

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 677 595**

51 Int. Cl.:

C07D 401/14 (2006.01)

A61K 31/497 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.02.2015 PCT/EP2015/053151**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.08.2015 WO15121444**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.02.2015 E 15705797 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.04.2018 EP 3105222**

54 Título: **Compuestos heterocíclicos aromáticos como compuestos antiinflamatorios**

30 Prioridad:

14.02.2014 US 201461940282 P
18.02.2014 US 201461941064 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.08.2018

73 Titular/es:

RESPIVERT LIMITED (100.0%)
50-100 Holmers Farm Way
High Wycombe, Buckinghamshire HP12 4EG, GB

72 Inventor/es:

LONGSHAW, ALISTAIR, IAN;
FORDYCE, EUAN, ALEXANDER, FRASER;
ONIONS, STUART, THOMAS;
KING-UNDERWOOD, JOHN y
VENABLE, JENNIFER, DIANE

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 677 595 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

Compuestos heterocíclicos aromáticos como compuestos antiinflamatorios

Campo de la invención

La invención se refiere a un compuesto el cual es un inhibidor de la familia de enzimas proteína quinasas activadas por mitógeno p38 (denominados en esta invención inhibidores de p38 MAP quinasa), por ejemplo sus subtipos de alfa y gamma quinasas, y la familia Src de tirosina quinasas, y a su utilización en terapia, incluyendo en combinaciones farmacéuticas, especialmente en el tratamiento de enfermedades inflamatorias, en particular enfermedades inflamatorias del pulmón, tales como asma o EPOC, así como también aquellas enfermedades del tracto gastrointestinal, tales como colitis ulcerativa, enfermedad intestinal irritable (EII) y enfermedad de Crohn y del ojo, tal como uveítis.

Antecedentes de la invención

Cuatro isoformas de p38 MAPK (alfa, beta, gamma y delta respectivamente), han sido identificadas exhibiendo cada una diferentes patrones de expresión tisular en el hombre. Las isoformas de p38 MAPK alfa y beta son encontradas ubicuamente en el cuerpo, estando presentes en muchos tipos celulares diferentes. La isoforma alfa es bien caracterizada en términos de su rol en la inflamación. Si bien los estudios que utilizan un enfoque genético químico en ratones indican que la isoforma beta de p38 MAPK no juega un rol en la inflamación (O'Keefe, S.J. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2007, 282(48), 34663–71), puede estar involucrada 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 cantidad de compuestos de peso molecular pequeño previamente descritos. Las primeras clases de inhibidores eran sumamente tóxicos debido a la amplia distribución en los tejidos de estas isoformas lo cual dio como resultado múltiples efectos fuera del objetivo de los compuestos. Por añadidura, el desarrollo de una cantidad sustancial de inhibidores ha sido discontinuado debido a perfiles inaceptables de seguridad en estudios clínicos (Pettus, L.H. y Wurz, R.P., *Curr. Top. Med. Chem.*, 2008, 8(16), 1452–67). Como estos efectos adversos varían con el quimiotipo, y los compuestos tienen patrones distintos de selectividad de quinasa, las toxicidades observadas pueden estar relacionadas con la estructura más que basadas en el mecanismo de p38. Más recientemente, se han desarrollado compuestos con mayor potencia y especificidad para p38 α/β MAPK; sin embargo, los niveles de eficacia logrados en el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas, incluyendo la artritis reumatoidea (SCIO–469, Genovese *et al.*, *J. Rheumatol.*, 2011, 38, 846–54; Pamapimod, Cohen *et al.*, *Arthritis Rheum.*, 2009, 60, 335–344; BMS–582949, Schieven *et al.*, *Arthritis Rheum.*, 2010, 62, Suppl. 10:1513) y EPOC (Losmapimod, Watz *et al.*, *Lancet Resp. Med.*, 2014, 2, 63–72) han sido decepcionantes. Adicionalmente, cabe destacar que se descubrió que un inhibidor de p38 MAPK proporciona beneficio para pacientes con EII después de tratamiento durante una semana el cual no fue sostenido durante un curso de tratamiento de cuatro semanas (**BIRB–796**, Schreiber, S. *et al.*, *Clin. Gastro. Hepatology*, 2006, 4, 325–334).

Una conclusión importante a la cual se llega a partir de estos estudios es que el uso de un inhibidor de quinasa específico del objetivo puede no ser suficiente para lograr y mantener un beneficio terapéutico en enfermedades inflamatorias complejas, donde la desregulación de múltiples vías inmunoinflamatorias y adaptación biológica pueden evitar el bloqueo de un mecanismo de un solo objetivo, dando como resultado la pérdida de respuesta. Se puede argumentar que para enfermedades inflamatorias complejas tales como EPOC, artritis reumatoidea y EII, los inhibidores que se dirigen hacia un conjunto de quinasas que son críticos para la regulación de los diferentes mecanismos inmunoinflamatorios vinculados con la patología tendrán mayor potencial para lograr eficacia y una respuesta terapéutica sostenida.

El rol de p38 MAPK–alfa en la regulación de las vías inflamatorias ha sido investigado extensamente y está bien establecido. Menos se sabe acerca de las isoformas p38 MAPK gamma y delta, las cuales, a diferencia de las isozimas alfa y beta se expresan en tejidos y células específicos. La isoforma p38 MAPK–delta es expresada más altamente en el páncreas, testículos, pulmón, intestino delgado y en el riñón. Es también abundante en macrófagos y detectable en neutrófilos, células 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). Muy poco se sabe acerca de la distribución de p38 MAPK gamma si bien se expresa más altamente en el cerebro, músculo esquelético y en el 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). La evidencia en cuanto a que las p38 MAPK–gamma y p38 MAPK–delta quinasas se expresan en tipos celulares inmunológicamente importantes y proinflamatorios ha suscitado interés en sus funciones con relación a p38 MAPK–alfa. Los inhibidores selectivos de molécula pequeña de p38 MAPK gamma y p38 MAPK delta no están actualmente disponibles para evaluar los roles de estas quinasas farmacológicamente, si bien un compuesto previamente descrito, **BIRB 796**, se sabe que posee actividad inhibidora de isoforma pan. La inhibición de las isoformas p38 MAPK gamma y delta es observada en concentraciones más altas del compuesto que aquellas requeridas para inhibir p38 MAPK alfa y p38 beta (Kuma, Y., *J. Biol. Chem.*, 2005, 280, 19472–19479). Además **BIRB 796** también deterioró la fosforilación de p38 MAPKs o JNKs por la quinasa corriente arriba MKK6 o MKK4. Kuma describió la posibilidad de que el cambio conformacional

causado por la unión del inhibidor a la proteína MAPK puede afectar la estructura de ambos su sitio de fosforilación y el sitio de acoplamiento para el activador corriente arriba, deteriorando de ese modo la fosforilación de p38 MAPKs o JNKs.

Se cree que p38 MAP quinasa juega un rol pivotal en muchas de las vías de señalización que están involucradas en la iniciación y mantenimiento de la inflamación persistente, crónica en enfermedades humanas, por ejemplo, en asma severo y en EPOC (Chung, F., *Chest*, 2011, 139(6), 1470–1479). En la actualidad existe abundante bibliografía la cual demuestra que p38 MAP quinasa es activada por un rango de citoquinas proinflamatorias y que su activación da como resultado el reclutamiento y la liberación de citoquinas proinflamatorias adicionales. Por ejemplo, Smith describe el efecto inhibitorio de inhibidores de p38 MAP quinasa sobre la liberación de TNF α de las PBMCs humanas. Sin embargo, la producción de algunas citoquinas (IL–8 y GM–CSF) por macrófagos de tejido del pulmón aislados de fumadores y ex–fumadores fue relativamente insensible a los inhibidores de p38 α/β MAPK y Smith sugiere que la abundancia de p38 MAPK–delta expresada en estas células podría dar cuenta de los efectos disminuidos de los compuestos (Smith *et al.*, *Br. J. Pharmacol.*, 2006, 149, 393–404). Risco *et al.*, (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2012, 109, 11200–11205) han utilizado ratones con desactivación génica de p38 MAPK–gamma y p38 MAPK–delta para investigar los roles de estas isoformas de p38 en vías que regulan la producción de citoquinas por macrófagos. Estos estudios establecieron que en ratones ambas quinastas son esenciales para respuestas inflamatorias inmunes innatas incluyendo la producción de citoquinas proinflamatorias. Más recientemente, Criado, G. *et al.*, (*Arthritis Rheum.*, 2014, 66(5), 1208–17) han demostrado que en un modelo de ratón de artritis inflamatoria la severidad reducida de la enfermedad en ratones p38 γ/δ –/– estaba asociada con la producción más baja de citoquinas y con la activación inmunológica que en ratones de control normales, lo cual indica que p38 MAPK gamma y p38 MAPK delta son reguladores cruciales de la patología articular inflamatoria. Estos descubrimientos sugieren que además de p38 MAPK alfa, p38 MAPK gamma y p38 MAPK delta son potenciales objetivos terapéuticos en enfermedades complejas que involucran respuestas inmunes innatas y adaptativas tal como EPOC.

El uso de inhibidores de p38 MAP quinasa en el tratamiento de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) también ha sido investigado. Los inhibidores de molécula pequeña dirigidos a p38 MAPK α/β han demostrado ser eficaces para reducir diversos parámetros de inflamación en células y en tejidos obtenidos de pacientes con EPOC, quienes son generalmente insensibles a los corticoides, (Smith, S.J., *Br. J. Pharmacol.*, 2006, 149, 393–404) así como también 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 colaboradores también han sugerido el posible involucramiento de p38 MAPK α/β con la insensibilidad a los corticoides *via* la reducción de la afinidad de unión del receptor de glucocorticoide (RG) en los núcleos (Irusen, E. *et al.*, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2002, 109, 649–657). La experiencia clínica con un rango de inhibidores de p38 MAP quinasa, incluyendo **AMG548**, **BIRB 796**, **VX702**, **SCIO469** y **SCIO323** ha sido descrita (Lee, M.R. y Dominguez, C., *Current Med. Chem.*, 2005, 12, 2979–2994).

EPOC es una afección en la cual se informa sobre una inflamación subyacente que es sustancialmente resistente a los efectos antiinflamatorios de los corticoides inhalatorios. Por lo tanto, una estrategia superior para tratar la EPOC sería desarrollar una intervención que tenga tanto efectos antiinflamatorios inherentes como la capacidad de aumentar la sensibilidad de los tejidos pulmonares de pacientes con EPOC a los corticoides inhalados. Una publicación reciente de Mercado (Mercado, N., *et al.*, *Mol. Pharmacol.*, 2011, 80(6), 1128–1135) demuestra que el silenciamiento de p38 MAPK– γ tiene el potencial de restaurar la sensibilidad a los corticoides. También se ha informado que P38 MAPK alfa (Mercado, N. *et al.*, *PLoS ONE*, 2012, 7(7), e41582, 1–9) y JNK (Papi *et al.*, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2013, 132, 1075–1085) tienen roles en la regulación de la insensibilidad a los corticoides y Armstrong *et al.* (JPET, 2011, 338, 732–740) han demostrado que el inhibidor de isoforma p38 mixto **BIRB–796** y el corticoide dexametasona tienen efectos antiinflamatorios sinérgicos sobre los macrófagos alveolares de EPOC. Por consiguiente puede haber un beneficio para los pacientes en el uso de un inhibidor de MAP quinasa menos p38 alfa–específico para el tratamiento de EPOC y del asma severo.

