

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 635 240**

51 Int. Cl.:

**C07D 213/73** (2006.01)

**A61K 31/4412** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**A61P 29/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.10.2013 PCT/GB2013/052689**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.04.2014 WO14060742**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.10.2013 E 13783363 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2017 EP 2909175**

54 Título: **N-[2-{4-[6-amino-5-(2,4-difluorobenzoi)-2-oxopiridin-1(2H)-il]-3,5-difluorofenil}etil]-L-alaninato de terc-butilo o una sal, hidrato o solvato del mismo**

30 Prioridad:

**17.10.2012 GB 201218640**

**16.04.2013 GB 201306881**

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

**03.10.2017**

73 Titular/es:

**MACROPHAGE PHARMA LIMITED (100.0%)  
St. Stephens House, Arthur Road  
For all designated states, GB**

72 Inventor/es:

**PINTAT, STÉPHANE;  
DAVIES, STEPHEN, JOHN y  
MOFFAT, DAVID, FESTUS, CHARLES**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**ES 2 635 240 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

N-[2-(4-[6-amino-5-(2,4-difluorobenzoyl)-2-oxopiridin-1(2H)-il]-3,5-difluorofenil)etil]-L-alaninato de terc-butilo o una sal, hidrato o solvato del mismo

5

**Campo de la invención**

La invención se refiere a un compuesto de éster de aminoácido y a composiciones que comprenden el compuesto de éster de aminoácido. La invención también se refiere al compuesto o composición para su uso en la inhibición de la enzima p38 MAP quinasa. Además, en el presente documento también se desvela un ácido producido por hidrólisis del grupo éster del compuesto de la invención.

10

**Antecedentes de la invención**

La activación inapropiada de leucocitos incluyendo monocitos, macrófagos y neutrófilos que conduce a la producción de niveles elevados de citoquinas tales como TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$  e IL-8, es una característica de la patogénesis de varias enfermedades inflamatorias que incluyen artritis reumatoide, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma y psoriasis, y enfermedades proliferativas celulares con un componente inflamatorio. La producción de citoquinas por las células inflamatorias es un resultado de la respuesta alguna diversidad de estímulos externos, lo que conduce a la activación de una serie de mecanismos de señalización intracelular. Entre estas es importante la super familia de proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) que consiste en quinasas de señalización altamente conservadas que regulan el crecimiento celular, diferenciación y respuestas al estrés. Las células de mamífero contienen al menos tres familias de las MAPK: las MAPK de p42/44 quinasa reguladas por señal extracelular (ERK), c-Jun quinasas NH2-terminales (JNKs) y p38 MAPK (también denominada p38a/Mpk2/RK/SAPK2a/CSBP1/2). p38 MAPK se clonó primero siguiendo su identificación como una quinasa que está fosforilada con tirosina después de la estimulación de monocitos con lipopolisacárido (LPS) [Han *et al.*, Science 1994, 265, 808]. Se han descrito homólogos adicionales de p38 de mamífero e incluyen p38 $\beta$  [Jiang *et al.*, J. Biol. Chem. 1996, 271, 17920], p38 $\gamma$  [Li *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 1996, 228, 334] y p38 $\delta$  [Jiang *et al.*, J. Biol. Chem. 1997, 272, 30122]. Aunque p38 $\alpha$  y p38  $\beta$  se expresan en todas partes, p38  $\gamma$  se limita principalmente al músculo esquelético y p38  $\delta$  se expresa predominantemente en pulmón y riñón.

15

20

25

30

La liberación de citoquinas por células defensoras de hospedador y la respuesta de leucocitos a citoquinas y otras tensiones proinflamatorias están reguladas en una medida variable por p38 MAPK [Cuenda *et al.*, FEBS Lett, 1995, 364, 229-233]. En otros tipos de células, p38 MAPK controla las respuestas al estrés tales como la producción de IL-8 por las células epiteliales bronquiales estimuladas por TNF- $\alpha$  y la regulación positiva de la molécula de adhesión celular ICAM-1 en células endoteliales estimuladas por LPS. Después de su activación, a través de fosforilación doble de un motivo TGY por las quinasas de doble especificidad MKK3 y MKK6, p38 MAPK ejerce sus efectos a través de fosforilación de factores de transcripción y otras quinasas. La proteína quinasa 2 activada por MAP quinasa (MAPKAP-K2) se ha identificado como una diana para la fosforilación de p38. Se ha demostrado que los ratones [Kotlyarov *et al.*, Nat. Cell Biol. 1999, 1, 94-97] que carecen de de MAPKAP-K2 liberan niveles reducidos de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e IFN- $\gamma$  como respuesta al choque endotóxico mediado por LPS/galactosamina. La regulación de los niveles de estas citoquinas así como de COX-2 se encuentra en el nivel del ARNm. Los niveles de TNF- $\alpha$  se regulan a través del control de la traducción a través de elementos ricos en AU del 3'-UTR del ARNm del TNF- $\alpha$ , con la señalización de MAPKAP-K2 aumentando la traducción del ARNm del TNF- $\alpha$ . La señalización de MAPKAP-K2 conduce a un aumento de la estabilidad del ARNm para COX-2, IL-6 y proteína inflamatoria de macrófagos. MAPKAP-K2 determina la posición celular de p38 MAPK así como la transducción de la señalización de p38 MAPK, que posee una señal de localización nuclear en su extremo carboxilo y una señal de exportación nuclear como parte de su dominio autoinhibitorio [Engel *et al.*, EMBO J. 1998, 17, 3363-3371]. En células estresadas, MAPKAP-K2 y p38 MAPK migran al citoplasma desde el núcleo, y esta migración solamente se produce cuando p38 MAPK es catalíticamente activa. Se cree que este suceso está dirigido por la exposición de la señal de exportación nuclear de MAPKAP-K2, como resultado de la fosforilación por p38 MAPK [Meng *et al.*, J. Biol. Chem. 2002, 277, 37401-37405]. Además p38 MAPK ya sea directa o indirectamente conduce a la fosforilación de varios factores de transcripción que se cree que median la información, incluyendo ATF1/2 (activación de los factores de transcripción 1/2), CHOP-10/GADD-153 (gen 153 inducible por parada de crecimiento y daño al ADN), SAP-1 (proteína 1 auxiliar del factor de respuesta a suero) y que MEF2C (factor 2 potenciador de miocitos) [Foster *et al.*, Drug News Perspect. 2000, 13, 488-497].

35

40

45

50

55

En varios casos se ha demostrado que la inhibición de la actividad de p38 MAPK por moléculas pequeñas, es útil para el tratamiento de varias patologías mediadas por la producción de citoquinas inapropiadas que incluye artritis reumatoide, EPOC, asma e isquemia cerebral. Esta modalidad ha sido el objeto de varias revisiones de [Salituro *et al.*, Current Medicinal Chemistry, 1999, 6, 807-823 y Kumar *et al.*, Nature Reviews Drug Discovery 2003, 2, 717-726].

60

Se ha mostrado que los inhibidores de p38 MAPK son eficaces en modelos animales de artritis reumatoide, tales como artritis inducida por colágeno en ratas [Revesz *et al.*, Biorg. Med. Chem. Lett., 2000, 10, 1261-1364] y artritis inducida por adyuvante en ratas [Wadsworth *et al.*, J. Pharmacol. Exp. Ther., 1999, 291, 1685-1691]. En modelos murinos de lesión pulmonar inducida por pancreatitis, el tratamiento previo con un inhibidor de p38 MAPK redujo la

65

liberación de TNF- $\alpha$  en las vías respiratorias y edema pulmonar [Denham *et al.*, Crit. Care Med., 2000, 29, 628 e Yang *et al.*, Surgery, 1999, 126, 216]. La inhibición de p38 MAPK antes de la estimulación con ovoalbúmina (OVA) en ratones sensibilizados con OVA disminuyó la acumulación de citoquina si células inflamatorias en las vías respiratorias en un modelo alérgico de inflamación de vías respiratorias [Underwood *et al.*, J. Pharmacol. Exp. Ther., 2000, 293, 281]. El aumento de la actividad de la p38 MAP quinasa se ha observado en pacientes que padecen enfermedad inflamatoria del intestino [Waetzig *et al.*, J. Immunol, 2002, 168, 5432-5351]. Se ha mostrado que los inhibidores de p38 MAPK son eficaces en modelos de rata de hipertrofia cardiaca [Behr *et al.*, Circulation, 2001, 104, 1292-1298] e isquemia focal cerebral [Barone *et al.*, J. Pharmacol. Exp. Ther., 2001, 296, 312-321].

10 Tanto el documento WO 2007/129040 como el documento WO 2009/060160 desvelan ésteres de alfa aminoácido que son inhibidores de p38 MAP quinasa. En los compuestos desvelados, el grupo éster es un grupo éster que se puede hidrolizar con una o más enzimas esterasa intracelulares con respecto a un grupo ácido carboxílico; y los sustituyentes en el carbono del éster de alfa aminoácido forman una cadena lateral, que es la cadena lateral de un alfa aminoácido natural o natural.

