gástrico, carcinomas colorrectales y melanoma maligno.
- 35 12 Un compuesto de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o una composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8 para uso en el tratamiento o la prevención de infecciones víricas respiratorias en pacientes con afecciones crónicas tales como insuficiencia cardíaca congestiva, diabetes, cáncer, o en pacientes inmunodeprimidos, por ejemplo post-trasplante de órganos.
- 40 13 Un compuesto de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o una composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8 en combinación con terapia antivírica tal como zanamivir u

oseltamivir (por ejemplo fosfato de oseltamivir), para uso en el tratamiento o la prevención de infecciones víricas respiratorias en pacientes con afecciones crónicas tales como insuficiencia cardíaca congestiva, diabetes, cáncer, o en pacientes inmunodeprimidos, por ejemplo post-trasplante de órganos.

14 Un producto de combinación que comprende:

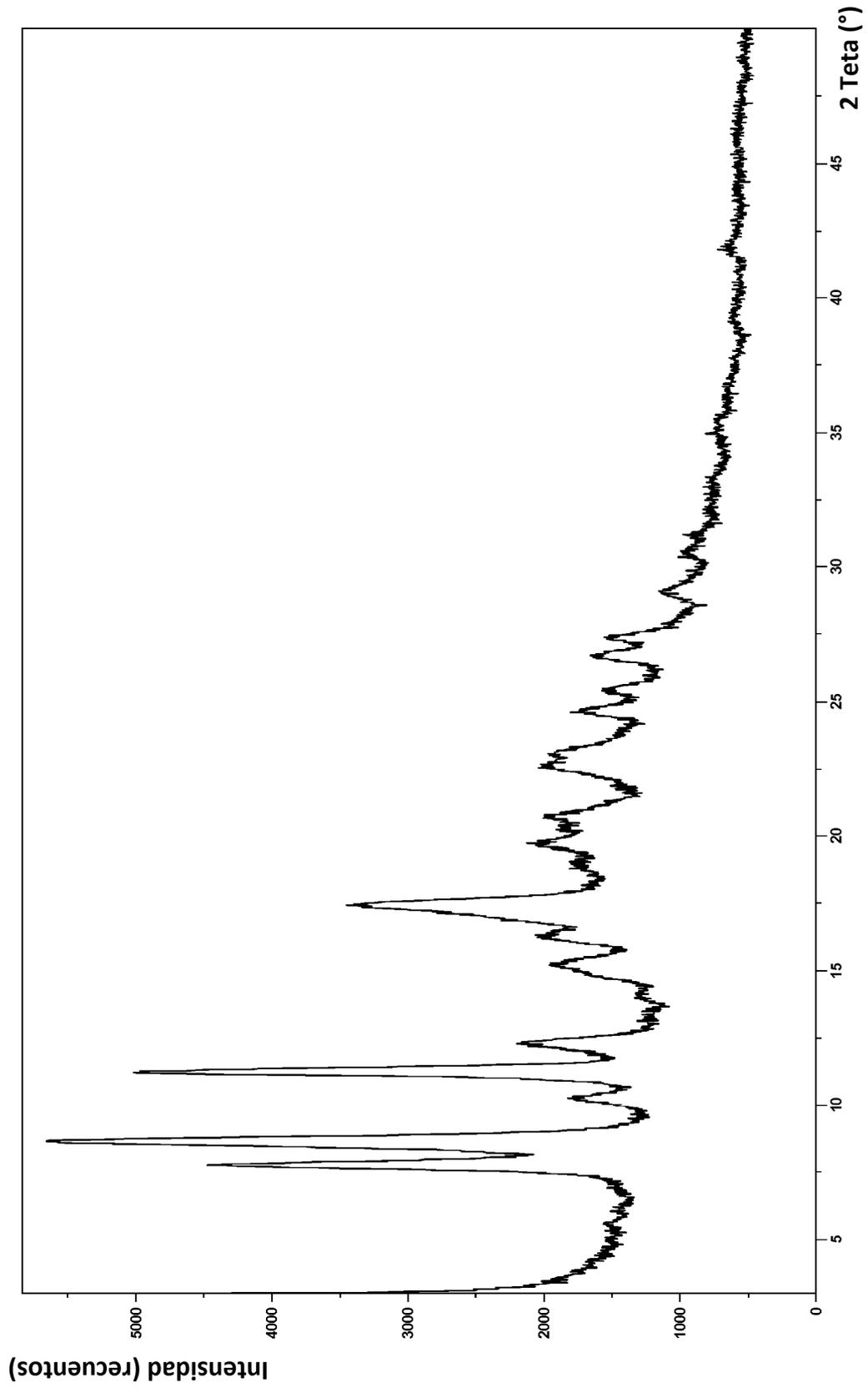
- 5 (A) un compuesto de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5; y  
(B) otro agente terapéutico;