Muchos pacientes con diagnóstico de asma o de EPOC continúan sufriendo síntomas no controlados y exacerbaciones de su afección médica que pueden derivar en hospitalización. Esto ocurre a pesar del uso de los regímenes de tratamiento más avanzados, actualmente disponibles, que comprenden productos de combinación de un corticoide inhalatorio y un β –agonista de larga duración. Los datos acumulados en la última década indican que una imposibilidad del manejo eficaz del componente inflamatorio subyacente de la enfermedad en el pulmón es la razón más probable para que se produzcan las exacerbaciones. Dada la eficacia establecida de los corticoides como agentes antiinflamatorios y, en particular, de los corticoides inhalatorios en el tratamiento del asma, estos descubrimientos han provocado una intensa investigación. Los estudios resultantes han identificado que algunas agresiones ambientales invocan cambios inflamatorios insensibles a los corticoides en los pulmones de los pacientes. Un ejemplo es la respuesta que surge de infecciones del tracto respiratorio superior mediadas por virus (URTI, por sus siglas en inglés), que tienen particular importancia en el aumento de la morbilidad asociada con asma y EPOC.

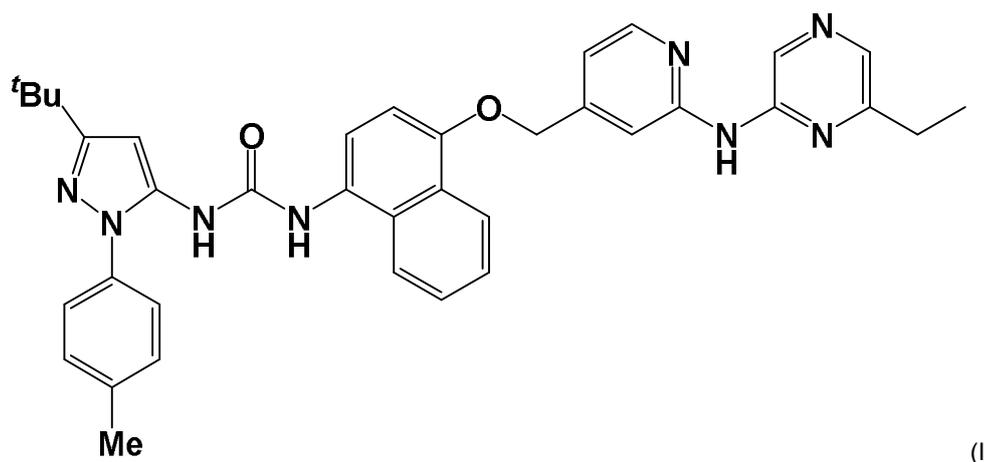
Las investigaciones epidemiológicas han revelado una fuerte asociación entre infecciones virales del tracto respiratorio superior y un porcentaje sustancial de las exacerbaciones sufridas por pacientes que ya tienen un diagnóstico de enfermedades respiratorias crónicas. Algunos de los datos más convincentes sobre este tema derivan de estudios longitudinales de niños que sufren de asma (Papadopoulos, N.G. *et al.*, *Paediatr. Respir. Rev.*, 2004, 5(3), 255–260). Diversos estudios adicionales respaldan la conclusión en cuanto a que una infección viral

- 5 puede precipitar exacerbaciones y aumentar la severidad de la enfermedad. Por ejemplo, se ha informado que infecciones clínicas experimentales con rinovirus causan hipersensibilidad bronquial a la histamina en pacientes asmáticos que no responde al tratamiento con corticoides (Grunberg, K., *et al.*, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2001, 164(10), 1816–1822). La evidencia adicional deriva de la asociación observada entre las exacerbaciones de la enfermedad en pacientes con fibrosis quística e infecciones por VRH (Wat, D. *et al.*, *J. Cyst. Fibros.*, 2008, 7, 320–328). También consistente con este cuerpo de información es el descubrimiento de que las infecciones virales respiratorias, incluyendo rinovirus, representan un factor de riesgo independiente que se correlaciona negativamente con la tasa de supervivencia de 12 meses en receptores de trasplante pulmonar pediátricos (Liu, M. *et al.*, *Transpl. Infect. Dis.*, 2009, 11(4), 304–312).
- 10 TLR3 es un receptor de reconocimiento del patrón de patógeno endosómico que detecta el dsRNA viral que es producido durante la infección viral. En células epiteliales bronquiales humanas (BEAS2B) la vía de TLR3 es activada como respuesta a la infección por rinovirus (RV1B y RV39) (Wang *et al.*, *J. Immunol.*, 2009, 183, 6989–6997). El dsRNA inhalado y la infección por rinovirus provocan la exacerbación de neutrófilos en ratones alérgicos con asma experimental establecido (Mahmutovic–Persson *et al.*, *Allergy*, 2014, 69(3), 348–358). En un modelo de asma alérgico, ratones con desactivación de TLR3 infectados con rinovirus demostraron una reducción de la infiltración de neutrófilos y macrófagos en los pulmones y una inflamación de las vías respiratorias significativamente inferior cuando se compara con los controles TLR3 positivos (Wang, Q. *et al.*, *PLoS Pathog.*, 7(5), e1002070). En conjunto, estas observaciones sugieren que la activación de la vía de TLR3 probablemente juega un rol importante en el desarrollo de la inflamación de las vías respiratorias y en las exacerbaciones de la enfermedad respiratoria como respuesta a las infecciones del tracto respiratorio mediadas por rinovirus
- 15 En células humanas infectadas con rinovirus, se ha demostrado que la activación de TLR3 involucra el reclutamiento del receptor y la activación de c–Src quinasa la cual interviene en múltiples efectos celulares corriente abajo. Ha aparecido una pequeña cantidad de estudios que vinculan a la activación de la familia de quinasas Src (Src1 o p60–Src) o Src celular con respuestas específicas luego de la infección con los virus. Estos estudios incluyen un informe que se refiere a que el adenovirus produce una activación mediada por PI3 quinasa de Akt a través de un mecanismo dependiente de c–Src. Se informa que la actividad de Syk quinasa es controlada por c–Src como una quinasa corriente arriba en la infección de VRH (Lau *et al.*, *J. Immunol.*, 2008, 180, 870–880). Se ha sugerido además que la producción de IL–8 inducida por Rinovirus–39 en células epiteliales depende de la activación de Src quinasa (Bentley, J.K. *et al.*, *J. Virol.*, 2007, 81, 1186–1194). Finalmente, se ha propuesto que la activación de Src quinasa está involucrada en la inducción de la producción de mucina por rinovirus–14 en células epiteliales y glándulas de la sub–mucosa (Inoue, D. *et al.*, *Respir. Physiol. Neurobiol.*, 2006, 154(3), 484–499).
- 20 Se ha descrito previamente 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). Ciertos inhibidores de p38 MAPK también han sido descritos como inhibidores de la replicación del virus sincicial respiratorio (Cass, L. *et al.*, WO 2011/158039).
- 25 Por los motivos antes sintetizados, los compuestos diseñados para tratar enfermedades respiratorias crónicas que combinan la inhibición de c–Src y p59–HCK quinasas con la inhibición de p38 MAPKs, se espera que sean particularmente eficaces.
- 30 Además de jugar roles clave en eventos de señalización celular los cuales controlan la actividad de las vías proinflamatorias, ahora también se reconoce que las enzimas quinasas regulan la actividad de un rango de funciones celulares. Entre las que han sido descritas recientemente están el mantenimiento de la integridad del ADN (Shilo, Y. *Nat. Rev. Cancer*, 2003, 3, 155–168) y la coordinación de los procesos complejos de división celular. Una ilustración de descubrimientos recientes es una publicación que describe el impacto de un conjunto de inhibidores que da curso a las llamadas “Olaharsky quinasas” 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 disrupción de los procesos mitóticos y es por lo tanto una manifestación indeseable de potencial toxicidad. Se descubrió que la inhibición de glucógeno sintasa quinasa 3 α (GSK3 α) era un factor particularmente significativo que aumenta la probabilidad de que un inhibidor de quinasa promueva la formación de micronúcleos. Recientemente, también se ha informado de que la inhibición de la quinasa GSK3 β con RNAi promueve la formación de micronúcleos (Tighe, A. *et al.*, *BMC Cell Biology*, 2007, 8:34).
- 35 Puede ser posible atenuar los efectos adversos que surgen de las interacciones farmacológicas con Olaharsky quinasas, tales como GSK3 α , mediante la optimización de la dosis y/o cambiando la ruta de administración. Sin embargo, sería más ventajoso identificar moléculas terapéuticamente útiles que demuestren actividad baja o indetectable contra estas enzimas fuera de objetivo y por consiguiente que produzcan poca o ninguna disrupción de los procesos mitóticos, según lo medido en ensayos de mitosis.
- 40 Resulta evidente a partir de la consideración de la bibliografía citada en lo que antecede que sigue existiendo la necesidad de identificar y desarrollar nuevos inhibidores de p38 MAP quinasa que tienen potencial terapéutico mejorado con respecto a los tratamientos actualmente disponibles. Los compuestos deseables son aquellos que exhiben un índice terapéutico superior ejerciendo, al menos, un efecto igualmente eficaz a los agentes previos pero, en uno o más aspectos, que sean menos tóxicos a la dosis terapéutica relevante. Un objetivo de la presente invención por lo tanto, consiste en proporcionar ese tipo de compuesto novedoso que inhibe la actividad enzimática
- 45
- 50
- 55
- 60

de p38 MAP quinasa, por ejemplo con ciertas especificidades de subtipo (particularmente alfa y gamma), así como también inhibiendo la actividad enzimática de tirosina quinasa dentro de la familia de Src (tal como p59-HCK y particularmente c-Src) teniendo de ese modo buenas propiedades antiinflamatorias, y adecuadas para utilizar en terapia. El compuesto de la invención exhibe actividad débil o no inhibitoria de Olaharsky quinastas, tal como GSK3 α y exhibe actividad débil o ninguna actividad inhibitoria de SYK quinasa lo cual contribuye con su perfil esperado de seguridad favorable.

Síntesis de la invención

De acuerdo con la invención, se proporciona un compuesto de fórmula (I):



10 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

El compuesto de fórmula (I) junto con sus sales farmacéuticamente aceptables es algunas veces denominado en la presente "el compuesto de la presente invención" o en forma similar.

Breve descripción de las figuras

15 La Figura 1 muestra un espectro de IR (micro ATR) de una muestra del compuesto de fórmula (I), sal maleato, Forma 2

Figure 2 muestra un patrón de XRD en polvo de una muestra del compuesto de fórmula (I), sal maleato, Forma 2

La Figura 3 muestra un patrón de XRD en polvo de una muestra del compuesto de fórmula (I), sal maleato, Forma 1

La Figura 4 muestra una curva de DSC de una muestra del compuesto de fórmula (I), sal maleato, Forma 2

La Figura 5 muestra una curva de TGA de una muestra del compuesto de fórmula (I), sal maleato, Forma 2

20 La Figura 6 muestra una superposición de DVS de una muestra del compuesto de fórmula (I), sal maleato, Forma 2

La Figura 7 muestra un gráfico cinético de DVS de una muestra del compuesto de fórmula (I), sal maleato, Forma 2

La Figura 8 muestra el resultado de los ensayos de estabilidad química sobre diversas composiciones que contienen el compuesto de la invención (en formas de base libre y sal maleato).