15 Se indica que los compuestos desvelados son inhibidores potentes y selectivos de p38 MAPK (p38 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , y  $\delta$ ) y las isoformas y variantes de corte y empalme de los mismos especialmente p38 $\alpha$ , p38 $\beta$  y p38 $\beta$ 2. Por lo tanto los compuestos tienen uso en medicina, por ejemplo en el tratamiento y profilaxis de trastornos inmunológicos e inflamatorios descritos en el presente documento. Los compuestos se caracterizan por la presencia en la molécula del motivo de aminoácido o motivo de éster de aminoácido -NH-CHR1R2 que se puede hidrolizar mediante una carboxilesterasa intracelular. Los compuestos que tienen el motivo de éster de aminoácido lipófilo *th* cruzan la membrana celular, y se hidrolizan al ácido mediante carboxilesterasas intracelulares. El producto de hidrólisis polar se acumula en la célula ya que no cruza fácilmente la membrana celular. Por lo tanto, la actividad de p38 MAP quinasa de los compuestos se prolonga y aumenta dentro de la célula. Los compuestos de esa invención se relacionan con los inhibidores de p38 MAP quinasa incluidos por las divulgaciones en la Solicitud de Patente Internacional WO03076405 tres diferencian en que tienen el motivo de éster de aminoácido a que se ha hecho referencia anteriormente.

30 El documento WO 2007/129040 también desvela que los compuestos con los que se relaciona incluyen los que se acumulan de forma selectiva en macrófagos. Se sabe que los macrófagos desempeñan un papel fundamental en trastornos inflamatorios a través de la liberación de citoquinas en particular TNF $\alpha$  e IL-1 (van Roon *et al.*, Arthritis and Rheumatism, 2003, 1229-1238). En la artritis reumatoide son los contribuyentes principales para el mantenimiento de la inflamación de las articulaciones y la destrucción de las articulaciones. Los macrófagos también están implicados en el crecimiento y desarrollo tumoral (Naldini y Carraro, Curr Drug Targets Inflamm Allergy, 2005, 3-8). Por lo tanto los agentes que se dirigen de forma selectiva a la proliferación de células de macrófago podrían tener valor en el tratamiento de cáncer y enfermedad autoinmune. Se podría esperar que los tipos celulares específicos de direccionamiento condujeran a una reducción de los efectos secundarios. La forma en la que el motivo de esterasa se une al inhibidor de p38 quinasa determina si se hidroliza, y por lo tanto sí se acumula o no en diferentes tipos celulares. De forma específica, los macrófagos contienen la carboxilesterasa hCE-1 humana mientras que otros tipos celulares no la contienen. En la fórmula general (I) del WO 2007/129040, cuando el nitrógeno del motivo de esterasa R1CH(R2)NH- no está relacionado directamente con un carbonilo (-C(=O)-), es decir, cuando Y no es un radical -C(=O), -C(=O)O- o -C(=O)NR3-, el éster solamente será hidrolizado por hCE-1 y por lo tanto los inhibidores solamente se acumularán en los macrófagos. En el presente documento, a menos que se especifique "monocito" o "monocitos", el término macrófagos o macrófagos se usará para hacer referencia a macrófagos (incluyendo macrófagos asociados a tumor) y/o monocitos.

50 El documento WO 2009/060160 desvela un grupo de compuestos específicos que entran dentro de las divulgaciones generales del documento WO 2007/129040, pero que no se identifican o poco se usan a modo de ejemplo específicamente en el presente documento. Los compuestos presentan la propiedad de selectividad de macrófagos discutida anteriormente.

### Sumario de la invención

55 Los presentes inventores han encontrado que el compuesto N-[2-{4-[6-amino-5-(2,4-difluorobenzoyl)-2-oxopiridin-1(2H)-il]-3,5-difluorofenil}etil)-L-alaninato de terc-butilo es sorprendentemente bueno en la inhibición de la actividad de la p38 MAP quinasa. Los ensayos han mostrado que el valor de CI<sub>50</sub> para la inhibición del TNF- $\alpha$  con el éster en sangre humana es significativamente menor de lo que se podría esperar dados los valores de CI<sub>50</sub> para la inhibición del TNF- $\alpha$  con el éster en sangre humana observada para compuestos relacionados. Además, los ensayos realizados por los inventores han demostrado que la biodisponibilidad del compuesto de la invención es mucho mayor de lo que se podría haber predicho a partir de compuestos conocidos, estructuralmente similares.

60 Por consiguiente, la presente invención proporciona un compuesto que es: N-[2-{4-[6-amino-5-(2,4-difluorobenzoyl)-2-oxopiridin-1(2H)-il]-3,5-difluorofenil}etil)-L-alaninato de terc-butilo o una sal, hidrato o solvato del mismo farmacéuticamente aceptable.

65 La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto junto con

uno o más vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables.

En otro aspecto, la invención proporciona un compuesto como se ha definido anteriormente o una composición como se ha definido anteriormente para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante

5

La presente invención también proporciona un compuesto como se ha definido anteriormente o una composición como se ha definido anteriormente para su uso en la inhibición de la actividad de una enzima p38 MAP quinasa *in vitro* o *in vivo*. Además se proporciona un compuesto como se ha definido anteriormente o una composición como se ha definido anteriormente para su uso en la prevención o tratamiento de enfermedad autoinmune o inflamatoria. Además se proporciona un compuesto como se ha definido anteriormente o una composición como se ha definido anteriormente para uso en el tratamiento de una enfermedad proliferativa celular.

10

En el presente documento también se menciona un ácido que es: N-[2-{4-[6-amino-5-(2,4-difluorobenzoyl)-2-oxopiridin-1(2H)-il]-3,5-difluorofenil}etil)-L-alanina.

15

### Descripción detallada de la invención

La invención proporciona un compuesto que es: N-[2-{4-[6-amino-5-(2,4-difluorobenzoyl)-2-oxopiridin-1(2H)-il]-3,5-difluorofenil}etil)-L-alaninato de terc-butilo.

20

El compuesto de la invención se puede preparar en forma de una sal, hidrato o solvato. Por lo tanto la invención también proporciona una sal, hidrato o solvato del compuesto. Por lo general, la sal es una sal farmacéuticamente aceptable.

25

Como se usa en el presente documento, una sal farmacéuticamente aceptable es una sal con un ácido o base farmacéuticamente aceptables. Los ácidos farmacéuticamente aceptables incluyen tanto ácidos inorgánicos, tales como ácido clorhídrico, sulfúrico, fosfórico, difosfórico, bromhídrico o nítrico y ácidos orgánicos tales como ácido cítrico, salicílico, glutámico, láctico, fumárico, maleico, málico, ascórbico, succínico, tartárico, benzoico, acético, metanosulfónico, etanosulfónico, bencenosulfónico o *p*-toluenosulfónico. Las bases farmacéuticamente aceptables incluyen hidróxidos de metal alcalino (por ejemplo, sodio o potasio) y metal alcalinotérreo (por ejemplo, calcio, bario o magnesio) y bases orgánicas tales como alquil aminas, aralquil aminas y aminas heterocíclicas. Los ejemplos de bases orgánicas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, N-metil-D-glucamina, colina tris(hidroximetil)amino-metano, L-arginina, L-lisina, N-etil piperidina, dibencilamina. Para una revisión sobre sales adecuadas, véase Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use de Stahl y Wermuth (Wiley-VCH, Weinheim, Alemania, 2002).

30

35

Las sales adecuadas de los compuestos de la invención incluyen las mencionadas en el presente documento con ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables.

40

El término 'solvato' se usa en el presente documento para describir un complejo molecular que comprende el compuesto de la invención y una cantidad estequiométrica de una o más moléculas de disolvente farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, etanol. El término 'hidrato' se usa cuando dicho disolvente es agua.

45

Para evitar dudas, el compuesto de la invención se puede usar en cualquier forma tautomérica.

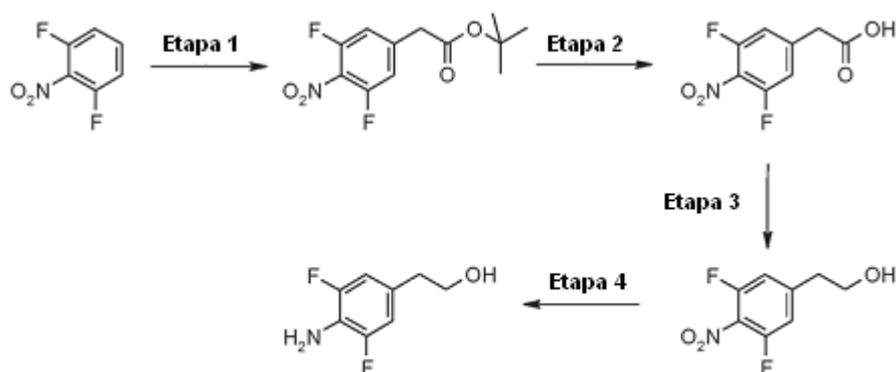
El compuesto de la invención incluye un centro quiral. El compuesto está por lo general en forma del derivado L-alaninato (es decir, como se representa en el Ejemplo 1). Sin embargo, el compuesto debe existir como el derivado D-alaninato o como una mezcla de las formas D y L. Cuando una mezcla está presente, preferentemente está presente al menos un 90 %, 95 % o un 99 % como el derivado L-alaninato.

50

Un esquema y proceso adecuados para la producción del compuesto de la invención, con referencia a la sección de ejemplos que sigue, se discute a continuación.