en donde cada uno de los componentes (A) y (B) se formula en mezcla con un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable;

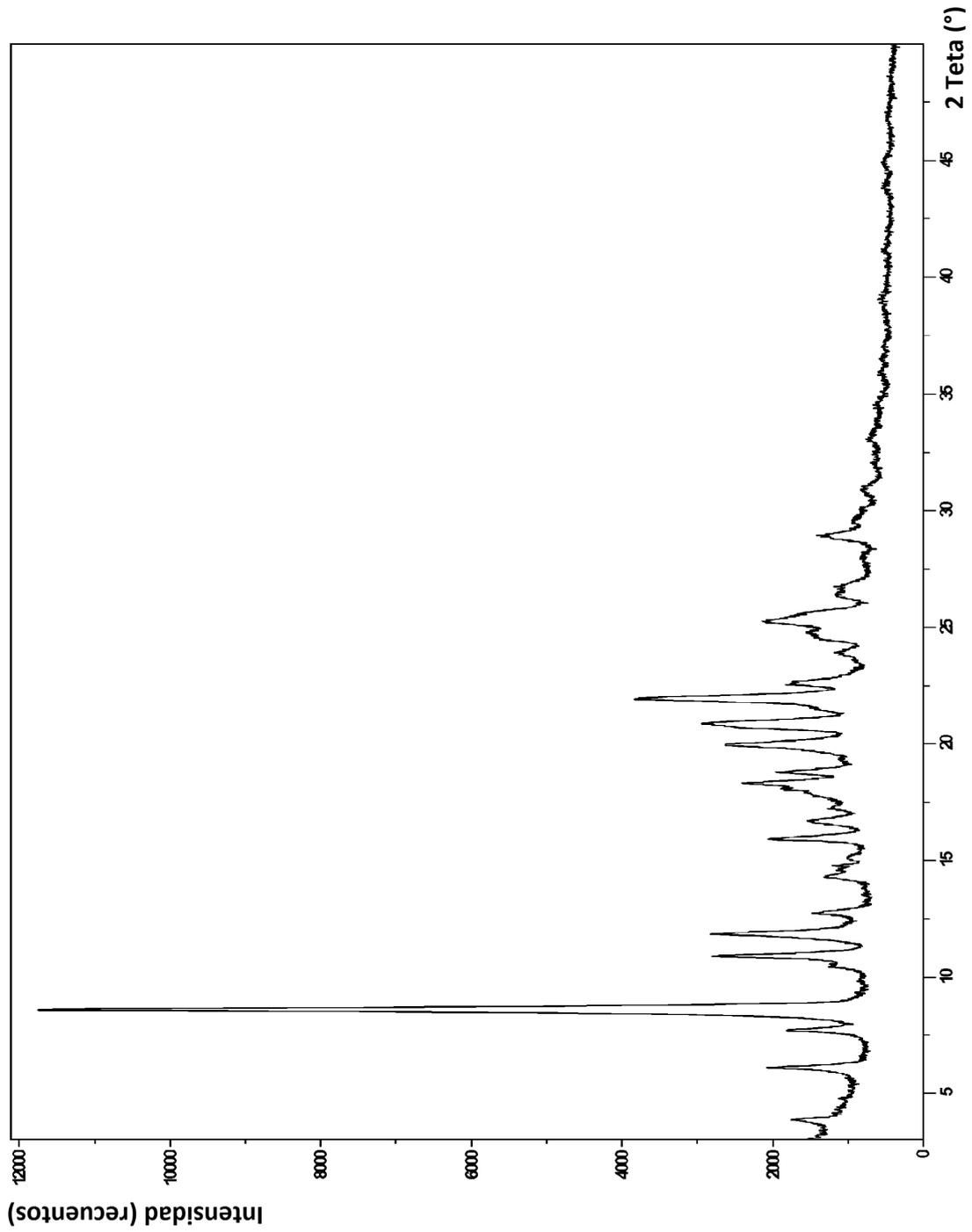
10 en donde dicho producto de combinación puede ser o bien una formulación farmacéutica individual o un kit de partes.