25 La Figura 9 muestra el efecto de los compuestos de ensayo sobre la Liberación de IL-8 inducida por rinovirus en células BEAS2B

Descripción detallada de la invención

30 El compuesto de fórmula (I) puede ser preparado o empleado en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable, incluyendo las sales de adición de ácido, no tóxicas, terapéuticamente activas que el compuesto de fórmula (I) es capaz de formar. Estas sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables pueden ser obtenidas convenientemente tratando la forma de base libre con dichos ácidos apropiados en un solvente adecuado o mezcla de solventes. Los ácidos apropiados comprenden, por ejemplo, ácidos inorgánicos tales como ácidos halhídricos, por ej. ácido clorhídrico o bromhídrico, sulfúrico, nítrico, ácidos fosfóricos y ácidos similares; o ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, ácido acético, propanoico, hidroxiacético, láctico, pirúvico, malónico, succínico, maleico,

fumárico, málico, tartárico, cítrico, metansulfónico, etansulfónico, bencensulfónico, *p*-toluensulfónico, ciclámico, salicílico, *p*-aminosalicílico, pamoico y ácidos similares. Preferentemente, el compuesto de fórmula (I) es empleado en la forma de su sal maleato. A la inversa dichas formas de sales pueden ser convertidas mediante tratamiento con una base apropiada en la forma de base libre.

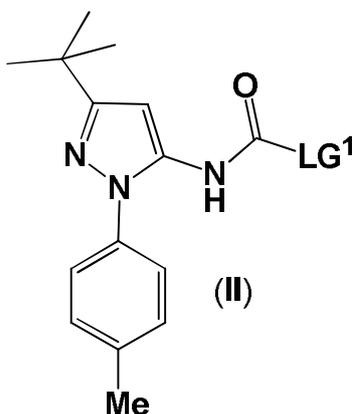
5 La invención proporcionada en la presente se extiende a todos los estereoisómeros del compuesto de fórmula (I). El término estereoisómeros como se emplea en la presente se refiere a moléculas isoméricas que tienen la misma fórmula molecular y secuencia de átomos unidos (constitución), pero que difieren solamente en las orientaciones tridimensionales de sus átomos en el espacio.

10 Tal como se ha empleado en la presente, la definición del compuesto de fórmula (I) tiene el propósito de incluir a todos los tautómeros de dichos compuestos, y solvatos de dichos compuestos (incluyendo los solvatos de las sales de dichos compuestos) a menos que el contexto indique específicamente lo contrario. Los ejemplos de solvatos incluyen a los hidratos.

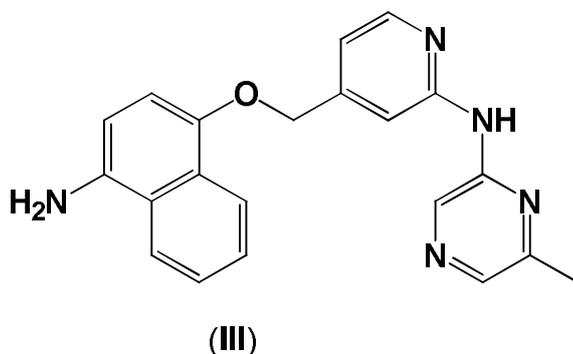
15 El compuesto descrito incluye un compuesto en el cual el átomo especificado es un isótopo natural o no natural. En una realización el isótopo es un isótopo estable. Por lo tanto el compuesto descrito incluye, por ejemplo, compuestos que contienen deuterio y similares.

La descripción se extiende además a todas las formas polimórficas de los compuestos definidos en la presente.

Un primer proceso para preparar un compuesto de fórmula (I) o un derivado protegido del mismo comprende hacer reaccionar un compuesto de fórmula (II)



20 o un derivado protegido del mismo
donde LG¹ representa un grupo saliente;
con un compuesto de fórmula (III)



o un derivado protegido del mismo;

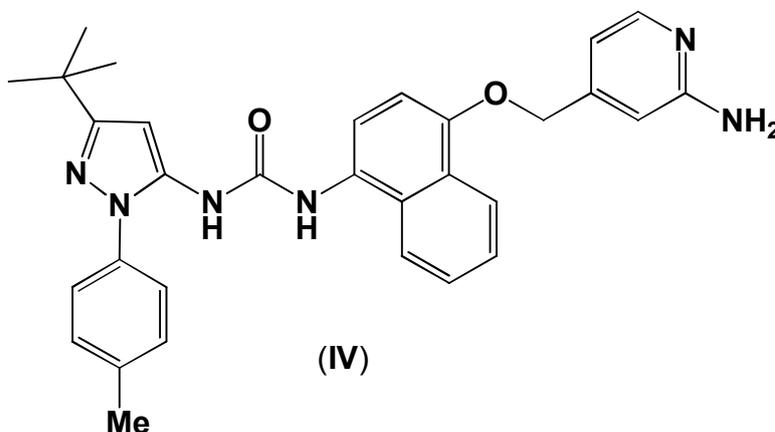
25 y opcionalmente desproteger el producto para proporcionar un compuesto de fórmula (I).

En los compuestos de fórmula (II), los ejemplos de grupos salientes LG incluyen halo (especialmente Cl, Br) y ariloxi-, especialmente fenoxi-.

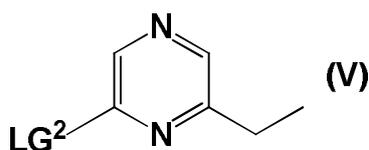
Los grupos protectores adecuados y medios para su remoción son descritos *infra*.

Las condiciones adecuadas para la reacción de los compuestos de fórmula (II) y (III) incluyen tratar una mezcla de (II) y (III) en un solvente adecuado tal como THF, DCM o acetato de isopropilo con trietilamina o base de Hunig y calentar la reacción hasta una temperatura tal como 40°C.

- 5 Un segundo proceso para preparar un compuesto de fórmula (I) comprende hacer reaccionar un compuesto de fórmula (IV)



o un derivado protegido del mismo,
con un compuesto de fórmula (V)



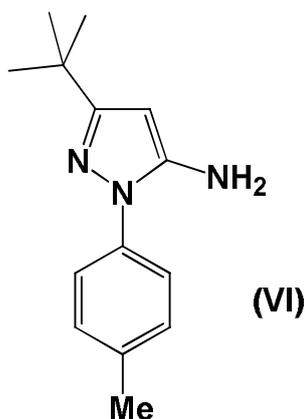
- 10 donde LG² representa un grupo saliente, tal como halo y especialmente Cl
o un derivado protegido del mismo
y opcionalmente desproteger el producto para dar un compuesto de fórmula (I).

Los grupos protectores adecuados y medios para su remoción son descritos *infra*.

- 15 Las condiciones adecuadas para la reacción de los compuestos de fórmula (IV) y (V) incluyen aquellas normalmente empleadas para la reacción de Buchwald, es decir, tratamiento de una solución de (IV) y (V) en un solvente tal como 1,4-dioxano con una fuente de paladio y ligando tal como Pd₂(dba)₃ y BINAP y una base tal como terc-butóxido de sodio o carbonato de cesio a temperatura elevada.

- 20 Los ligandos alternativos incluyen difenilfosfinoferroceno y trifenilfosfina; las fuentes de paladio alternativas incluyen acetato de paladio (II) y tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0); las bases alternativas incluyen bis(trimetilsilil)amida de litio y fosfato potásico; los solventes alternativos incluyen THF y tolueno. Para un rango más amplio de condiciones, ver Surry, D.S., Buchwald, S.L. (2008), "Biaryl Phosphane Ligands in Palladium-Catalyzed Amination", *Angew. Chem. Int. Ed.*, 47, 6338–6361, y sus referencias.

Los compuestos de fórmula (II) pueden ser preparados mediante reacción de un compuesto de fórmula (VI)

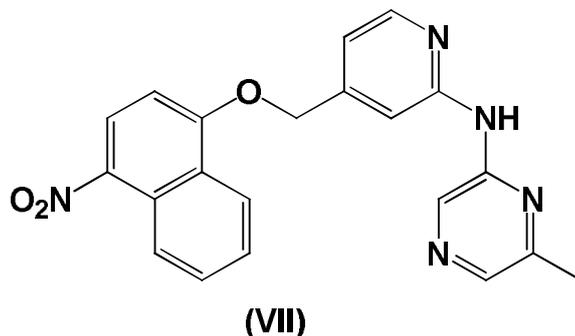


con un compuesto de fórmula $\text{LG}^1\text{C}(=\text{O})\text{LG}^3$ donde LG^3 representa un grupo saliente tal como halo y especialmente Cl.

- 5 Las condiciones adecuadas para la reacción de un compuesto de fórmula (VI) con un compuesto de fórmula $\text{LG}^1\text{C}(=\text{O})\text{LG}^3$ donde LG^1 es PhO y LG^3 es Cl comprenden el tratamiento de una mezcla de una solución de compuesto de fórmula (VI) en un solvente tal como acetato de isopropilo y una solución acuosa de una base inorgánica tal como carbonato sódico con cloroforniato de fenilo.

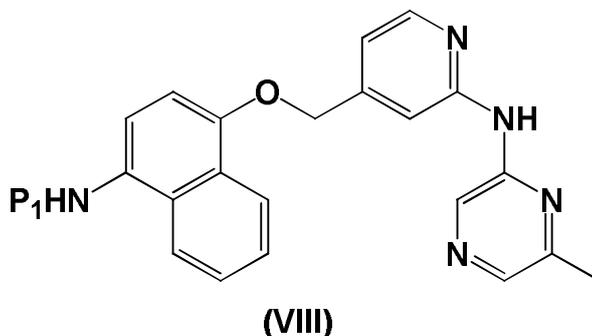
Los compuestos de fórmula (VI) son conocidos o se pueden preparar mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica.

- 10 Un primer proceso para preparar un compuesto de fórmula (III) comprende reducir un compuesto de fórmula (VII)



- 15 Las condiciones adecuadas para la reducción de un compuesto de fórmula (VII) incluyen tratamiento con gas hidrógeno sobre catalizador de platino en carbono. Esta reacción puede llevarse a cabo a presión elevada en un solvente tal como THF acidificado con ácido acético. Alternativamente puede llevarse a cabo en un solvente tal como DCM/MeOH bajo condiciones de flujo usando un hidrogenador H-Cube.

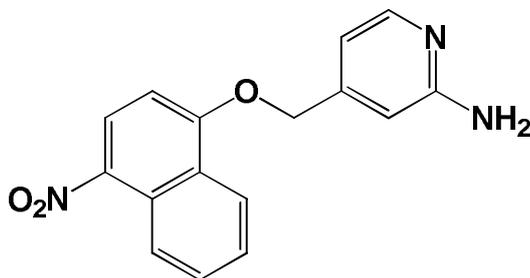
Un segundo proceso para preparar un compuesto de fórmula (III) comprende desproteger un compuesto de fórmula (VIII)



donde P_1 representa un grupo protector de amina.

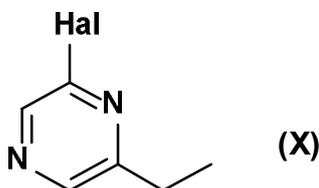
- 20 Los grupos protectores adecuados y medios para su remoción son descritos más adelante. Un grupo protector más adecuado es Boc el cual puede ser eliminado mediante tratamiento con ácido tal como TFA o HCl.

Un primer proceso para preparar un compuesto de fórmula (VII) comprende hacer reaccionar un compuesto de fórmula (IX)



(IX)

con un compuesto de fórmula (X)



(X)

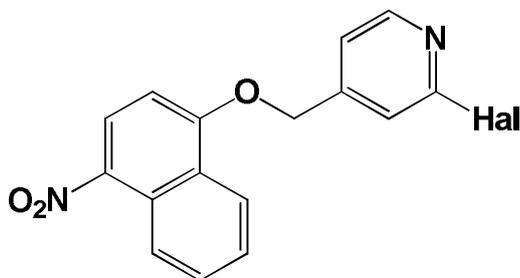
5

donde Hal representa halógeno, especialmente Cl.

Las condiciones adecuadas para la reacción de los compuestos de fórmula (IX) y (X) incluyen aquellas mencionadas con anterioridad para la reacción de los compuestos de fórmula (IV) y (V).