55

Por lo general los materiales de partida son clorhidrato de 3-(2,4-difluorofenil)-3-oxopropanimidatoato de 4-clorofenilo y 2-(4-Amino-3,5-difluorofenil)etanol. El 2-(4-amino-3,5-difluorofenil)etanol se puede preparar usando el siguiente esquema, que es análogo al esquema 1 de la sección de ejemplos:

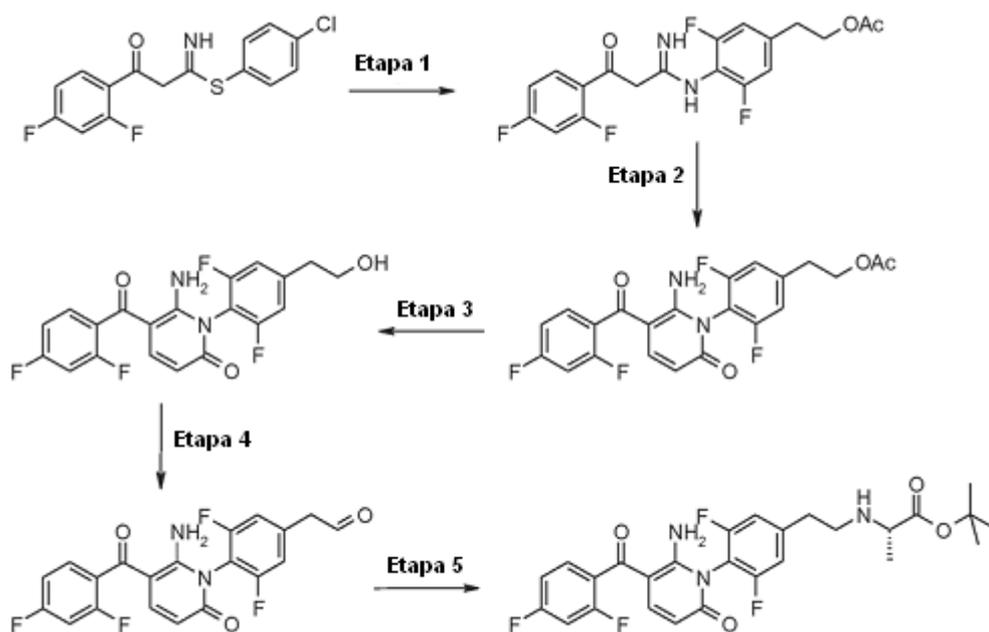


**Compuesto Intermedio 2**

5 El difluoronitrobenzono está disponible en el mercado. La etapa 1 requiere la adición de un grupo acetato de *terc*-butilo al anillo de fenilo, en posición para con respecto al grupo nitro. La etapa 2 requiere la hidrólisis del grupo éster para formar el ácido correspondiente. El ácido se reduce a un alcohol primario en la etapa 3. En la etapa 4 del grupo nitro se reduce a una amina.

10 El clorhidrato de 3-(2,4-difluorofenil)-3-oxopropanimidotioato de 4-clorofenilo se puede preparar usando procedimientos experimentales que se describen en el documento WO 2003076405.

El compuesto, *N*-(2-{4-[6-amino-5-(2,4-difluorobenzoi)-2-oxopiridin-1(2*H*)-il]-3,5-difluorofenil}etil)-L-alaninato de *terc*-butilo a continuación se puede sintetizar usando el siguiente esquema, que es análogo al esquema 2 de la sección de ejemplos.



**Ejemplo 1**

15 En la etapa 1, el 2-(4-Amino-3,5-difluorofenil)etanol y el Clorhidrato de 3-(2,4-difluorofenil)-3-oxopropanimidotioato de 4-Clorofenilo se hacen reaccionar juntos para formar acetato de 2-(4-{[3-(2,4-difluorofenil)-3-oxopropanimidoil]amino}-3,5-difluorofenil)etilo. En la etapa 2, se añade ácido propiónico para formar acetato de 2-{4-[6-Amino-5-(2,4-difluorobenzoi)-2-oxopiridin-1(2*H*)-il]-3,5-difluorofenil}etilo. En la etapa 3, el grupo acetato se hidroliza para proporcionar un alcohol y en la etapa 4 el grupo alcohol resultante se oxida a un aldehído. El compuesto de la invención se forma a continuación en la etapa 5, mediante la adición de clorhidrato de L-alaninato de *terc*-butilo. El clorhidrato de L-alaninato de *terc*-butilo está disponible en el mercado.

25 La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto junto con uno o más vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables. Por lo general dicha composición farmacéutica contiene

hasta un 85 % en peso de un compuesto de la invención. Más habitualmente, contiene hasta un 50 % en peso de un compuesto de la invención. Las composiciones farmacéuticas preferentes son estériles y sin pirógenos.

5 El compuesto de la invención se puede administrar en una diversidad de formas de dosificación. Por lo tanto, se puede administrar por vía oral, por ejemplo en forma de comprimidos, trociscos, cápsulas, pastillas para chupar, suspensiones acuosas u oleosas, polvos dispersables o gránulos. Los compuestos de la invención también se pueden administrar por vía parenteral, ya sea por vía subcutánea, por vía intravenosa, por vía intramuscular, por vía intraesternal, por vía transdérmica o mediante técnicas de infusión. Dependiendo del vehículo y concentración  
10 usados, el fármaco se puede suspender o disolver en el vehículo. De forma ventajosa, en el vehículo se pueden disolver adyuvantes tales como un anestésico local, conservantes y agente de tamponamiento. Los compuestos también se deben administrar en forma de supositorios. Los compuestos se pueden administrar mediante inhalación en forma de un aerosol a través de un inhalador o un nebulizador.

15 Un compuesto de la invención por lo general se formula para su administración con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, las formas orales sólidas pueden contener, junto con el compuesto activo, agentes solubilizantes, por ejemplo ciclodextrinas o ciclodextrinas modificadas; diluyentes, por ejemplo lactosa, dextrosa, sacarosa, celulosa, almidón de maíz o almidón de patata; lubricantes, por ejemplo sílice, talco, ácido esteárico, estearato de magnesio o calcio, y/o polietilenglicoles; agentes aglutinantes; por ejemplo almidones, gomas arábicas, gomas de tragacanto, gelatina, jarabe, goma arábica, sorbitol, metilcelulosa, carboximetil-celulosa o  
20 polivinil pirrolidona; agentes disgregantes, por ejemplo almidón, ácido alginico, alginatos o almidón glicolato sódico; mezclas efervescentes; tinturas; edulcorantes; agentes humectantes, tales como lecitina, polisorbatos, laurilsulfatos; y, en general, sustancias no tóxicas y farmacológicamente inactivas usadas en formulaciones farmacéuticas. Las preparaciones farmacéuticas de este tipo se pueden preparar de una manera conocida, por ejemplo, por medio de procesos de mezcla, granulación, formación de comprimidos, revestimiento de azúcar, o revestimiento de película.

25 Las dispersiones líquidas para su administración oral pueden ser soluciones, jarabes, emulsiones y suspensiones. Las preparaciones líquidas pueden contener aditivos convencionales tales como agentes de suspensión, por ejemplo sorbitol, jarabe, metil celulosa, jarabe de glucosa, gelatina, grasas comestibles hidrogenadas; agentes emulgentes, por ejemplo lecitina, monooleato de sorbitán, o goma arábica; vehículos no acuosos (que pueden incluir aceites comestibles), por ejemplo aceite de almendras, aceite de coco fraccionado, ésteres oleosos tales como glicerina, propilenglicol, o alcohol etílico; conservantes, por ejemplo p-hidroxibenzoato de metilo o propilo o ácido sórbico, y si se desea, agentes saborizantes o colorantes convencionales. Las soluciones deben contener agentes solubilizantes por ejemplo ciclodextrinas o ciclodextrinas modificadas. Los jarabes pueden contener, como vehículos,  
30 por ejemplo, sacarosa o sacarosa con glicerina y/o manitol y/o sorbitol.

35 Las suspensiones y emulsiones pueden contener, como vehículo, por ejemplo una goma natural, goma de agar, alginato sódico, pectina, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, o alcohol polivinílico. Las suspensiones o soluciones para inyecciones intramusculares pueden contener, junto con el compuesto activo, un vehículo farmacéuticamente aceptable, por ejemplo agua estéril, aceite de oliva, oleato de etilo, glicoles, por ejemplo propilenglicol; agentes solubilizantes, por ejemplo ciclodextrinas o ciclodextrinas modificadas, y si se desea, una cantidad adecuada de clorhidrato de lidocaína.

40 Las soluciones para administración intravenosa o infusiones pueden contener, como vehículo, por ejemplo, agua estéril y agentes solubilizantes, por ejemplo ciclodextrinas o ciclodextrinas modificadas o preferentemente se encuentran en forma de soluciones salinas isotónicas, acuosas, estériles.

45 Para aplicación tópica a la piel, el fármaco se preparó en una crema, loción o pomada. Las formulaciones de loción o pomada que se pueden usar para el fármaco son formulaciones convencionales bien conocidas en la técnica, por ejemplo como se describe en libros de texto convencionales de productos farmacéuticos tales como la Farmacopea Británica.

50 Para aplicación tópica mediante inhalación, el fármaco se puede formular para administración mediante aerosol por ejemplo, mediante atomizadores de chorro accionados a presión o atomizadores, o preferentemente mediante administración de polvos micronizados con aerosoles de dosis medida accionados con propulsor o sin propulsor, por ejemplo, cápsulas para inhalación u otros sistemas de administración de "polvo seco". En las formulaciones inhaladas este tipo pueden estar presentes excipientes, tales como, por ejemplo, propulsores (por ejemplo, Frigen en el caso de aerosoles de dosis medida), sustancias de superficie activa, agentes emulgentes, estabilizantes, conservantes, saborizantes, y cargas, (por ejemplo, lactosa en el caso de inhaladores de polvo). Para los fines de inhalación, hay disponibilidad de un gran número de aparatos con los que se puede generar y administrar aerosoles  
55 de tamaño de partícula óptimo, usando una técnica de inhalación que es apropiada para el paciente. Además del uso de adaptadores (espaciadores, expansiones) y envases con forma de pera (por ejemplo, Nebulator®, Volumatic®), y dispositivos automáticos que emiten una pulverización para inhalación (Autohaler®), para aerosoles de dosis medida, en particular en el caso de inhaladores de polvo, hay disponibilidad de una serie de soluciones técnicas (por ejemplo, Diskhaler®, Rotadisk®, Turbohaler® o los inhaladores por ejemplo como se describe en la  
60 Solicitud de Patente Europea EP 0 505 321).