15 Un compuesto de fórmula (I) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para uso en el tratamiento de trastornos respiratorios combinado con uno o más de otros ingredientes activos seleccionados entre: esteroides, beta-agonistas, xantinas, anticolinérgicos, agentes antivíricos, antagonistas muscarínicos y antagonistas de leucotrieno.

**Figura 1**



**Figura 2**



**Figura 3**

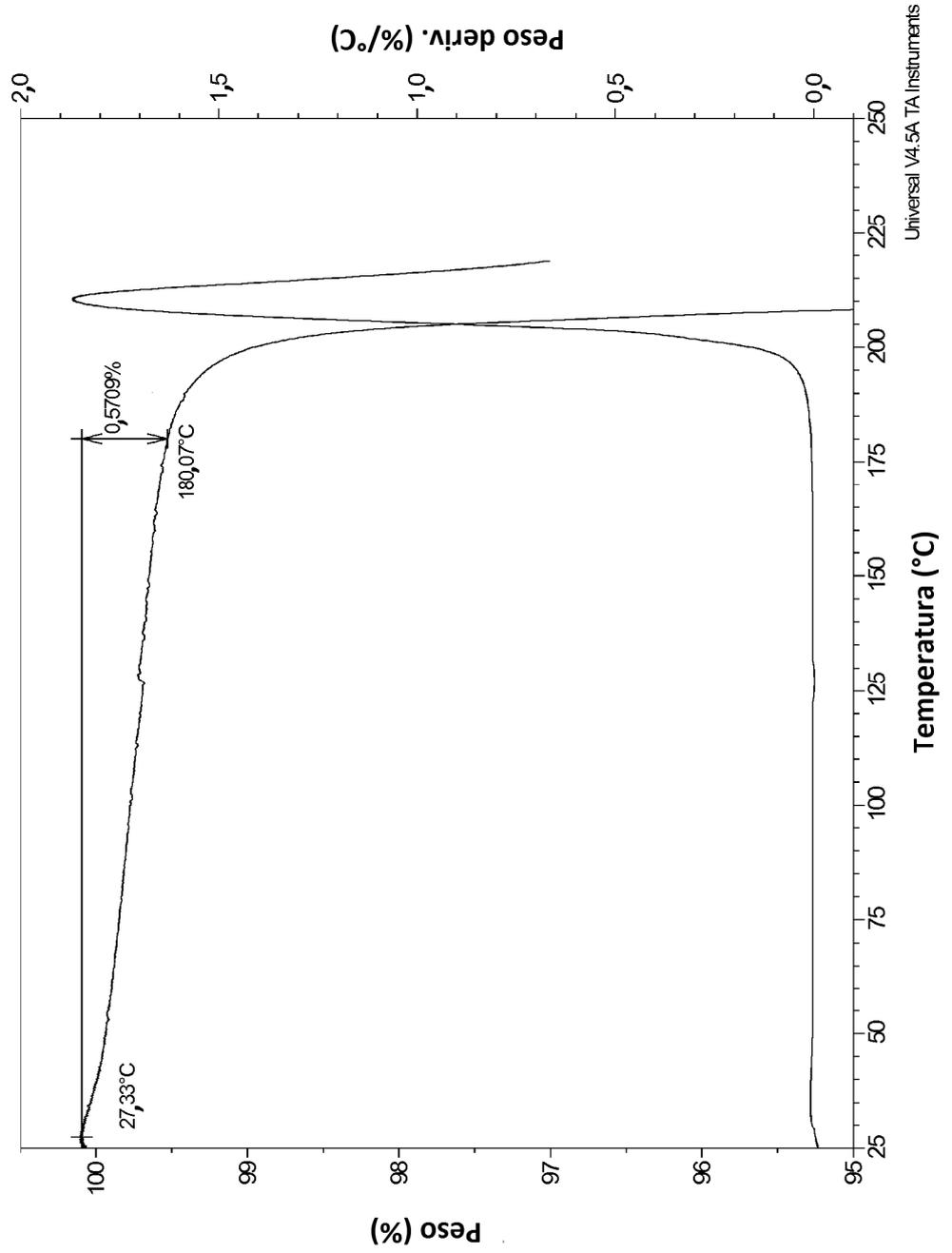


Figura 4