10

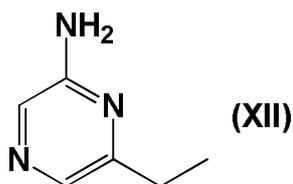
Un segundo proceso para preparar un compuesto de fórmula (VII) comprende hacer reaccionar un compuesto de fórmula (XI)



(XI)

donde Hal representa halógeno, especialmente Cl

con un compuesto de fórmula (XII)

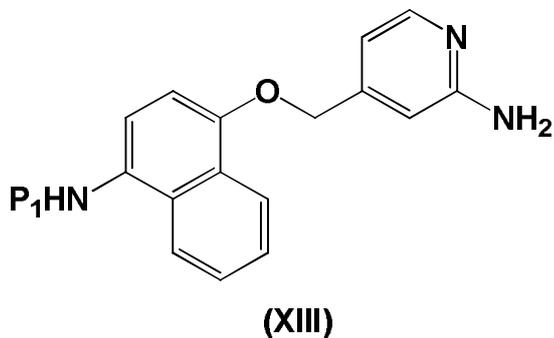


(XII)

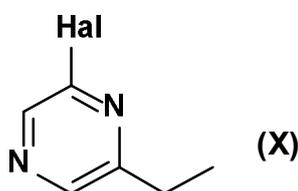
15

Las condiciones adecuadas para la reacción de los compuestos de fórmula (XI) y (XII) incluyen el tratamiento de una solución de (XI) y (XII) en un solvente tal como 1,4-dioxano con una fuente de paladio y ligando tal como $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ y BINAP y una base tal como terc-butóxido de sodio o carbonato de cesio a temperatura elevada.

Un primer proceso para preparar un compuesto de fórmula (VIII) comprende hacer reaccionar un compuesto de fórmula (XIII)



con un compuesto de fórmula (X)



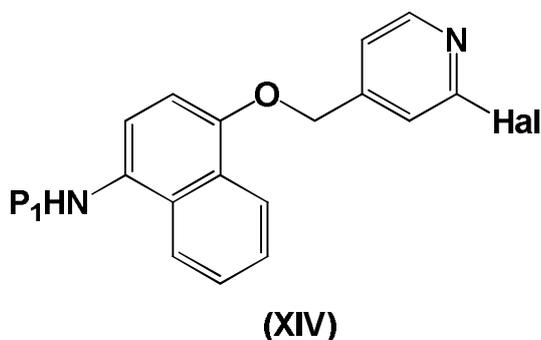
5

donde Hal representa halógeno, especialmente Cl.

Las condiciones adecuadas para la reacción de los compuestos de fórmula (XIII) y (X) son las mismas a las descritas con anterioridad para la reacción de los compuestos de fórmula (IX) y (X).

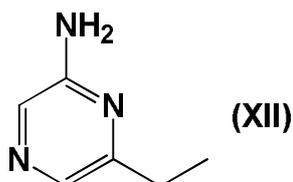
10

Un segundo proceso para preparar los compuestos de fórmula (VIII) comprende hacer reaccionar un compuesto de fórmula (XIV)



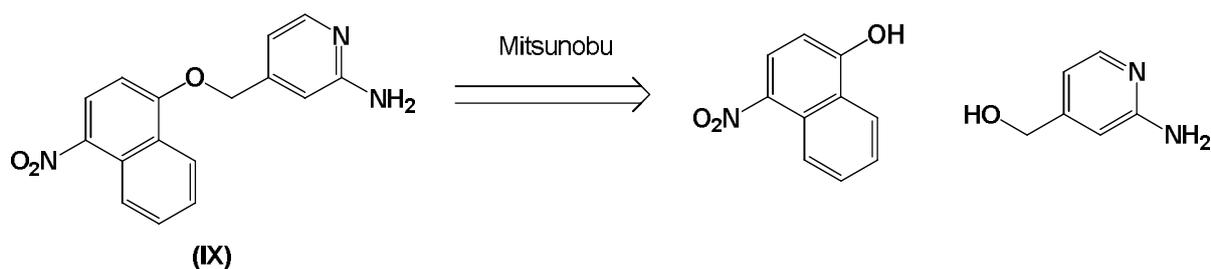
donde Hal representa halógeno, especialmente Cl

con un compuesto de fórmula (XII)



15 Las condiciones adecuadas para la reacción de los compuestos de fórmula (XIV) y (XII) son las mismas a las descritas con anterioridad para la reacción de los compuestos de fórmula (XI) y (XII).

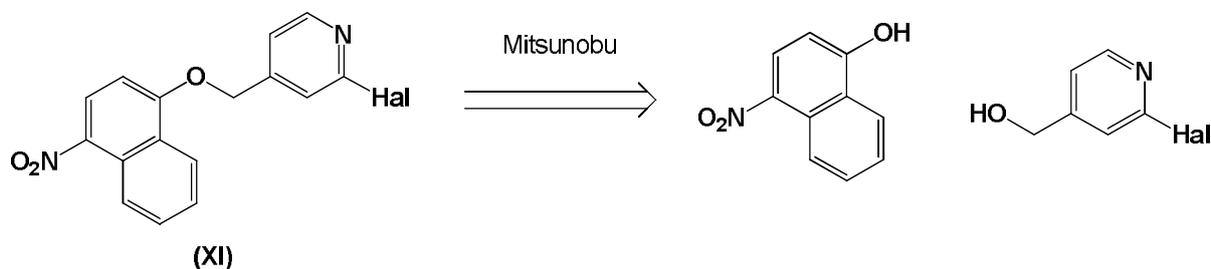
Los compuestos de fórmula (IX) pueden ser preparados como se muestra en el esquema a continuación:



Los reactivos de este proceso son compuestos conocidos. Las condiciones de Mitsunobu incluyen el tratamiento de una mezcla de un fenol y un alcohol con trifetilfosfina y diisopropilazodicarboxilato en un solvente tal como THF. Para un rango más amplio de condiciones, ver Swamy, K. C.; Kumar, N. N.; Balaraman, E.; Kumar, K. V. (2009). "Mitsunobu and Related Reactions: Advances and Applications" *Chemical Reviews* 109 (6): 2551–2651, y las referencias allí citadas.

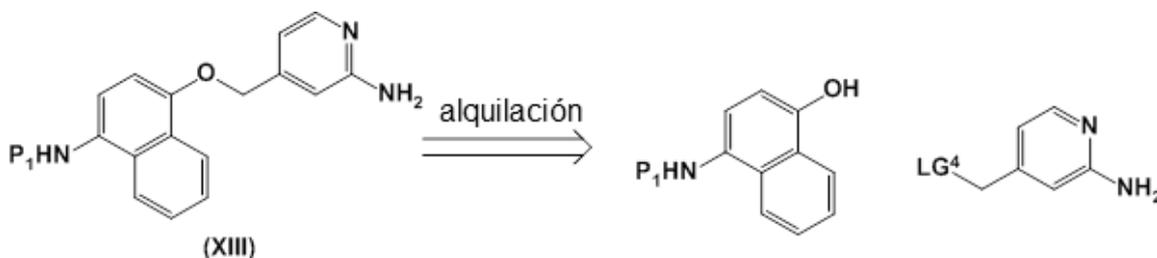
5

Los compuestos de fórmula (XI) pueden ser preparados como se muestra en el esquema que aparece a continuación:



10 Los reactivos de este proceso son compuestos conocidos. Las condiciones de Mitsunobu incluyen aquellas proporcionadas anteriormente.

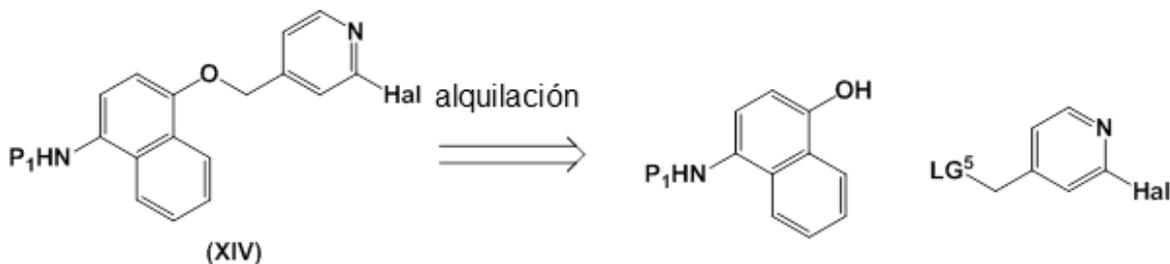
Los compuestos de fórmula (XIII) pueden ser preparados como se muestra en el esquema que aparece a continuación:



15 donde LG⁴ es un grupo saliente tal como halo, especialmente Cl.

Los reactivos de este proceso son compuestos conocidos. Las condiciones de alquilación incluyen el tratamiento de una mezcla de un fenol y un haluro de alquilo con una base tal como carbonato de cesio o de potasio en un solvente tal como acetonitrilo o DMF opcionalmente a temperatura elevada.

20 Los compuestos de fórmula (XIV) pueden ser preparados como se muestra en el esquema que aparece a continuación:



donde LG⁵ es un grupo saliente tal como aquellos mencionados con anterioridad para LG⁴.

Los reactivos de este proceso son compuestos conocidos. Las condiciones de alquilación incluyen aquellas proporcionadas con anterioridad.

5 Los compuestos de fórmula (IV), (V), (VI), (X) y (XII) son conocidos o pueden ser preparados mediante métodos conocidos por el experto en la técnica. Con respecto al compuesto de fórmula (IV) ver, por ejemplo, WO2010/067131, y específicamente la estructura del compuesto a la que se hace referencia como "Intermedio A". Con respecto al compuesto de fórmula (VI) ver, por ejemplo, WO00/043384, y específicamente el compuesto de fórmula LXVII.

10 Una forma no solvatada cristalina aparentemente estable de la forma de base libre del compuesto de la invención se puede obtener por recristalización de la solución (preferentemente temperatura caliente, por ej. de reflujo) en acetonitrilo. En el caso de que se produzca otra forma, esta forma puede ser obtenida suspendiendo en acetonitrilo.

Según lo señalado con anterioridad, la sal maleato es una forma del compuesto de la invención de particular interés. La sal maleato puede ser preparada tratando la forma de base libre del compuesto de la invención con ácido maleico en un solvente adecuado.

15 En un proceso preferido, la sal maleato es preparada tratando una solución del compuesto de la invención en 2-butanona con una solución de ácido maleico en 2-butanona. Se deja que se produzca la cristalización, la cual puede ser asistida con sembrado. La sal maleato como su polimorfo cristalino Forma 2 se prepara de este modo. La forma 2 polimorfo cristalino puede obtenerse además enfriando una solución caliente de la sal maleato del compuesto de la invención en 2-butanona, por ej. entre 50 °C y temperatura ambiente. Se deja que se produzca la cristalización, la cual puede ser asistida con sembrado.

20 El polimorfo cristalino Forma 2 de la sal maleato del compuesto de la invención se caracteriza por tener posiciones de los picos en un patrón de XRD en polvo a 4.2, 8.4, 8.7, 11.0, 11.5, 12.6, 14.4, 14.9, 16.0, 17.0, 17.4, 18.8, 19.5, 20.2, 21.7, 22.4, 23.8, 25.8 y 26.3 (± 0.2) grados en 2-theta (ver la Figura 2). Los picos (el doblete) en 8.4 y 8.7 (± 0.2) grados en 2-theta son especialmente característicos para el polimorfo cristalino Forma 2 puesto que los picos en estas posiciones están ausentes en el patrón de XRD del polimorfo cristalino de Forma 1.

El polimorfo cristalino Forma 2 tiene un elevado punto de fusión (aprox. 199 °C) con una morfología tipo placa.