Para aplicación tópica en el ojo, el fármaco se puede preparar en una solución o suspensión en un vehículo acuoso o no acuoso estéril adecuado. También se pueden incluir aditivos, por ejemplo tampones tales como metabisulfito sódico o edeato disódico; conservantes que incluyen agentes bactericidas y fungicidas tales como acetato o nitrato fenil mercúrico, cloruro de benzalconio o clorhexidina, y agentes espesantes tales como hipromelosa.

5 A cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención se administra a un sujeto. Se entenderá que el nivel de dosis específica para cualquier sujeto en particular dependerá de una diversidad de factores que incluyen la actividad del compuesto específico usado, la edad, peso corporal, salud general, sexo, dieta, tiempo de administración, la ruta de administración, tasa de excreción, combinación de fármacos y la gravedad de la enfermedad en particular que se está tratando. Los niveles de dosis y la frecuencia de dosificación óptimos se  
10 determinarán generalmente mediante ensayos clínicos.

Una dosis diaria habitual es de hasta 50 mg por kg de peso corporal, por ejemplo de 0,001 a 50 mg por kg de peso corporal, de acuerdo con la actividad del compuesto específico, la edad, peso y afecciones del sujeto a tratar, el tipo y gravedad de la enfermedad y la frecuencia y vía de administración. Preferentemente, los niveles de dosificación  
15 diarios son de 0,05 mg a 2 g, preferentemente de 0,1 mg a 10 mg. El compuesto de la invención por lo general se administra al paciente en una cantidad no tóxica.

La invención también proporciona un compuesto como se define en el presente documento o una composición como se define en el presente documento para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante  
20 terapia.

Se ha encontrado que los compuestos y composiciones de la invención inhiben la actividad de una enzima p38 MAP quinasa. Por lo tanto los compuestos y composiciones son útiles en la prevención y tratamiento de enfermedades y afecciones moduladas por la actividad de la p38 MAP quinasa. Las enfermedades y afecciones moduladas por la actividad de la p38 MAP quinasa incluyen enfermedad proliferativa celular tal como cáncer y psoriasis, enfermedad de poliglutamina tales como enfermedad de Huntington, enfermedad neurodegenerativa tales como enfermedad de Alzheimer, enfermedad autoinmune tales como artritis reumatoide, diabetes, enfermedad hematológica, enfermedad inflamatoria, enfermedad cardiovascular, aterosclerosis, y las secuelas inflamatorias de la infección. Algunos  
25 ejemplos en particular son enfermedad proliferativa celular, enfermedad autoinmune y enfermedad inflamatoria.

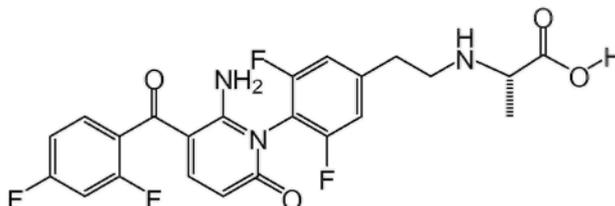
A menudo la enfermedad autoinmune tiene un componente inflamatorio. Las afecciones de este tipo incluyen alopecia universal diseminada aguda, enfermedades positivas para ANCA, enfermedad de Behcet, enfermedad de Chagas, síndrome de fatiga crónica, disautonomía, encefalomiелitis, espondilitis anquilosante, anemia aplásica, hidradenitis supurativa, hepatitis autoinmune, ooforitis autoinmune, enfermedad celíaca, enfermedad inflamatoria del intestino, diabetes mellitus de tipo 1, síndrome de Fanconi, arteritis de células gigantes, glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Grave, síndrome de Guillain-Barre, enfermedad de Hashimoto, púrpura de Henoch-Schönlein, enfermedad de Kawasaki, lupus sistémico eritematoso, colitis microscópica, poliarteritis microscópica, enfermedad mixta del tejido conectivo, esclerosis múltiple, miastenia gravis, síndrome de opsoclono mioclono, neuritis óptica, tiroiditis de Ord, pénfigo, poliarteritis nodosa, polimialgia, artritis reumatoide, síndrome de Reiter, síndrome de Sjogren, arteritis temporal, granulomatosis de Wegener, anemia hemolítica autoinmune caliente, cistitis intersticial, la enfermedad de Lyme, morfea, psoriasis, sarcoidosis, esclerodermia, colitis ulcerosa, y vitíligo.  
35

Otras afecciones inflamatorias que se pueden prevenir o tratar con los compuestos y composiciones de la invención incluyen, por ejemplo, apendicitis, dermatitis, dermatomiositis, endocarditis, fibrositis, gingivitis, glositis, hepatitis, hidradenitis supurativa, iritis, laringitis, mastitis, miocarditis, nefritis, otitis, pancreatitis, parotiditis, pericarditis, peritonitis, faringitis, pleuritis, neumonitis, prostatitis, pielonefritis y estomatitis, rechazo de trasplantes (que implican a órganos tales como riñón, hígado, corazón, pulmón, páncreas, (por ejemplo, células de los islotes), médula ósea, córnea, intestino delgado, aloinjertos de piel, homoinjertos de piel y xenoinjertos de la válvula cardiaca, enfermedad del suero, y enfermedad de injerto contra hospedador), pancreatitis aguda, pancreatitis crónica, síndrome de distrés respiratorio agudo, síndrome de Sexary, hiperplasia adrenal congénita, tiroiditis no supurativa, hipercalcemia asociada con cáncer, pénfigo, dermatitis ampollosa herpetiforme, eritema grave multiforme, dermatitis exfoliativa, dermatitis seborreica, rinitis alérgica estacional o perenne, asma bronquial, dermatitis por contacto, dermatitis atópica, reacciones por hipersensibilidad a fármacos, conjuntivitis alérgica, queratitis, herpes zóster oftálmico, iritis y oiridociclitis, coriorretinitis, neuritis óptica, sarcoidosis sintomática, quimioterapia para tuberculosis pulmonar fulminante o diseminada, púrpura trombocitopénica idiopática en adultos, trombocitopenia secundaria en adultos, anemia hemolítica adquirida (autoinmune), leucemia y linfomas en adultos, leucemia aguda infantil, enteritis regional, vasculitis autoinmune, esclerosis múltiple, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, rechazo de trasplante de órganos sólidos, sepsis, cirrosis biliar primaria y colangitis esclerosante primaria.  
45  
50  
55  
60

Los compuestos y composiciones de la invención son útiles en la prevención y tratamiento de enfermedades infecciones inflamatorias y autoinmunes que se pueden tratar usando los compuestos y composiciones de la invención incluyen artritis reumatoide, artritis psoriática, diabetes de Tipo 1, asma, enfermedad inflamatoria del intestino, lupus sistémico eritematoso, e inflamación que acompaña a afecciones infecciosas (por ejemplo, sepsis), psoriasis, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, esclerosis múltiple, dermatitis atópica, y enfermedad de injerto contra hospedador.  
65

Los compuestos y composiciones de la invención también son útiles en el tratamiento de una enfermedad proliferativa celular, por ejemplo cáncer. Los ejemplos de cánceres que se pueden tratar incluyen cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer pancreático, cáncer hepático, cáncer de colon, cáncer renal, linfoma y melanoma. Por ejemplo, los cánceres que se pueden tratar incluyen cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer pancreático, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer renal, linfoma o melanoma.

En el presente documento también se menciona un ácido que es:



10 N-[2-{4-[6-amino-5-(2,4-difluorobenzoyl)-2-oxipiridin-1(2H)-il]-3,5-difluorofenil} etil)-L-alanina.

El ácido se puede preparar por hidrólisis del compuesto de la invención.

15 Como se discute en el presente documento, el compuesto de la invención es selectivo de macrófagos. Por lo tanto, el grupo éster del compuesto de la invención puede ser hidrolizado por células que contienen la carboxilesterasa humana hCE-1 y no por células que contienen hCE-2 o hCE-3. Por lo tanto, el ácido se produce dentro de las células que contienen hCE-1 por hidrólisis del grupo éster del compuesto de la invención y el ácido se acumula de forma selectiva dentro de tales células.

20 La presente invención se ilustra adicionalmente en los Ejemplos que siguen a continuación.

### Ejemplos

25 El compuesto de la invención se puede preparar de acuerdo con el siguiente Ejemplo.

#### Abreviaturas

|    |                                 |   |
|----|---------------------------------|---|
| 30 | CDI                             | = carbonildiimidazol  |
|    | DCM                             | = diclorometano   |
|    | DMF                             | = <i>dimetilformamida</i>   |
|    | EtOAc                           | = acetato de etilo  |
|    | HCl                             | = ácido clorhídrico   |
|    | LCMS                            | = cromatografía líquida de alto rendimiento/espectrometría de masas |
| 35 | MeOH                            | = metanol   |
|    | MgSO <sub>4</sub>               | = sulfato de magnesio   |
|    | Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> | = carbonato sódico  |
|    | NaHCO <sub>3</sub>              | = hidrogenocarbonato sódico   |
|    | RMN                             | = resonancia magnética nuclear                                      |
| 40 | STAB                            | = triacetoxiborohidruro sódico                                      |
|    | THF                             | = tetrahidrofurano  |
|    | g                               | = gramo(s)  |
|    | mg                              | = miligramo(s)  |
|    | ml                              | = mililitro(s)  |
| 45 | mmol                            | = milimol(s)  |

Se usaron reactivos y disolventes (calidad para HPLC) disponibles en el mercado sin purificación adicional. Los disolventes se retiraron usando un evaporador rotatorio Buchi. La irradiación con microondas se realizó usando un sintetizador de microondas Initiator™ Eight de Biotage. La purificación de los compuestos por cromatografía ultrarrápida en columna se realizó usando gel de sílice, tamaño de partícula 40-63 μm (230-400 de malla) obtenido en Fluorochem.