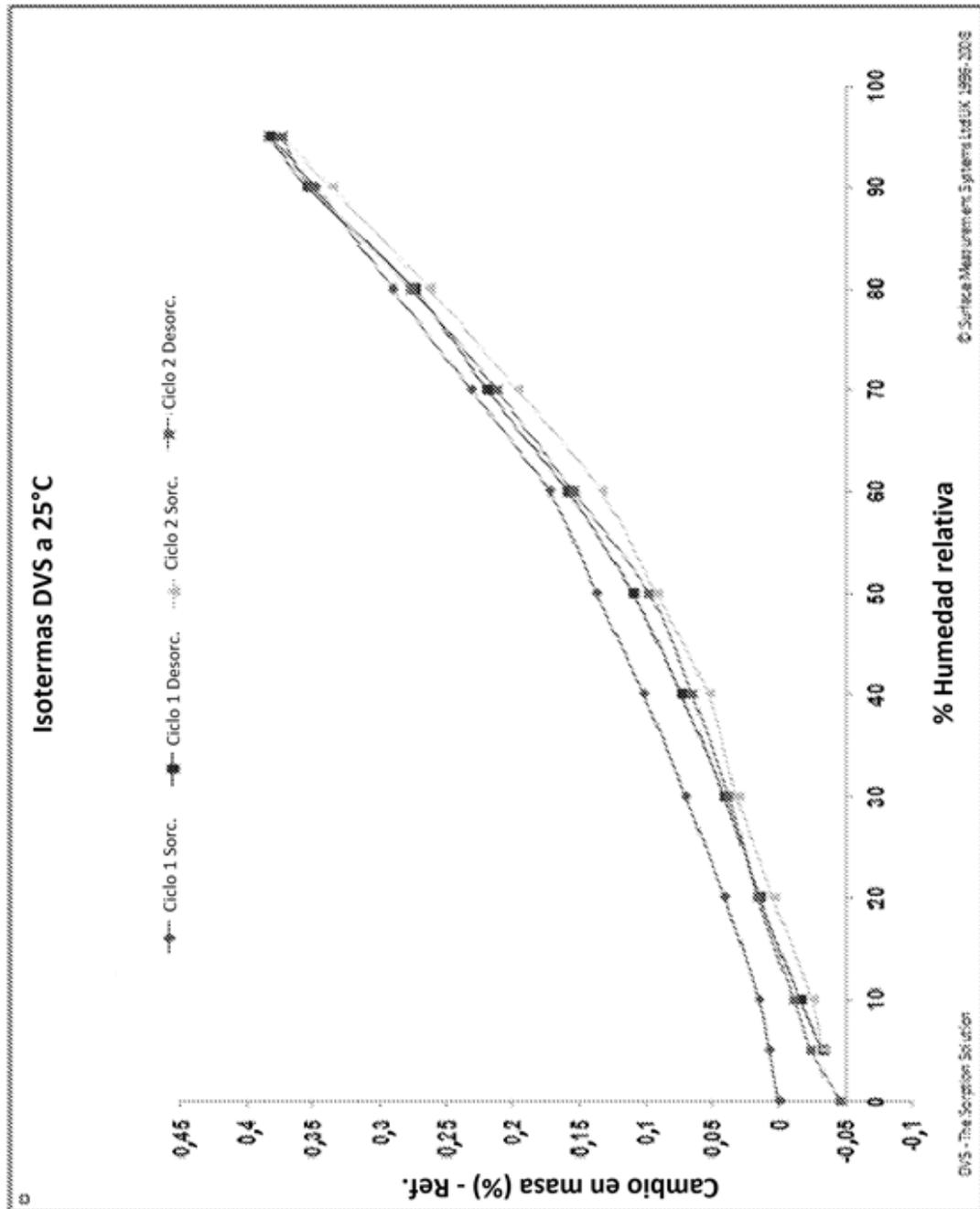


Figura 5

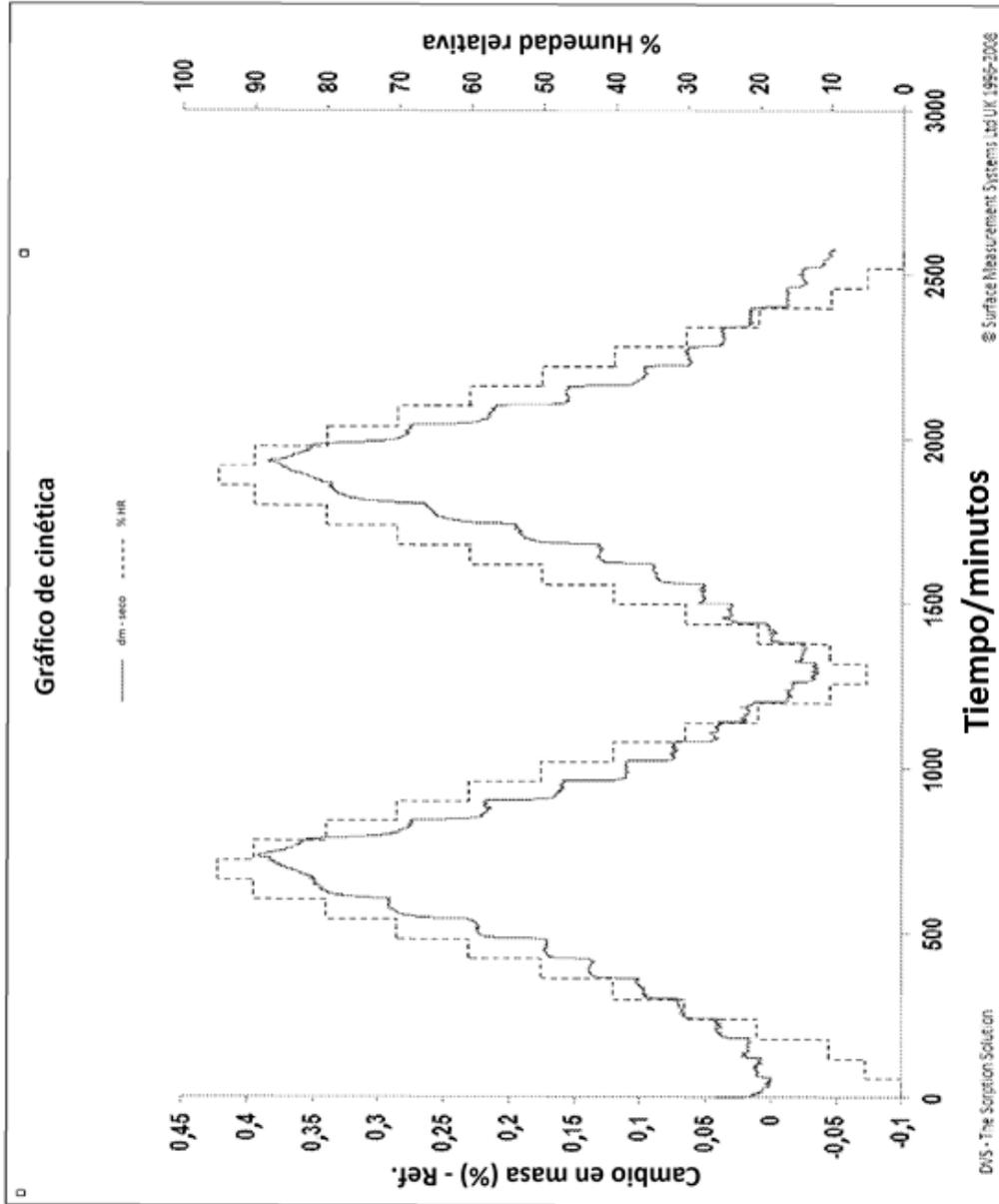
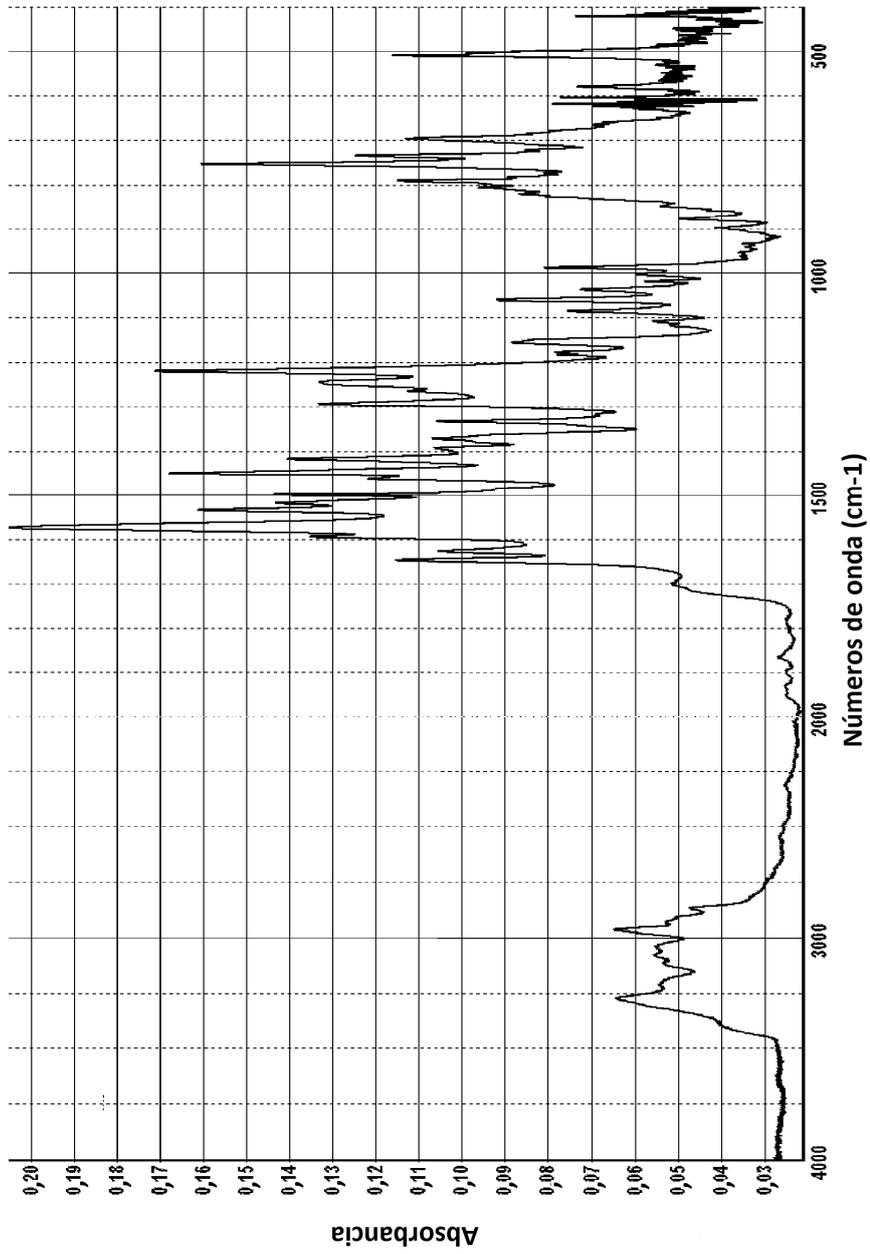


Figura 6



**Figura 7**