Otra forma cristalina de la sal maleato del compuesto de la invención fue identificada luego de la recristalización a partir de THF el cual tiene propiedades menos favorables que aquellas de la Forma 2. Tiene una morfología tipo aguja y un punto de fusión inferior, aprox. 148 °C. Se hace referencia a esta forma cristalina como la Forma 1.

30 El polimorfo cristalino Forma 1 de la sal maleato del compuesto de la invención se caracteriza por tener posiciones de los picos en un patrón de XRD en polvo en 3.8, 6.3, 7.8, 9.3, 9.9, 10.7, 11.2, 12.7, 15.4, 16.5, 17.9, 19.2 y 19.6 (± 0.2) grados (véase la Figura 3). Los picos en 6.3, 7.8 y 9.9 (± 0.2) grados en 2-theta son especialmente característicos para el polimorfo cristalino de Forma 1 puesto que los picos en estas posiciones están ausentes en el patrón de XRD del polimorfo cristalino de Forma 2.

35 Por lo tanto el polimorfo de Forma 2 se caracteriza por tener un patrón de difracción de XRD que contiene 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 o más preferentemente 19 posiciones de los picos seleccionadas entre 4.2, 8.4, 8.7, 11.0, 11.5, 12.6, 14.4, 14.9, 16.0, 17.0, 17.4, 18.8, 19.5, 20.2, 21.7, 22.4, 23.8, 25.8 y 26.3 (± 0.2) grados en 2-theta que incluyen preferentemente picos en 8.4 y 8.7 (± 0.2) grados en 2-theta y que no contienen picos en 6.3, 7.8 y 9.9 (± 0.2) grados en 2-theta.

40 Con relación a las Figuras 2 y 3, se entenderá que pueden ocurrir variaciones de intensidad en los patrones de XRD debido a procesos los cuales influyen sobre las intensidades, tales como la historia de procesamiento de la muestra.

Las sales del compuesto de la invención las cuales son cristalinas pero de menor interés que la sal maleato incluyen las sales bromhidrato, fosfato, tartrato, fumarato y mesilato.

45 Pueden ser necesarios grupos protectores para proteger a los grupos químicamente sensibles durante una o más de las reacciones descritas con anterioridad, para asegurar que el proceso sea eficaz. Por lo tanto, si se desea o resulta necesario, los compuestos intermedios (incluyendo los compuestos de fórmula (II) a (V) como se resaltaron con anterioridad así como también los compuestos de fórmula (VI) a (XIV)) se pueden proteger mediante el uso de grupos protectores convencionales. Los grupos protectores y medios para su remoción son descritos en "Protective Groups in Organic Synthesis", por Theodora W. Greene y Peter G.M. Wuts, publicado por John Wiley & Sons Inc; 50 4ta Rev Ed., 2006, ISBN-10: 0471697540. Por lo tanto, los ejemplos de grupos protectores de amina incluyen Boc el cual puede ser eliminado por TFA y los ejemplos de grupos protectores de alcohol son THP el cual puede ser eliminado por HCl.

Los compuestos de fórmula (III) (junto con sus derivados en los cuales el grupo amino está protegido, tal como el compuesto de fórmula (VIII)) y el compuesto de fórmula (VII) son novedosos. Estos compuestos novedosos, junto

con sus sales (incluyendo las sales farmacéuticamente aceptables) son reivindicados como aspectos de la invención.

5 El compuesto de fórmula (I) es un inhibidor de p38 MAP quinasa (especialmente un inhibidor del subtipo alfa) y en un aspecto el compuesto de la presente invención es proporcionado para utilizar como un medicamento, por ej., en el tratamiento de enfermedades inflamatorias, por ejemplo EPOC y/o asma.

El compuesto de fórmula (I) se espera que sea potente *in vivo*.

10 En general, los compuestos de la técnica previa desarrollados hasta la fecha han sido destinados a la administración oral. Esta estrategia involucra optimizar el perfil farmacocinético de sustancias farmacológicas a fin de lograr una duración de acción adecuada. De este modo, se establece y se mantiene una concentración de fármaco suficientemente elevada entre las dosis para proporcionar un beneficio clínico sostenido. La consecuencia inevitable de este enfoque es que todos los tejidos del cuerpo, y especialmente el hígado y el intestino, son probablemente expuestos a concentraciones del fármaco supra-terapéuticamente activas, ya sea que sean afectados adversamente o no por la enfermedad que se está tratando.

15 Una estrategia alternativa consiste en diseñar paradigmas de tratamiento en los cuales el fármaco es dosificado directamente al órgano inflamado, es decir, para explotar la administración tópica. Si bien este enfoque no es adecuado para tratar todas las enfermedades inflamatorias crónicas, ha sido explotado en trastornos pulmonares, tales como asma y EPOC; en enfermedades cutáneas, por ejemplo contra la dermatitis atópica y la soriasis; para afecciones nasales, tipificadas por la rinitis alérgica; y en enfermedades gastrointestinales, tales como colitis ulcerativa, EII y enfermedad de Crohn y enfermedades inflamatorias del ojo, tal como uveítis.

20 En la terapia tópica, un modo en el cual se puede lograr eficacia es mediante el uso de un fármaco que tiene una duración de acción sostenida y es retenido en el órgano relevante, reduciendo de ese modo al mínimo el riesgo de toxicidad sistémica. Alternativamente, en algunos casos, se puede desarrollar una formulación que genera un “depósito” del fármaco activo el cual está disponible para sostener sus efectos deseados. El primer enfoque es ejemplificado por el fármaco anticolinérgico tiotropio (Spiriva). Este compuesto es administrado tópicamente al pulmón como un tratamiento para EPOC, y tiene una afinidad excepcionalmente elevada para su receptor objetivo dando como resultado una constante de disociación (off rate) muy lenta y por consiguiente exhibe una duración de acción sostenida.

30 En un aspecto de la descripción del compuesto de fórmula (I) es particularmente adecuado para la administración tópica, tal como la administración tópica a los pulmones, en particular para el tratamiento de la enfermedad respiratoria, por ejemplo enfermedades respiratorias crónicas tal como EPOC y/o asma.

En una realización, el compuesto de fórmula (I) es adecuado para sensibilizar a los pacientes al tratamiento con corticoides quienes se han vuelto refractarios a dichos regímenes de tratamiento.

35 El compuesto de fórmula (I) puede tener propiedades antivirales, por ejemplo la capacidad de prevenir la infección de células (tales como células epiteliales respiratorias) con un picornavirus, en particular un rinovirus, virus de la gripe o virus sincicial respiratorio.

Por lo tanto, se cree que los compuestos son agentes antivirales, en particular adecuados para la prevención, tratamiento o mejora de infecciones de picornavirus, tal como la infección de rinovirus, gripe o virus sincicial respiratorio.

40 En una realización el compuesto de fórmula (I) es capaz de reducir la inflamación inducida por la infección viral, tal como la infección por rinovirus y en particular infecciones virales que dan como resultado la liberación de citoquinas tal como IL-8, especialmente *in vivo*. Esta actividad puede ser analizada, por ejemplo, *in vitro* empleando un ensayo de IL-8 inducida por rinovirus según lo descrito en los Ejemplos de la presente invención.

45 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 empleado por los llamados serotipos de rinovirus de surco mayor para infectar células. Esta actividad puede ser medida, por ejemplo mediante un método descrito en los Ejemplos de la presente invención.

50 Se espera que las propiedades antes mencionadas tornen al compuesto de fórmula (I) particularmente adecuado para utilizar en el tratamiento (incluyendo profilaxis) de las exacerbaciones de enfermedades inflamatorias, en particular exacerbaciones virales, o en el tratamiento de las infecciones virales, en pacientes con una o más afecciones crónicas tales como insuficiencia cardíaca congestiva, EPOC, asma, diabetes, cáncer y/o en pacientes inmunosuprimidos, por ejemplo postrasplante de órgano. Dicho uso puede ser en combinación con agentes antivirales tales como zanamivir, oseltamivir (por ejemplo fosfato de oseltamivir) peramivir o laninamivir.

En general, el compuesto de fórmula (I) puede ser útil en el tratamiento de una o más afecciones que tienen un componente inflamatorio el cual, adecuadamente, puede ser tratado por terapia tópica o local.

En particular, el compuesto de fórmula (I) puede ser útil en el tratamiento de uno o más trastornos respiratorios incluyendo EPOC (incluyendo bronquitis crónica y enfisema), asma, asma pediátrico, fibrosis quística, sarcoidosis, fibrosis pulmonar idiopática, rinitis alérgica, rinitis y sinusitis, especialmente asma, o EPOC (incluyendo bronquitis crónica y enfisema).

- 5 Por lo tanto el compuesto de fórmula (I) puede ser útil en el tratamiento de la inflamación pulmonar (y sus síntomas) en sujetos que sufren de fibrosis quística.

10 El compuesto de fórmula (I) puede ser útil en el tratamiento de enfermedades o trastornos oculares incluyendo queratoconjuntivitis seca (sequedad ocular), conjuntivitis alérgica, conjuntivitis, retinopatía diabética, edema macular (incluyendo edema macular húmedo y edema macular seco), inflamación por catarata posoperativa o, particularmente, uveítis (incluyendo posterior, anterior y panuveítis).

El compuesto de fórmula (I) puede ser útil en el tratamiento de enfermedades o trastornos cutáneos que incluyen dermatitis alérgica, dermatitis por contacto, dermatitis atópica o soriasis.

El compuesto de fórmula (I) puede ser útil en el tratamiento de enfermedades o trastornos gastrointestinales que incluyen colitis ulcerativa, EII o enfermedad de Crohn.

- 15 El compuesto de fórmula (I) puede ser útil en el tratamiento de enfermedades o trastornos articulares que incluyen artritis reumatoidea u osteoartritis y en particular articulaciones inflamadas secundarias a dichas afecciones.

El compuesto de fórmula (I) puede ser útil en el tratamiento de cánceres que incluyen cáncer del estómago y en la inhibición del crecimiento y la metástasis de tumores que incluyen cánceres pulmonares tales como carcinoma de pulmón de células no pequeñas, carcinoma gástrico, carcinomas colorrectales y melanoma maligno.

- 20 Se espera también que el compuesto de fórmula (I) pueda ser útil en el tratamiento de ciertas otras afecciones que incluyen periodontitis, gingivitis y faringitis.

El Compuesto de fórmula (I) también puede resensibilizar la afección del paciente al tratamiento con un corticoide, cuando la afección del paciente se ha vuelto refractaria al mismo.

- 25 Por añadidura, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con la descripción opcionalmente en combinación con uno o más diluyentes o portadores farmacéuticamente aceptables.

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

- 30 La presente invención provee además un proceso para preparar ese tipo de composición farmacéutica (por ejemplo una composición farmacéutica para la administración parenteral, oral, tópica, por la mucosa o rectal), comprendiendo dicho proceso mezclar los ingredientes.

35 Según lo mencionado con anterioridad, dichas composiciones pueden ser preparadas, por ej., para la administración parenteral, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intra-articular o peri-articular, particularmente en la forma de soluciones o suspensiones líquidas; para la administración oral, particularmente en la forma de comprimidos o cápsulas o en la forma de soluciones o suspensiones líquidas; para la administración tópica, por ej. pulmonar o intranasal, particularmente en la forma de polvos, soluciones o suspensiones acuosas, gotas nasales o aerosoles acuosos o no acuosos, y para la administración transdérmica, por ej. parches, cremas, ungüentos; para la administración por mucosa por ej. a la mucosa bucal, sublingual o vaginal, y para la administración rectal por ej. en la forma de un supositorio, crema, ungüento o espuma.