Los espectros de RMN <sup>1</sup>H se registraron en un espectrómetro 300 MHz AV en disolventes deuterados. Los desplazamientos químicos (δ) están en partes por millón. El análisis de cromatografía en capa fina (TLC) se realizó con placas Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (Merck) y se visualizó usando luz UV.

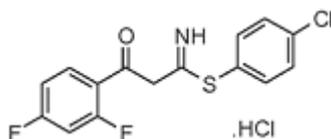
La HPLC/MS analítica se realizó en un sistema Agilent HP 1100 LC usando columnas Luna C18 en fase inversa (3 mm, 50 x 4,6 mm), gradiente de B al 5-95 % (A = agua / Ácido fórmico al 0,1 %, B = acetonitrilo/ Ácido fórmico al

0,1 %) durante 2,25 min, flujo = 2,25 ml/min. Los espectros de UV se registraron a 220 y 254 nm usando un detector G1315B DAD. Los espectros de masas se obtuvieron con respecto al intervalo de m/z de 150 a 800 en un detector SL G1956B de LC/MSD. Los datos se integraron y se informaron usando el software ChemStation y ChemStation Data Browser.

5

### Compuestos intermedios

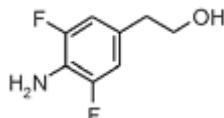
#### Compuesto intermedio 1: Clorhidrato de 3-(2,4-difluorofenil)-3-oxopropanimidotiato de 4-clorofenilo



10

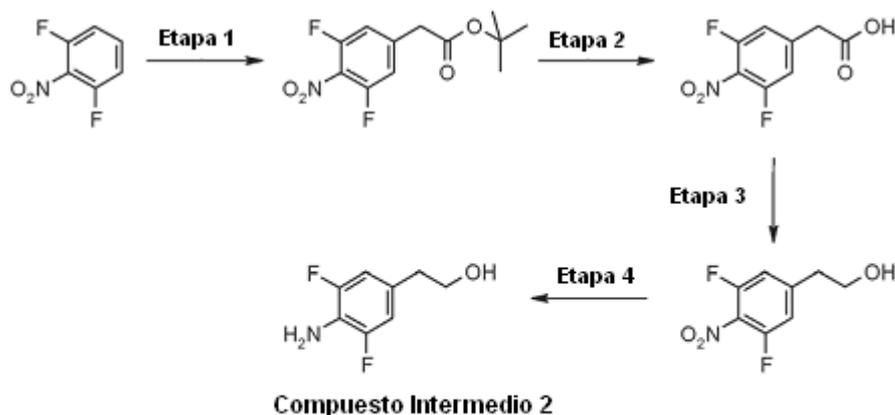
El **compuesto intermedio 1** se puede preparar usando procedimientos experimentales que se describen en el documento WO 2003076405.

#### 15 **Compuesto intermedio 2: 2-(4-Amino-3,5-difluorofenil)etanol**



20 El **compuesto intermedio 2** se sintetizó usando la ruta que se muestra en el Esquema 1 que sigue a continuación.

20



### Esquema 1

Etapa 1 - (3,5-Difluoro-4-nitrofenil)acetato de *tert*-butilo

25 Una solución de difluoronitrobenceno (24,96 g, 157 mmol) y cloroacetato de *tert*-butilo (38,0 ml, 267 mmol) en DMF anhidra (200 ml) se añadió gota a gota durante una hora a una suspensión fría (-35 °C) de *tert*-butóxido potásico (61,61 g, 549 mmol) en DMF anhidra (200 ml) en atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se agitó a -35 °C durante 1,5 horas, se interrumpió con HCl 2 N (240 ml) y se extrajo con heptanos (4 x 200 ml). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con agua (3 x 200 ml) y salmuera (200 ml), se secaron (MgSO<sub>4</sub>), se filtraron y se concentraron a presión reducida para proporcionar un aceite de color amarillo. La purificación por cromatografía en columna (EtOAc al 10 % en heptanos) proporcionó un aceite de color amarillo (37,64 g). Otros dos lotes (10,00 g y 23,54 g de difluoronitrobenceno) proporcionaron 14,30 g y 31,39 g de producto respectivamente. Los RMN <sup>1</sup>H de los tres lotes mostraban una mezcla del compuesto deseado y cantidades pequeñas de impurezas no identificadas. Los 3 lotes se combinaron y se usaron en la siguiente etapa sin purificación adicional.

35 RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 7,05 (2H, d, J = 8,5 Hz), 3,56 (2H, s), 1,46 (9H, s).

## Etapa 2 - Ácido (3,5-difluoro-4-nitrofenil)acético

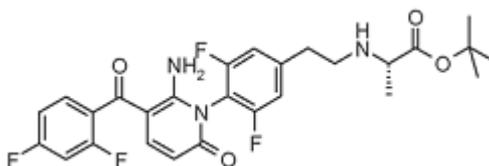
Se añadió ácido trifluoroacético (150 ml) gota a gota durante 20 minutos a una solución fría (0 °C) de (3,5-difluoro-4-nitrofenil)acetato de *tert*-butilo (83,33 g, 305 mmol) en DCM (300 ml). Al finalizar la adición, la mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 3 horas. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida para proporcionar un sólido de color marrón pegajoso. La trituration con heptanos proporcionó el compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo (53,29 g, rendimiento de un 67 % en dos etapas).  
 RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 7,08 (2H, d, J = 8,5 Hz), 3,74 (2H, s), -CO<sub>2</sub>H no visible.

## 10 Etapa 3 - 2-(3,5-Difluoro-4-nitrofenil)etanol

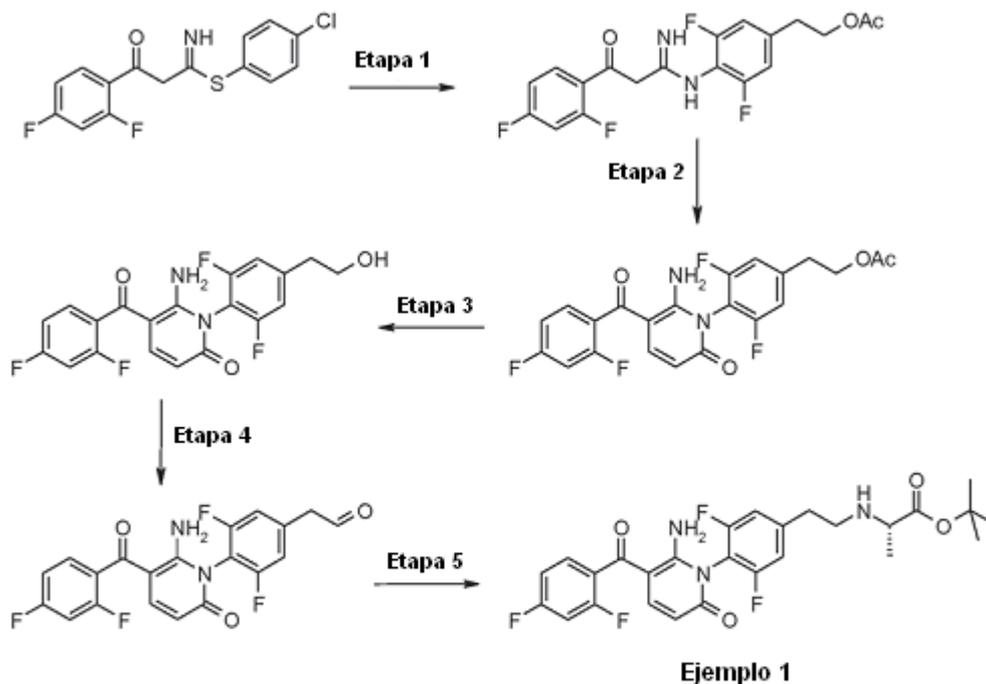
El complejo de borano-sulfuro de dimetilo (35 ml, 368 mmol) se añadió gota a gota durante 20 minutos a una solución fría (0 °C) de ácido (3,5-difluoro-4-nitrofenil)acético (53,29 g, 245 mmol) en THF anhidro (500 ml) en atmósfera de nitrógeno. Después de que se completara la adición, la mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente, se agitó durante 16 horas, se enfrió a 0 °C, se interrumpió con cuidado con MeOH (300 ml) y se concentró a presión reducida para proporcionar un aceite de color marrón. La purificación mediante cromatografía ultrarrápida en estado seco (EtOAc al 60-80 % en heptanos) proporcionó el compuesto del título en forma de un aceite de color naranja (38,90 g, rendimiento de un 78 %).  
 RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 7,01 (2H, d, J = 8,7 Hz), 3,93 (2H, t, J = 6,2 Hz), 2,92 (2H, t, J = 6,2 Hz), 2,34 (1H, s a).