- 40 Las composiciones pueden ser convenientemente administradas en formas de dosificación unitaria o de múltiples dosis y se pueden preparar mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica farmacéutica, por ejemplo según lo descrito en Remington's Pharmaceutical Sciences, ed. no. 17, Mack Publishing Company, Easton, PA., (1985). Las formulaciones para la administración parenteral pueden contener como excipientes agua estéril o solución salina, alquilenglicoles tales como propilenglicol, polialquilenglicoles tales como polietilenglicol, aceites de origen vegetal, naftalenos hidrogenados y similares. Las formulaciones para la administración nasal pueden ser sólidas y pueden contener excipientes, por ejemplo, lactosa o dextrano, o pueden ser soluciones o suspensiones acuosas u oleosas para utilizar en la forma de gotas nasales o pulverizaciones medidas. Para la administración bucal los excipientes típicos incluyen azúcares, estearato de calcio, estearato de magnesio, almidón pregelatinizado, y similares.

- 50 Las composiciones adecuadas para la administración oral pueden comprender uno o más portadores y/o excipientes fisiológicamente compatibles y pueden estar en forma sólida o líquida. Los comprimidos y las cápsulas pueden ser preparados con agentes aglutinantes, por ejemplo, jarabe, acacia, gelatina, sorbitol, tragacanto, o poli-vinilpirrolidona; agentes de relleno, tales como lactosa, sacarosa, almidón de maíz, fosfato de calcio, sorbitol, o glicina; lubricantes, tales como estearato de magnesio, talco, polietilenglicol, o sílice; y surfactantes, tales como lauril

sulfato sódico. Las composiciones líquidas pueden contener aditivos convencionales tales como agentes de suspensión, por ejemplo jarabe de sorbitol, metil celulosa, jarabe de azúcar, gelatina, carboximetil–celulosa, o grasas comestibles; agentes emulsionantes tales como lecitina o acacia; aceites vegetales tales como aceite de almendra, aceite de coco, aceite de hígado de bacalao, o aceite de maní; conservantes tales como hidroxianisol butilado (BHA) e hidroxitolueno butilado (BHT). Las composiciones líquidas pueden estar encapsuladas en, por ejemplo, gelatina para proporcionar una forma de dosificación unitaria.

Las formas de dosificación oral sólidas incluyen comprimidos, cápsulas de vaina dura de dos piezas y cápsulas de gelatina elástica blanda (SEG, por sus siglas en inglés).

Una formulación de vaina seca en general comprende entre aproximadamente 40% y 60% p/p de concentración de gelatina, aproximadamente una concentración del 20% al 30% de plastificante (tales como glicerina, sorbitol o propilenglicol) y aproximadamente una concentración del 30% al 40% de agua. Puede haber otros materiales tales como conservantes, tintes, agentes de la opacidad y saborizantes también. El material de relleno líquido comprende un fármaco sólido que ha sido 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 tensioactivos.

Adecuadamente, un compuesto de fórmula (I) es administrado tópicamente al pulmón, al ojo o al intestino. Por lo tanto nosotros proporcionamos de acuerdo con la invención una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la presente invención opcionalmente en combinación con uno o más diluyentes o portadores tópicamente aceptables.

La administración tópica al pulmón puede lograrse mediante el uso de una formulación en aerosol. Las formulaciones en aerosol en general comprenden el ingrediente activo suspendido o disuelto en un propulsor en aerosol adecuado, tal como un clorofluorocarbono (CFC) o un hidrofluorocarbono (HFC). Los propulsores de CFC adecuados incluyen tricloromonofluorometano (propulsor 11), diclorotetrafluorometano (propulsor 114), y diclorodifluorometano (propulsor 12). Los propulsores de HFC adecuados incluyen tetrafluoretano (HFC–134a) y heptafluorpropano (HFC–227). En general, el propulsor comprende 40%–99,5% por ej. 40%–90% en peso de la composición total para inhalación. La formulación puede comprender excipientes que incluyen cosolventes (por ej. etanol) y surfactantes (por ej. lecitina, trioleato de sorbitán y similares). Otros excipientes posibles incluyen polietilenglicol, polivinilpirrolidona, glicerina y excipientes similares. Las formulaciones en aerosol son envasadas en depósitos y se administra una dosis adecuada por medio de una válvula de medición (por ej. según lo provisto por Bepak, Valois o 3M o alternativamente por Aptar, Coster o Vari).

La administración tópica al pulmón también puede ser lograda por el uso de una formulación no presurizada tal como una solución o suspensión acuosa. Se pueden administrar por medio de un nebulizador por ej. uno que puede ser sostenido manualmente o portátil o para uso en el hogar o en el hospital (es decir, no portátil). La formulación puede comprender excipientes tales como agua, tampones, agentes reguladores de la tonicidad, agentes reguladores del pH, surfactantes y cosolventes. Las formulaciones líquidas en suspensión y en aerosol (ya sea presurizadas o no presurizadas) en general contendrán el compuesto de la invención en forma finamente dividida, por ejemplo con un D_{50} de 0,5–10 μm por ej. alrededor de 1–5 μm . Las distribuciones del tamaño de partícula pueden ser representadas usando valores D_{10} , D_{50} y D_{90} . El valor medio D_{50} de las distribuciones del tamaño de partícula se define como el tamaño de partícula en micrones que divide la distribución a la mitad. La medición derivada de difracción láser es descrita en forma más precisa como una distribución de volumen, y por consiguiente se hace referencia al valor D_{50} obtenido usando este procedimiento de manera más significativa como un valor Dv_{50} (mediana para una distribución de volumen). Tal como se utiliza en la presente, los valores Dv se refieren a distribuciones del tamaño de partícula medidas usando difracción láser. Similarmente, los valores D_{10} y D_{90} , usados en el contexto de la difracción láser, significan los valores Dv_{10} y Dv_{90} y hacen referencia al tamaño de partícula por lo cual 10% de la distribución se encuentra por debajo del valor D_{10} , y el 90% de la distribución se encuentra por debajo del valor D_{90} , respectivamente.

La administración tópica al pulmón también puede ser lograda mediante el uso de una formulación en polvo seco. Una formulación de polvo seco contendrá el compuesto de la descripción en forma finamente dividida, típicamente con un diámetro medio masal (MMAD, por sus siglas en inglés) de 1–10 μm o un D_{50} de 0,5–10 μm por ej. alrededor de 1–5 μm . Los polvos del compuesto de la invención en forma finamente dividida pueden ser preparados mediante un proceso de micronización o proceso de reducción de tamaño similar. La micronización puede llevarse a cabo usando un molino de chorro tal como aquellos fabricados por Hosokawa Alpine. La distribución del tamaño de partícula resultante se puede medir usando difracción láser (por ej. con un instrumento Malvern Mastersizer 2000S). La formulación en general contendrá un diluyente tópicamente aceptable tal como lactosa, glucosa o manitol (preferentemente lactosa), en general de tamaño de partícula comparativamente grande por ej. un diámetro medio masal (MMAD) de 50 μm o más, por ej. 100 μm o más o un D_{50} de 40–150 μm . Tal como se utiliza en la presente, el término “lactosa” se refiere a un componente que contiene lactosa, incluyendo monohidrato de α -lactosa, monohidrato de β -lactosa, α -lactosa anhidra, β -lactosa anhidra y lactosa amorfa. Los componentes de lactosa pueden ser procesados por micronización, tamizado, molienda, compresión, aglomeración o secado por atomización. Las formas comercialmente disponibles de lactosa en diversas formas son también abarcadas, por ejemplo los productos Lactohale[®] (lactosa de grado de inhalación; DFE Pharma), InhaLac[®]70 (lactosa tamizada para

inhalador de polvo seco; Meggle), Pharmatose® (DFE Pharma) y Respitose® (lactosa de grado de inhalación tamizada; DFE Pharma). En una realización, el componente de lactosa se selecciona del grupo que consiste en monohidrato de α -lactosa, α -lactosa anhidra y lactosa amorfa. Con preferencia, la lactosa es monohidrato de α -lactosa.

- 5 Las formulaciones de polvo seco también pueden contener otros excipientes. Por lo tanto, en una realización, una formulación de polvo seco de acuerdo con la presente descripción comprende magnesio o estearato de calcio. Dichas formulaciones pueden tener estabilidad química y/o física superior especialmente cuando dichas formulaciones también contienen lactosa.

10 Una formulación de polvo seco es típicamente administrada usando un dispositivo inhalador de polvo seco (DPI, por sus siglas en inglés). Los ejemplos de sistemas de administración de polvo seco incluyen SPINHALER®, DISKHALER®, TURBOHALER®, DISKUS®, SKYEHALER®, ACCUHALER® y CLICKHALER®. Otros ejemplos de sistemas de administración de polvo seco incluyen ECLIPSE, NEXT, ROTAHALER, HANDIHALER, AEROLISER, CYCLOHALER, BREEZHALER/NEOHALER, MONODOSE, FLOWCAPS, TWINCAPS, X-CAPS, TURBOSPIN, ELPENHALER, MIATHALER, TWISTHALER, NOVOLIZER, PRESSAIR, ELLIPTA, el inhalador de polvo seco
15 ORIEL, MICRODOSE, PULVINAL, EASYHALER, ULTRAHALER, TAIFUN, PULMOJET, OMNIHALER, GYROHALER, TAPER, CONIX, XCELOVAIR y PROHALER.

En una realización un compuesto de la presente invención es proporcionado como una formulación de polvo seco micronizada, por ejemplo que comprende lactosa de un grado adecuado.

20 Por consiguiente, como un aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención en forma particulada en combinación con lactosa particulada, comprendiendo opcionalmente dicha composición estearato de magnesio.

25 En una realización se provee un compuesto de la presente invención como una formulación de polvo seco micronizada, que comprende lactosa de un grado adecuado y estearato de magnesio, cargada en un dispositivo tal como DISKUS. Adecuadamente, dicho dispositivo es un dispositivo de múltiples dosis, por ejemplo la formulación es cargada en blísteres para usar en un dispositivo de múltiples dosis unitarias tal como DISKUS.

En otra realización se provee un compuesto de la presente invención como una formulación de polvo seco micronizada, por ejemplo que comprende lactosa de un grado adecuado, cargada en cápsulas de vaina dura para utilizar en un dispositivo de una sola dosis tal como AEROLISER.

30 En otra realización se provee un compuesto de la presente invención como una formulación de polvo seco micronizada, que comprende lactosa de un grado adecuado y estearato de magnesio, cargada en cápsulas de vaina dura para utilizar en un dispositivo de una sola dosis tal como AEROLISER.

35 En otra realización se provee un compuesto de la presente invención como un polvo fino para utilizar en una forma de dosificación para inhalación donde el polvo está en partículas finas con un D_{50} de 0,5–10 μm por ej. alrededor de 1–5 μm , que se han producido mediante un proceso de reducción de tamaño que no es micronización por molino de chorro por ej. secado por atomización, congelación por atomización, microfluidificación, homogenización a presión elevada, cristalización de fluidos supercríticos, cristalización ultrasónica o combinaciones de estos métodos, u otros métodos de formación de partículas adecuados conocidos en la técnica que se usan para producir partículas finas con un tamaño de partícula aerodinámico de 0,5–10 μm . La distribución del tamaño de partícula resultante se puede medir usando difracción láser (por ej. con un instrumento Malvern Mastersizer 2000S). Las partículas pueden
40 comprender el compuesto por sí solo o en combinación con otros excipientes adecuados que pueden ayudar al procesamiento. Las partículas finas resultantes pueden formar la formulación final para la administración a seres humanos o pueden opcionalmente ser formuladas adicionalmente con otros excipientes adecuados para facilitar la administración en una forma de dosificación aceptable.