## 20 Etapa 4 - 2-(4-Amino-3,5-difluorofenil)etanol

El 2-(3,5-difluoro-4-nitrofenil)etanol (38,90 g, 191 mmol) se disolvió en EtOAc (250 ml). El recipiente de reacción se evacuó y se cargó con nitrógeno tres veces. Se añadió paladio sobre carbono (10 % en peso, 4,00 g) y el recipiente se evacuó y se cargó con nitrógeno tres veces. Por último, el recipiente se evacuó y se cargó con hidrógeno y se equipó con un globo que contenía hidrógeno. A continuación, se agitó a temperatura ambiente en atmósfera de hidrógeno durante 15 horas, el globo de hidrógeno se volvió a cargar y la mezcla se agitó durante un periodo adicional de 25 horas. La mezcla de reacción se filtró a través de Celite® y el filtrado se concentró a presión reducida para proporcionar un aceite de color marrón. La purificación mediante cromatografía ultrarrápida en estado seco (EtOAc al 50 % en heptanos) proporcionó el compuesto del título en forma de un sólido de color beige (20,70 g, rendimiento de un 62 %).  
 RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 6,73-6,70 (2H, m), 3,81 (2H, t, J = 6,4 Hz), 2,75 (2H, t, J = 6,4 Hz), -OH y -NH<sub>2</sub> no visibles.

35 **Ejemplo 1: N-(2-{4-[6-amino-5-(2,4-difluorobenzoi)-2-oxopiridin-1(2H)-il]-3,5-difluorofenil}etil)-L-alaninato de *tert*-butilo**

40 El **Ejemplo 1** se sintetizó usando la ruta que se muestra en el Esquema 2 que sigue a continuación.



### Esquema 2

Etapa 1 - Acetato de 2-(4-([3-(2,4-difluorofenil)-3-oxopropanimidooil]amino)-3,5-difluorofenil)etilo

- 5 Se añadió 2-(4-amino-3,5-difluorofenil)etanol (20,71 g, 120 mmol) se añadió a una solución de clorhidrato de 3-(2,4-difluorofenil)-3-oxopropanimidooil de 4-clorofenilo (41,26 g, 114 mmol) en ácido acético glacial (400 ml). La mezcla de reacción se agitó a 80 °C durante 2,5 horas y se añadió anhídrido acético (21 ml, 228 mmol). Después de un periodo adicional de 45 minutos a 80 °C, la mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente y se concentró a presión reducida para proporcionar un aceite de color marrón. La trituración con EtOAc proporcionó un sólido de color beige, que se lavó con éter dietílico. El sólido se recogió en una solución acuosa saturada de NaHCO<sub>3</sub> y se agitó vigorosamente durante 30 minutos. Un sólido se recogió por filtración, se lavó con agua y se permitió que se secase a presión reducida para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido de color beige (23,36 g, rendimiento de un 52 %).  
 10 LCMS: *m/z* 397 [M+H]<sup>+</sup>.  
 15

Etapa 2 - Acetato de 2-{4-[6-amino-5-(2,4-difluorobenzoi)-2-oxopiridin-1(2*H*)-il]-3,5-difluorofenil} etilo

- Se añadió ácido propiólico (5,4 ml, 88 mmol) gota a gota durante 5 minutos a una solución fría (0 °C) de CDI (14,27 g, 88 mmol) en THF anhidro (400 ml) en atmósfera de nitrógeno. Después de la finalización de la adición, la  
 20 mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante una hora. Se añadió una solución de acetato de 2-(4-([3-(2,4-difluorofenil)-3-oxopropanimidooil]amino)-3,5-difluoro-fenil)etilo (23,26 g, 59 mmol) en THF anhidro (200 ml) y la mezcla de reacción se agitó a la temperatura de reflujo durante 6,5 horas. La mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente y se dejó en reposo durante 16,5 horas. El ácido propiólico (5,4 ml, 88 ml), CDI (14,27 g, 88 mmol) y THF (200 ml) se trataron como se ha descrito anteriormente y se añadieron a la  
 25 mezcla de reacción, que a continuación se agitó a la temperatura de reflujo durante un periodo adicional de 6 horas. A continuación, la mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente y se concentró a presión reducida para proporcionar un aceite de color marrón. La purificación mediante cromatografía ultrarrápida en estado seco (MeOH al 5 % en DCM) proporcionó un sólido de color marrón oscuro, que se purificó adicionalmente mediante la trituración con EtOAc para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo (7,45 g, rendimiento de  
 30 un 28 %). LCMS: *m/z* 449 [M+H]<sup>+</sup> y 471 [M+Na]<sup>+</sup>.

Etapa 3 - 6-Amino-5-(2,4-difluorobenzoi)-1-[2,6-difluoro-4-(2-hidroxi)etil]fenil]piridin-2(1*H*)-ona

- El acetato de 2-{4-[6-amino-5-(2,4-difluorobenzoi)-2-oxopiridin-1(2*H*)-il]-3,5-difluorofenil}etilo (7,45 g, 17 mmol) se suspendió en HCl 6 N (80 ml) y la mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 21,5 horas. Un sólido se recogió  
 35

por filtración, se recogió en una solución acuosa saturada de NaHCO<sub>3</sub> (200 ml) y se agitó vigorosamente durante 30 minutos. Un sólido se recogió por filtración, se lavó con agua y se secó en un horno de vacío (40 °C) para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido de color beige.

LCMS:  $m/z$  407 [M+H]<sup>+</sup> y 429 [M+Na]<sup>+</sup>.

5 RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) 7,57 (1H, td, J = 6,6, 8,3 Hz), 7,41 (1H, td, J = 2,4, 9,7 Hz), 7,37-7,29 (3H, m), 7,23 (1H, td, J = 2,3, 8,5 Hz), 5,74 (1H, d, J = 9,8 Hz), 4,78 (1H, t, J = 5,1 Hz), 3,76-3,70 (2H, m), 2,86 (2H, t, J = 6,7 Hz), -NH<sub>2</sub> no visible.

10 Etapa 4 - {4-[6-Amino-5-(2,4-difluorobenzoyl)-2-oxopiridin-1(2H)-il]-3,5-difluorofenil}-acetaldehído

15 Se añadió peryodinano de Dess-Martin (1,03 g, 2,4 mmol) a una suspensión de 6-amino-5-(2,4-difluorobenzoyl)-1-[2,6-difluoro-4-(2-hidroxietil)fenil]piridin-2(1H)-ona (823 mg, 2,0 mmol) en DCM (20 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas, se interrumpió con una solución acuosa saturada de NaHCO<sub>3</sub> (10 ml) y una solución acuosa saturada de tiosulfato sódico (10 ml) y se agitó vigorosamente durante 30 minutos. La fase acuosa se separó y se extrajo adicionalmente con DCM (2 x 20 ml). Los extractos orgánicos combinados se secaron (MgSO<sub>4</sub>), se filtraron y se concentraron a presión reducida para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido de color marrón pálido (819 mg). Este se usó sin purificación adicional en la siguiente etapa.

20 Etapa 5 - *N*-(2-{4-[6-Amino-5-(2,4-difluorobenzoyl)-2-oxopiridin-1(2H)-il]-3,5-difluorofenil}etil)-L-alaninato de *tert*-butilo

25 Se añadieron clorhidrato de L-alaninato de *tert*-butilo (552 mg, 3,0 mmol) y STAB (1,29 g, 6,1 mmol) se añadieron a una solución de {4-[6-amino-5-(2,4-difluorobenzoyl)-2-oxopiridin-1(2H)-il]-3,5-difluorofenil}-acetaldehído (819 mg, 2,0 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3,5 horas, se interrumpió con una solución acuosa saturada de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (20 ml) y se agitó vigorosamente durante 20 minutos. La fase acuosa se separó y se extrajo adicionalmente con EtOAc (2 x 20 ml). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera (20 ml), se secaron (MgSO<sub>4</sub>), se filtraron y se concentraron a presión reducida para proporcionar un aceite de color amarillo. La purificación por cromatografía en columna (MeOH al 5 % en DCM) proporcionó el compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo pálido (492 mg, rendimiento de un 78 % en dos etapas).

LCMS: pureza de un 98 %,  $m/z$  534 [M+H]<sup>+</sup>.

30 RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) 7,58 (1H, td, J = 6,8, 8,3 Hz), 7,41 (1H, td, J = 2,3, 9,8 Hz), 7,37-7,30 (3H, m), 7,23 (1H, td, J = 2,3, 8,5 Hz), 5,74 (1H, d, J = 9,8 Hz), 3,20 (1H, d, J = 7,0 Hz), 2,89-2,70 (4H, m), 1,42 (9H, s), 1,16 (3H, d, J = 7,0 Hz), -NH<sub>2</sub> y -NH- no visibles.

### 35 Medición de actividades biológicas

#### Actividad de p38 MAP quinasa

40 La capacidad de los compuestos para inhibir la actividad de p38 MAP a quinasa se midió en un ensayo realizado por Upstate (Dundee UK). En un volumen de reacción final de 25 µl, la p38 MAP Quinasa a (5-10 mU) se incubó con Tris 25 mM a pH 7,5, EGTA 0,002 mM, 0,33 mg/ml de proteína básica de mielina, Acetato de Mg 10 mM y [γ-33p-ATP] (actividad específica aprox. 500 cpm/pmol, concentración según se necesite). La reacción se inicia mediante la adición de la mezcla de MgATP. Después de incubar durante 40 minutos a temperatura ambiente, la reacción se detiene mediante la adición de 5 µl de una solución de ácido fosfórico al 3 %. A continuación se aplican de manera puntual 10 µl de la reacción sobre un sistema de filtro *Filtermat* P30 y se lavó tres veces durante 5 minutos en ácido fosfórico 75 mM y una vez en metanol antes de secar y hacer el recuento de centelleo.

50 Los puntos de datos por duplicado se generan a partir de una serie de dilución de 1/3 log de una solución de reserva en DMSO. Se realiza en nueve etapas de dilución a partir de una concentración máxima de 10 µM, y se incluye un blanco 'sin compuesto'. El ensayo de unión a filtro radiométrico convencional se realiza a una concentración de ATP a, o cerca de, Km. Los datos de los recuentos de centelleo se recogen y se someten a análisis sin ajuste con el software Prism. A partir de la curva generada, la concentración que proporciona un 50 % de inhibición se determina y se informa.

#### 55 Estimulación de células THP-1 con LPS

60 Las células THP-1 se sembraron en placas en 100 µl a una densidad de 4 x 10<sup>4</sup> células/pocillo en placas de 96 pocillos con fondo en V tratadas con cultivo tisular y se incubaron a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5 % durante 16 h. 2 hrs después de la adición del inhibidor en 100 µl de medios de cultivo tisular, las células se estimularon con LPS (cepa 005:B5 de *E. Coli*, Sigma) a una concentración final de 1 µg/ml y se incubaron a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5 % durante 6 h. Los niveles de TNF-α se midieron a partir de los sobrenadantes sin células mediante ELISA de sándwich (R&D Systems N.º QTA00B).

#### Estimulación de sangre completa humana con LPS

65 La sangre completa se extrajo mediante punción venosa usando vacutainers heparinizados (Becton Dickinson) y se diluyó en un volumen igual de medio de cultivo tisular de RPMI1640 (Sigma). 100 µl se sembraron en placas de 96

pocillos con fondo en V tratadas con cultivo tisular. 2 hrs después de la adición del inhibidor en 100 µl de medios RPMI1640, la sangre se estimuló con LPS (cepa 005:B5 de *E. Coli*, Sigma) a una concentración final de 100 ng/ml y se incubó a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5 % durante 6 hrs. Los niveles de TNF-α se midieron a partir de los sobrenadantes sin células mediante ELISA de sándwich (R&D Systems N.º QTA00B).

5

#### **Exposición a plasma en ratones**

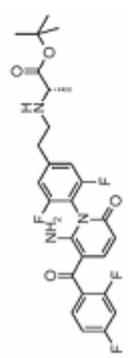
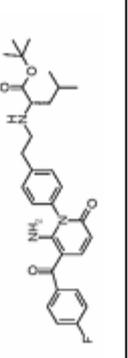
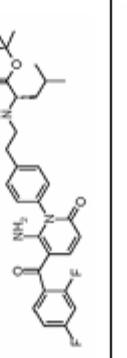
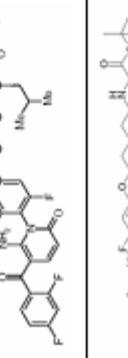
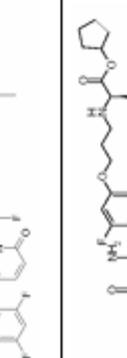
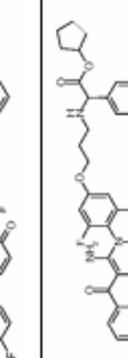
10 Los compuestos se formularon en DMSO al 8 %, 92 % 11,25 % de hidroxipropil-β-ciclodextrina en agua usando el siguiente procedimiento: los compuestos se disolvieron totalmente en DMSO al 100 % y a continuación se añadió la solución de hidroxipropil-β-ciclodextrina. El precipitado fino formado se volvió a disolver mediante la adición de HCl acuoso y el pH se ajustó a 4 con hidróxido sódico acuoso.

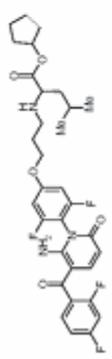
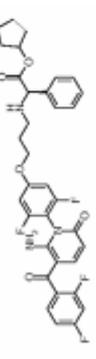
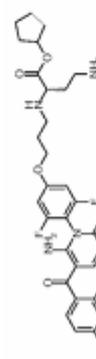
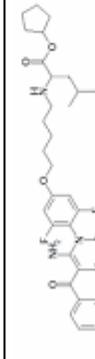
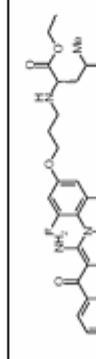
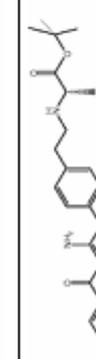
15 Cada compuesto se administró por vía oral a 10 mg/kg, en un volumen de dosis total de 5 ml/kg, a ratones CD1 macho (25-20 g). Para cada punto temporal se usaron tres ratones. Las muestras de sangre se extrajeron en los siguientes puntos temporales: 5, 15, 30, 60, 120, 240 y 360 minutos, mediante punción cardiaca terminal, con anestesia de halotano/isoflurano. Las muestras de sangre se recogieron en tubos enfriados previamente que contenían NaF/EDTA y se mezcló. Las muestras se centrifugaron a 7-7,5 x g durante 2 minutos. El plasma se aspiró y se congeló.

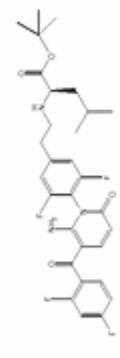
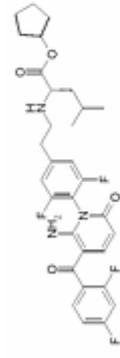
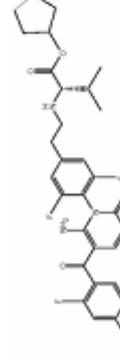
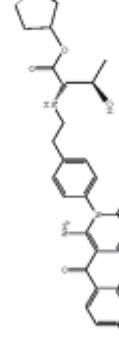
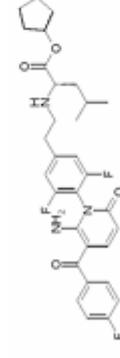
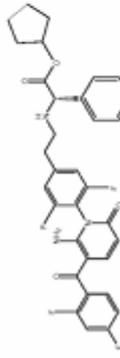
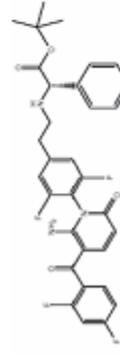
20 Las muestras de plasma se prepararon mediante precipitación de proteína usando tres volúmenes de acetonitrilo que contenían el patrón interno. Los sobrenadantes se analizaron por LCMS (Sciex API 3000, HP 1100 bomba binaria, CTC PAL). La cromatografía se basó en una columna Acentis C8 (50 x 2,1 mm) y una fase móvil que acetonitrilo al 5-95 % en agua/ácido fórmico al 0,1 %.

25 La exposición (AUC) se calculó a partir de la concentración de plasma con respecto al perfil de tiempo usando PK Solutions 2. 0 (Summit Research Services, Montrose, Colorado).

**Tabla 1- Actividad Biológica del Compuesto de la Invención y Compuestos Estructuralmente Relacionados**

| Las Columnas A a D proporcionan datos para lo siguiente:<br>A - ensayo enzimático de éster (p38 quinasa A (invitrogen)), C <sub>50</sub> (nM);<br>B - ensayo enzimático de ácido (p38 quinasa A (invitrogen)), C <sub>50</sub> (nM);<br>C - inhibición del TNF-alfa del éster (células THP-1 cells), C <sub>50</sub> (nM); y<br>D - inhibición del TNF-alfa del éster (sangre completa humana), C <sub>50</sub> (nM). |  |     |     |      |      |
|---|--|-----|-----|------|------|
| Estructura Química  | Nombre   | A   | B   | C    | D    |
|    | <i>N</i> -(2-(4-(6-amino-5-(2,4-difluorobenzoyl)-2-oxopiridin-1(2 <i>H</i> )-il)-3,5-difluorofenil)etil)-L-alaninato de <i>terc</i> -butilo                      | 12  | 1   | 1,6  | 26   |
|    | <i>N</i> -[2-(4-(6-amino-5-(4-fluorofenil)carbonil)-2-oxopiridin-1(2 <i>H</i> )-il)fenil)etil]-L-leucinato de <i>terc</i> -butilo                                | 724 | 118 | 19,0 | 947  |
|    | <i>N</i> -2-(4-(6-amino-5-(2,4-difluorofenil)carbonil)-2-oxopiridin-1(2 <i>H</i> )-il)fenil)etil]-L-leucinato de <i>terc</i> -butilo                             | 330 | 58  | 2,4  | 638  |
|   | ( <i>S</i> )-2-(3-(4-(6-amino-5-(2,4-difluoro benzoyl)-2-oxo-2 <i>H</i> -piridin-1-il)-3,5-difluorofenoxi)propilamino)-4-metil pentanoato de <i>terc</i> -butilo |     |     | 76,1 | 4274 |
|    | <i>N</i> -(5-(4-(6-amino-5-(2,4-difluorobenzoyl)-2-oxopiridin-1(2 <i>H</i> )-il)-3,5-difluorofenoxi)pentil)-L-leucinato de <i>terc</i> -butilo                   | 73  | 2   | 29,0 | 1247 |
|    | ( <i>S</i> )-3-(4-(6-amino-5-(4-fluorobenzoyl)-2-oxo-2 <i>H</i> -piridin-1-il)-3,5-difluorofenoxi)propilamino)fenilacetato de ciclopentilo                       |     |     | 38,0 |      |
|    | ( <i>S</i> )-3-(4-(6-amino-5-(2,4-difluorobenzoyl)-2-oxo-2 <i>H</i> -piridin-1-il)-3,5-difluorofenoxi)propilamino)fenilacetato de ciclopentilo                   |     |     | 5,3  | 508  |