45 El compuesto de la invención también puede ser administrado por vía rectal, por ejemplo en la forma de supositorios o enemas, que incluyen soluciones acuosas u oleosas así como también suspensiones y emulsiones y espumas. Dichas composiciones se preparan siguiendo procedimientos estándares, bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, pueden prepararse supositorios mezclando el ingrediente activo con una base de supositorio convencional tal como manteca de cacao u otros glicéridos. En este caso, el fármaco es mezclado con un excipiente adecuado que no irrita el cual es sólido a temperaturas normales pero es líquido a la temperatura rectal y por ende
50 se derretirá en el recto para liberar el fármaco. Dichos materiales son la manteca de cacao y los polietilenglicoles.

En general, para las composiciones destinadas a ser administradas tópicamente al ojo en la forma de gotas oculares o ungüentos oculares, la cantidad total del compuesto de la presente invención será de aproximadamente 0,0001 a menos de 4,0% (p/p).

55 Con preferencia, para la administración tópica ocular, las composiciones administradas de acuerdo con la presente invención serán formuladas como soluciones, suspensiones, emulsiones y otras formas de dosificación. Las soluciones acuosas son generalmente preferidas, en base a la facilidad de formulación, así como también a la capacidad del paciente de administrar dichas composiciones fácilmente por medio de la instilación de una a dos

gotas de las soluciones en los ojos afectados. Sin embargo, las composiciones también pueden ser suspensiones, geles viscosos o semiviscosos, u otros tipos de composiciones sólidas o semisólidas. Las suspensiones pueden ser preferidas para los compuestos que son escasamente solubles en agua.

5 Una alternativa para la administración al ojo es la inyección intravítrea de una solución o suspensión del compuesto de la presente invención. Por añadidura, el compuesto de la presente invención también puede ser introducido por medio de implantes oculares o insertos.

10 Las composiciones administradas de acuerdo con la presente invención también pueden incluir diversos otros ingredientes, incluyendo, entre otros, agentes de la tonicidad, tampones, surfactantes, polímero estabilizante, conservantes, cosolventes y agentes mejoradores de la viscosidad. Las composiciones farmacéuticas adecuadas de la presente invención incluyen un compuesto de la invención formulado con un agente de la tonicidad y un tampón. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden incluir opcionalmente además un surfactante y/o un agente paliativo y/o un polímero estabilizante.

15 Se pueden emplear diversos agentes de la tonicidad para regular la tonicidad de la composición, con preferencia a aquella de las lágrimas naturales para composiciones oftálmicas. Por ejemplo, se pueden agregar a la composición cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de magnesio, cloruro de calcio, azúcares simples tales como dextrosa, fructosa, galactosa, y/o simplemente polioles tales como los alcoholes de azúcar manitol, sorbitol, xilitol, lactitol, isomaltitol, maltitol, e hidrolizados de almidón hidrogenado para aproximarse a la tonicidad fisiológica. Dicha cantidad de agente de tonicidad variará, dependiendo del agente en particular que será agregado. En general, sin embargo, las composiciones tendrán un agente de tonicidad en una cantidad suficiente para hacer que la
20 composición final tenga una osmolalidad oftálmicamente aceptable (en general de aproximadamente 150–450 mOsm, con preferencia 250–350 mOsm y con máxima preferencia a aproximadamente 290 mOsm). En general, los agentes de la tonicidad de la invención estarán presentes en el rango de 2 a 4% p/p. Los agentes de la tonicidad preferidos de la invención incluyen los azúcares simples o los alcoholes de azúcar, tales como D-manitol.

25 Un sistema tampón apropiado (por ej. fosfato sódico, acetato de sodio, citrato de sodio, borato de sodio o ácido bórico) puede ser agregado a las composiciones para evitar oscilaciones del pH en condiciones de almacenamiento. La concentración particular variará, dependiendo del agente empleado. Sin embargo, preferentemente, el tampón será escogido para mantener un pH objetivo dentro del rango de pH 5 a 8, y más preferentemente hasta un pH objetivo de pH 5 a 7.

30 Pueden emplearse opcionalmente surfactantes para administrar concentraciones más elevadas de compuesto de la presente invención. Los surfactantes funcionan para solubilizar el compuesto y estabilizar la dispersión de coloides, tales como solución micelar, microemulsión, emulsión y suspensión. Los ejemplos de surfactantes los cuales pueden utilizarse opcionalmente incluyen polisorbato, poloxámero, estearato de poliosil 40, aceite de ricino de polioxilo, tiloxapol, Triton, y monolaurato de sorbitán. Los surfactantes preferidos a ser empleados en la invención tienen un equilibrio hidrófilo / lipófilo (HLB por sus siglas en inglés) en el rango de 12,4 a 13,2 y son aceptables para
35 el uso oftálmico, tales como TritonX114 y tiloxapol.

Los agentes adicionales que pueden ser agregados a las composiciones oftálmicas de los compuestos de la presente invención son demulcentes los cuales funcionan como un polímero estabilizante. El polímero estabilizante debería ser un ejemplo iónico/ cargado con preferencia para uso ocular tópico, más específicamente, un polímero que porta carga negativa en su superficie que puede exhibir un potencial zeta de (–)10–50 mV para estabilización
40 física y que sea capaz de realizar una dispersión en agua (es decir, que sea soluble en agua). Un polímero estabilizante preferido de la invención sería un polielectrolito, o polielectrolitos si más de uno, de la familia de los poliacrilatos entrecruzados, tales como carbómeros y Pemulen(R), específicamente Carbómero 974p (ácido poliacrílico), a 0,1–0,5% p/p.

45 Otros compuestos también pueden ser agregados a las composiciones oftálmicas del compuesto de la presente invención para aumentar la viscosidad del portador. Los ejemplos de agentes de aumento de la viscosidad incluyen, entre otros: polisacáridos, tales como ácido hialurónico y sus sales, sulfato de condroitina y sus sales, dextranos, diversos polímeros de la familia de las celulosas; polímeros de vinilo; y polímeros de ácido acrílico.

50 Los productos oftálmicos tópicos son típicamente envasados en forma de múltiples dosis. Por ende se necesitan conservantes para evitar la contaminación microbiana durante el uso. Los conservantes adecuados incluyen: cloruro de benzalconio, clorobutanol, bromuro de benzododecinio, metil parabeno, propil parabeno, feniletil alcohol, edentato disódico, ácido sórbico, poliuretano-1, u otros agentes conocidos por los expertos en la técnica. Dichos conservantes son típicamente empleados a un nivel de entre 0,001 y 1,0% p/v. Las composiciones de dosis unitaria de la presente invención serán estériles, pero típicamente no preservadas. Dichas composiciones, por lo tanto, en general no contienen conservantes.

55 El profesional médico, u otro experto, podrá determinar una dosificación adecuada para el compuesto de la presente invención, y por ende la cantidad del compuesto de la invención que debería incluirse en cualquier formulación farmacéutica particular (ya sea en forma de dosificación unitaria o en otro tipo de forma).

Un compuesto de fórmula (I) tiene actividad terapéutica. Por lo tanto, en un aspecto adicional, la presente invención proporciona un compuesto según lo descrito en la presente para utilizar en el tratamiento de una o más de las afecciones mencionadas con anterioridad.

5 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona el uso de un compuesto según lo descrito en la presente para la manufactura de un medicamento para el tratamiento de una o más de las afecciones mencionadas con anterioridad.

La palabra "tratamiento" tiene el propósito de abarcar la profilaxis así como también el tratamiento terapéutico. El tratamiento de afecciones o trastornos también abarca el tratamiento de sus exacerbaciones.

10 Un compuesto de la presente invención también puede ser administrado en combinación con uno o más ingredientes activos diferentes por ej. ingredientes activos adecuados para el tratamiento de las afecciones mencionadas con anterioridad.

15 Por ejemplo, las posibles combinaciones para el tratamiento de los trastornos respiratorios incluyen combinaciones con esteroides (por ej. budesonide, dipropionato de beclometasona, propionato de fluticasona, furoato de mometasona, furoato de fluticasona, ciclesonide), agonistas beta (por ej. terbutalina, salbutamol, salmeterol, formoterol, vilanterol, olodaterol, indacaterol, reproterol, fenoterol), xantinas (por ej. teofilina), anticolinérgicos o antagonistas muscarínicos (por ej. ipratropio, tiotropio, aclidinio, umeclidinio o glicopirronio por ejemplo como la sal bromuro), inhibidores de PI3 quinasa y agentes antivirales (por ej. zanamivir, oseltamivir, por ejemplo como el fosfato, peramivir y laninamivir).

20 En una realización se proporciona un compuesto de la invención para utilizar como un medicamento que será administrado en combinación con uno o más ingredientes activos adicionales por ej. seleccionados entre corticoides, agonistas beta, xantinas, antagonistas muscarínicos e inhibidores de PI3 quinasa. Adecuadamente el agonista beta es un agonista beta2.

En una realización el compuesto de la descripción es administrado por inhalación y se administra un corticoide oralmente o por inhalación ya sea en combinación o por separado.

25 En una realización el compuesto de la descripción es administrado por inhalación y se administra un agonista beta2 oralmente o por inhalación ya sea en combinación o por separado.

En una realización el compuesto de la descripción es administrado por inhalación y un antagonista muscarínico es administrado oralmente o por inhalación ya sea en combinación o por separado.

30 En una realización el compuesto de la descripción es administrado por inhalación ya sea en combinación o por separado con uno o más de un corticoide, un agonista beta2 y un antagonista muscarínico, todos administrados ya sea por vía oral o por inhalación.

Adicionalmente, para el tratamiento de los trastornos gastrointestinales (tales como enfermedad de Crohn o colitis ulcerativa), las posibles combinaciones incluyen combinaciones con, por ejemplo, uno o más agentes seleccionados de la lista que comprende:

- 35 – ácido 5-aminosalicílico, o un profármaco del mismo (tal como sulfasalazina, olsalazina o bisalazida);
- corticoides (por ej. prednisolona, metilprednisolona, o budesonide);
- inmunosupresores (por ej. ciclosporina, tacrolimus, metotrexato, azatioprina o 6-mercaptopurina);
- anticuerpos anti-TNF α (por ej. infliximab, adalimumab, certolizumab pegol o golimumab);
- 40 – anticuerpos anti-IL12/IL23 (por ej. ustekinumab) o inhibidores de IL12/IL23 de molécula pequeña (por ej., apilimod);
- anticuerpos anti- α 4 β 7 (por ej. vedolizumab);
- bloqueadores de MAdCAM-1 (por ej. PF-00547659);
- anticuerpos contra α 4-integrina de molécula de adhesión celular (por ej. natalizumab);
- anticuerpos contra la subunidad α del receptor de IL2 (por ej. daclizumab o basiliximab);
- 45 – inhibidores de JAK3 (por ej. tofacitinib o R348);
- inhibidores de Syk y profármacos de los mismos (por ej. fostamatinib y R-406);
- Inhibidores de fosfodiesterasa-4 (por ej. tetomilast);

- HMPL-004;
- probióticos;
- Dersalazina;
- semapimod/CPSI-2364; y

5 – inhibidores de la proteína quinasa C (por ej. AEB-071).

Para el tratamiento de los trastornos oculares (tales como queratoconjuntivitis seca o uveítis), las posibles combinaciones incluyen combinaciones con, por ejemplo, uno o más agentes seleccionados de la lista que comprende:

- 10 – corticoides (por ej. dexametasona, prednisolona, acetónido de triamcinolona, difluprednato o acetónido de fluocinolona);
- inmunosupresores (por ej. ciclosporina, voclosporina, azatioprina, metotrexato, micofenolato de mofetilo o tacrolimus);
- anticuerpos anti-TNF α (por ej. infliximab, adalimumab, certolizumab pegol, ESBA-105 o golimumab);
- anticuerpos anti-IL-17A (por ej. secukinumab);
- 15 – inhibidores de mTOR (por ej. sirolimus);
- VGX-1027;
- inhibidores de JAK3 (por ej. tofacitinib o R348); y
- inhibidores de proteína quinasa C (por ej. AEB-071).