| Estructura Química  | Nombre  | A   | B  | C    | D   |
|---|---|-----|----|------|-----|
|    | (S)-2-(3-(4-[6-amino-5-(2,4-difluorobenzoyl)-2-oxo-2H-pyridin-1-yl]-3,5-difluorofenoxi)propilamino)-4-metil pentanoato de ciclopentilo  |     |    | 10,7 | 594 |
|    | (2R)-[(3-(4-[6-amino-5-(2,4-difluorobenzoyl)-2-oxopiridin-1(2H)-il]-3,5-difluorofenoxi)propil)amino](fenil)acetato de ciclopentilo      |     |    | 6,0  |     |
|    | N-(3-(4-[6-amino-5-(2,4-difluorobenzoyl)-2-oxopiridin-1(2H)-il]-3,5-difluorofenoxi)propil)-L-leucinato de 2-morfolin-4-iletio           |     |    | 0,4  | 935 |
|    | (2S)-4-amino-2-[(3-(4-[6-amino-5-(2,4-difluorobenzoyl)-2-oxopiridin-1(2H)-il]-3,5-difluorofenoxi)propil)amino]butanoato de ciclopentilo | 1   | 5  | 22,0 | 479 |
|    | N-(5-(4-[6-amino-5-(2,4-difluorobenzoyl)-2-oxopiridin-1(2H)-il]-3,5-difluorofenoxi)pentil)-L-leucinato de ciclopentilo                  | 81  | 2  | 4,2  | 179 |
|   | N-(3-(4-[6-amino-5-(4-fluorobenzoyl)-2-oxopiridin-1(2H)-il]-3,5-difluorofenoxi)propil)-L-leucinato de etilo                             | 28  |    | 8,6  |     |
|  | N-[2-(4-[6-amino-5-[(2,4-difluorofenil)carbonil]-2-oxopiridin-1(2H)-il]fenil)etil]-L-alaninato de terc-butilo                           | 58  | 58 | 2,8  | 195 |
|  | N-(2-(4-[6-amino-5-(2,4-difluorobenzoyl)-2-oxopiridin-1(2H)-il]-3,5-difluorofenil)etil)-L-leucinato de terc-butilo                      | 120 | 1  | 3,0  | 191 |

| Estructura Química  | Nombre   | A   | B  | C    | D              |
|---|--|-----|----|------|----------------|
|    | N-(2-(4-{[6-amino-5-(2,4-difluorobenzoyl)-2-oxopiridin-1(2H)-il]-3,5-difluorofenil}etil)-D-leucinato de terc-butilo            | 167 | 2  | 81,0 | 0 % a<br>10 µm |
|    | N-(2-(4-{[6-amino-5-(2,4-difluorobenzoyl)-2-oxopiridin-1(2H)-il]-3,5-difluorofenil}etil)-L-leucinato de ciclopentilo           | 231 | 1  | 0,5  | 54             |
|    | N-[2-(4-{[6-amino-5-[(2,4-difluorofenil)carbonil]-2-oxopiridin-1(2H)-il]-3,5-difluorofenil}etil)-L-valinato de ciclopentilo    | 22  |    | 8,4  | 5184           |
|    | N-2-(4-{[6-amino-5-[(2,4-difluorofenil)carbonil]-2-oxopiridin-1(2H)-il]fenil}etil)-L-treoninato de ciclopentilo                | 68  | 56 | 1,8  | 1198           |
|   | N-(2-(4-{[6-amino-5-(4-fluorobenzoyl)-2-oxopiridin-1(2H)-il]-3,5-difluorofenil}etil)-L-leucinato de ciclopentilo               | 12  | 1  | 0,9  | 190            |
|  | (2S)-[2-(4-{[6-amino-5-(2,4-difluorobenzoyl)-2-oxopiridin-1(2H)-il]-3,5-difluorofenil}etil)amino]fenil]acetato de ciclopentilo | 65  | 1  | 0,5  | 148            |
|  | (2S)-[2-(4-{[6-amino-5-(2,4-difluorobenzoyl)-2-oxopiridin-1(2H)-il]-3,5-difluorofenil}etil)amino]fenil]acetato de terc-butilo  | 44  | 1  | 2,0  | 779            |

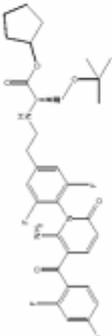
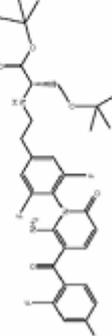
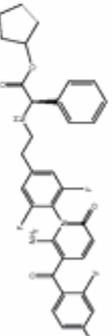
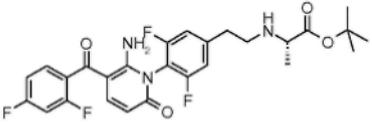
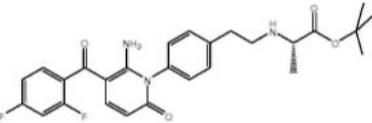
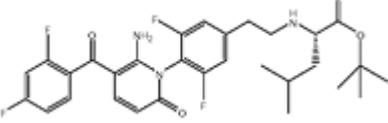
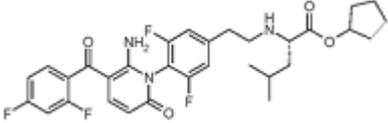
| Estructura Química  | Nombre  | A  | B | C    | D    |
|---|---|----|---|------|------|
|  | N-(2-(4-{6-amino-5-(2,4-difluorobenzoyl)-2-oxopiridin-1(2H)-il}-3,5-difluorofenil)etil)-O-terc-butil-L-serinato de ciclopentilo | 57 | 1 | 5,7  | 1295 |
|  | N-(2-(4-{6-amino-5-(2,4-difluorobenzoyl)-2-oxopiridin-1(2H)-il}-3,5-difluorofenil)etil)-O-terc-butil-L-serinato de terc-butilo  | 72 | 1 | 83,0 |      |
|  | (2R)-[(2-(4-{6-amino-5-(2,4-difluorobenzoyl)-2-oxopiridin-1(2H)-il}-3,5-difluorofenil)etil)amino](fenil)acetato de ciclopentilo | 47 |   | 21,0 | 4108 |

Tabla 2 - Exposición a plasma en ratones

| Estructura Química  | Nombre   | po 10 mg/kg<br>AUC <sub>0-t</sub><br>(ng/ml.h) |
|---|--|--|
|    | N-(2-(4-(6-amino-5-(2,4-difluorobenzoyl)-2-oxopiridin-1(2H)-il)-3,5-difluorofenil)etil)-L-alaninato de <i>terc</i> -butilo | 102  |
|    | N-[2-(4-(6-amino-5-((2,4-difluorofenil)carbonil)-2-oxopiridin-1(2H)-il)fenil)etil]-L-alaninato de <i>terc</i> -butilo      | 0  |
|   | N-(2-(4-(6-amino-5-(2,4-difluorobenzoyl)-2-oxopiridin-1(2H)-il)-3,5-difluorofenil)etil)-L-leucinato de <i>terc</i> -butilo | 75   |
|    |  |  |
|  | N-(2-(4-(6-amino-5-(2,4-difluorobenzoyl)-2-oxopiridin-1(2H)-il)-3,5-difluorofenil)etil)-L-leucinato de ciclopentilo        | 14   |

### Conclusiones

- 5 La Tabla 1 demuestra que el compuesto del presente inventor es un buen inhibidor de la p38 MAP quinasa. Además, los valores de  $CI_{50}$  para la inhibición del TNF- $\alpha$  con el éster en células THP-1 y en sangre humana son muy bajos. En particular, la inhibición del TNF- $\alpha$  con el éster en sangre humana es significativamente más baja de lo que se podría esperar dados los valores de  $CI_{50}$  para la inhibición del TNF- $\alpha$  con el éster en sangre humana observados para los compuestos relacionados.

- 10 Los datos del AUC presentados en la Tabla 2 muestran que la biodisponibilidad del compuesto de la invención es mucho más elevada que la de los compuestos conocidos, estructuralmente similares.

**REIVINDICACIONES**

1. Un compuesto que es:

- 5 N-[2-{4-[6-amino-5-(2,4-difluorobenzoyl)-2-oxopiridin-1(2H)-il]-3,5-difluorofenil}etil)-L-alaninato de terc-butilo, o una sal, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.
2. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 junto con uno o más vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables.
- 10 3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o una composición de acuerdo con la reivindicación 2 para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.
- 15 4. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o una composición de acuerdo con la reivindicación 2 para su uso en la inhibición de la actividad de una enzima p38 MAP quinasa *in vitro* o *in vivo*.
5. Un compuesto o composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 4 en la que el compuesto o composición es para su uso en la prevención o tratamiento de enfermedad autoinmune o inflamatoria.
- 20 6. Un compuesto o composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 4 o la reivindicación 5 en las que el compuesto o composición es para su uso en la prevención o tratamiento de artritis reumatoide, artritis psoriática, diabetes de Tipo 1, asma, enfermedad inflamatoria del intestino, lupus sistémico eritematoso, inflamación que acompaña a afecciones infecciosas, psoriasis, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, esclerosis múltiple, dermatitis atópica, o enfermedad de injerto contra hospedador.
- 25 7. Un compuesto o composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 4 en la que el compuesto o composición es para su uso en el tratamiento de una enfermedad proliferativa celular.
- 30 8. Un compuesto o composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 4 o la reivindicación 7 en las que el compuesto o composición es para su uso en el tratamiento de cáncer.
9. Un compuesto o composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, la reivindicación 7 o la reivindicación 8 en las que el compuesto o composición es para su uso en el tratamiento de cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer pancreático, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer renal, linfoma o melanoma.