20 Por ende, otro aspecto de la invención provee un compuesto de fórmula (I) en combinación con uno o más ingredientes activos adicionales, por ejemplo uno o más ingredientes activos descritos anteriormente.

Similarmente, otro aspecto de la invención provee un producto combinado que comprende:

- (A) un compuesto de la presente invención; y
- (B) uno o más agentes terapéuticos diferentes,

25 donde cada uno de los componentes (A) y (B) es formulado en mezcla con un adyuvante, diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.

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

30 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 adyuvante, diluyente o portador farmacéuticamente aceptable (formulación a la cual se hace referencia más adelante en la presente invención como una "preparación combinada").

También abarca un kit de partes que comprende componentes:

- (i) una formulación farmacéutica que incluye un compuesto de la presente invención en mezcla con un adyuvante, diluyente o portador farmacéuticamente aceptable; y
- 35 (ii) una formulación farmacéutica que incluye uno o más agentes terapéuticos diferentes, en mezcla con un adyuvante, diluyente o portador farmacéuticamente aceptable,

dichos componentes (i) y (ii) son provistos, cada uno, en una forma que es adecuada para la administración en conjunto con el otro.

40 El componente (i) del kit de partes es por ende el componente (A) antes mencionado en mezcla con un adyuvante, diluyente o portador farmacéuticamente aceptable. Similarmente, el componente (ii) es el componente (B) antes mencionado en mezcla con un adyuvante, diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.

El uno o más agentes terapéuticos diferentes (es decir el componente (B) antes mencionado) puede ser, por ejemplo, cualquiera de los agentes mencionados anteriormente en relación con el tratamiento de trastornos respiratorios, gastrointestinales y oculares.

Si el componente (B) es más de un agente terapéutico adicional, estos agentes terapéuticos adicionales pueden ser formulados entre sí o pueden ser formulados con el componente (A) o pueden ser formulados por separado.

En una realización el componente (B) es un agente terapéutico diferente. En otra realización el componente (B) es dos agentes terapéuticos diferentes.

5 El producto combinado (ya sea una preparación combinada o kit de partes) de este aspecto de la invención puede ser utilizado en el tratamiento o prevención de una enfermedad inflamatoria por ej. las enfermedades inflamatorias mencionadas con anterioridad, tales como:

10 – trastornos respiratorios que incluyen EPOC (incluyendo bronquitis crónica y enfisema), asma, asma pediátrico, fibrosis quística, sarcoidosis, fibrosis pulmonar idiopática, rinitis alérgica, rinitis y sinusitis, especialmente asma, o EPOC (incluyendo bronquitis crónica y enfisema);

15 – enfermedades o trastornos oculares que incluyen conjuntivitis alérgica, conjuntivitis, queratoconjuntivitis seca (sequedad ocular), glaucoma, retinopatía diabética, edema macular (incluyendo edema macular diabético), oclusión de la vena central de la retina (OVCR), degeneración macular relacionada con la edad seca y/o húmeda (DMAE), inflamación por catarata posoperativa o, particularmente, uveítis (incluyendo uveítis posterior, anterior y panuveítis), rechazo de trasplante de células limbares e injerto de córnea;

– enfermedades o trastornos de la piel que incluyen dermatitis alérgica, dermatitis por contacto, dermatitis atópica o soriasis; y

20 – enfermedades o trastornos gastrointestinales que incluyen enteropatía sensible al gluten (enfermedad celíaca), esofagitis eosinófila, enfermedad intestinal de injerto versus huésped o, particularmente, colitis ulcerativa o enfermedad de Crohn.

25 Los aspectos de la invención descritos en la presente invención (por ej. el compuesto, las combinaciones, los métodos y los usos mencionados con anterioridad) pueden tener la ventaja de que, en el tratamiento de las afecciones descritas en la presente invención, pueden ser más convenientes para el médico y/o para el paciente que, pueden ser más eficaces que, menos tóxicos que, pueden ser de acción más prolongada que, pueden tener mejor selectividad con respecto a, pueden tener un rango más amplio de actividad que, pueden ser más potentes que, pueden producir menos cantidad de efectos secundarios que, pueden tener un mejor perfil farmacocinético y/o farmacodinámico que, pueden tener propiedades más adecuadas en estado sólido que, pueden tener mejor estabilidad que, o pueden tener otras propiedades farmacológicas útiles con respecto a, compuestos, combinaciones, métodos (tratamientos) o usos similares conocidos en el estado de la técnica anterior para utilizar en el tratamiento de dichas afecciones o pueden ser más ventajosos de algún otro modo.

30 Con relación a los compuestos del estado de la técnica anterior, en al menos algunas realizaciones, el compuesto de fórmula (I) se espera que tenga uno o más de los siguientes atributos:

35 – exhibe propiedades que son particularmente adecuadas para la administración tópica/ local (por ej. luego de la administración tópica/ local, la generación de altas concentraciones en tejidos objetivo pero bajas concentraciones en plasma o sistémicas del compuesto de fórmula (I) y/o rápida eliminación del compuesto de fórmula (I) del plasma o de la circulación sistémica);

– tiene un riesgo reducido de exposición extravascular luego de la administración intravenosa (por ej. debido a un bajo volumen de distribución para el compuesto de fórmula (I));

40 – exhibe potencia superior con respecto a quinasas seleccionadas y/o un panel de quinasas, tales como p38 MAPK α , p38 MAPK γ , Src y p59-HCK;

– exhibe baja actividad inhibitoria o ninguna contra Olaharsky quinasas, particularmente GSK3 α ;

– exhibe baja actividad inhibitoria o ninguna contra Syk quinasa;

– exhibe inducción de β -catenina reducida y/o inhibición de la mitosis en células;

45 – no exhibe inhibición dependiente del tiempo o menor inhibición dependiente del tiempo de miembros de la superfamilia del citocromo P450; y/o

– produce menos metabolitos problemáticos (por ej. menos tóxicos), por ej. después de la administración a un paciente.

SECCIÓN EXPERIMENTAL

50 Las abreviaturas utilizadas en la presente invención son definidas a continuación (**Tabla 1**). Cualquier abreviatura no definida tiene el propósito de transmitir su significado generalmente aceptado.

Tabla 1: Abreviaturas

AcOH	ácido acético glacial
Ac ₂ O	anhídrido acético
Ac	Acuoso
b	Amplio
BEH	híbrido con puente de etileno
BINAP	1,1'-binaftil-2,2'-diamina
Boc	<i>tert</i> -butoxicarbonilo
CSH	híbrido con superficie cargada
d	Doblete
Δ	desviación química
DCM	diclorometano
DIAD	azodicarboxilato de diisopropilo
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMSO	sulfóxido de dimetilo
(ES ⁺)	ionización por electrospray, modo positivo
(ES ⁻)	ionización por electrospray, modo negativo
Et	Etilo
EtOAc	acetato de etilo
EtOH	Etanol
h	hora(s)
HATU	hexafluorofosfato de 3-óxido de 1-[bis(dimetilamino)metilen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio
base de Hunig	<i>N,N</i> -diisopropiletilamina
IPA	alcohol isopropílico
ⁱ PrOAc	acetato de isopropilo
m	multiplete
(M+H) ⁺	ion molecular protonado
(M-H) ⁻	ion molecular desprotonado
Me	Metilo
MeCN	acetonitrilo
MeOH	Metanol
MHz	megahertz
min	minuto(s)
m/z	relación masa-a-carga
RMN	resonancia magnética nuclear (espectroscopia)
Pd ₂ (dba) ₃	tris(dibencilidenacetona)dipaladio(0)

ES 2 677 595 T3

Ph	Fenilo
q	Cuartete
TA	temperatura ambiente
HPLC	cromatografía de líquidos de alto rendimiento
s	Singlete
Sat	Saturado
SCX	intercambio de cationes soportados por sólido (resina)
t	Triplete
^t Bu	<i>terc</i> -butilo
THF	tetrahidrofurano
TFA	ácido trifluoroacético
UV	ultra-violeta
AKT	homólogo 1 del oncogén viral de timona murino v-akt
ATP	adenosina-5'-trifosfato
BALF	fluido de lavado bronquioalveolar
BSA	albúmina de suero bovino
EPOC	enfermedad pulmonar obstructiva crónica
CXCL1	ligando 1 de quimioquina (motivo C-X-C)
COX2	subunidad II de oxidasa c del citocromo
DSC	calorimetría diferencial de barrido
DSS	dextrano sulfato sódico
DTT	Ditiotreitol
células d-U937	células U-937 PMA diferenciadas
DVS	absorción dinámica de vapores
dsRNA	ARN de doble hebra
ELISA	ensayo de inmunoabsorbancia vinculado con enzimas
FACS	clasificación celular activada por fluorescencia
FBS	suero bovino fetal
FRET	transferencia de energía por resonancia de fluorescencia
GM-CSF	CSF2: factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos
GSK3 α	glucógeno sintasa quinasa 3 α
GSK3 β	glucógeno sintasa quinasa 3 β
HBSS	solución salina equilibrada de Hank
HCK	quinasa de células hemopoyéticas
HRV	rinovirus humano
EII	enfermedad intestinal inflamatoria

ES 2 677 595 T3

IC50	50% concentración Inhibitoria
ICAM-1	molécula 1 de adhesión inter-celular
IFN	Interferón
IL-2	interleuquina 2
IL-8	interleuquina 8
JNK	quinasa N-terminal c-Jun
KC	quimioatrayente de queratinocitos
LPMC	célula mononuclear de la lámina propia
LPS	lipopolisacárido
MAPK	proteína quinasa activada por mitógeno
MAPKAP-K2	proteína quinasa activada por mitógeno –proteína quinasa activada –2
MKK4	proteína quinasa activada por mitógeno quinasa 4
MKK6	proteína quinasa activada por mitógeno quinasa 6
MOI	multiplicidad de infección
MTT	bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
OD	densidad óptica
PBMC	célula mononuclear de sangre periférica
PBS	solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco
PHA	fitohemaglutinina
PI3	fosfoinositida 3 quinasa
PMA	forbol 12-miristato 13-acetato
REC50	concentración eficaz 50% relativa
ARN	ácido ribonucleico
RNAi	interferencia de ARN
RSV	virus sincicial respiratorio
SDS	dodecilsulfato sódico
SMS	sistemas de mediciones de superficie
SRC	homólogo del oncogén de v-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral (aviar)
Syk	tirosina quinasa del bazo
TCID50	50% de la dosis infecciosa de cultivo tisular
TGA	análisis termogravimétrico
TLR3	receptor 3 tipo toll
TNBS	ácido 2,4,6-trinitrobencensulfónico
TNF α	factor alfa de necrosis tumoral
URTI	infección del tracto respiratorio superior
XPD	difracción de rayos X de polvo

XRD difracción de rayos X

Ejemplos Químicos

Procedimientos Generales

5 Todos los materiales de partida y los solventes fueron obtenidos ya sea de fuentes comerciales o fueron preparados de acuerdo con la bibliografía citada. A menos que se indique lo contrario, todas las reacciones se agitaron. Las soluciones orgánicas se secaron de la manera habitual sobre sulfato magnésico anhidro. Las hidrogenaciones se llevaron a cabo en un reactor de flujo Thales H-cube bajo las condiciones indicadas.

10 Se realizó cromatografía en columna sobre cartuchos de sílice preempacada (230–400 de malla, 40–63 μm) usando la cantidad indicada. SCX se adquirió en Supelco y se trató con ácido clorhídrico 1M antes del uso. A menos que se indique lo contrario, la mezcla de reacción a ser purificada fue primero diluida con MeOH y se acidificó con unas pocas gotas de AcOH. Esta solución se cargó directamente sobre el SCX y se lavó con MeOH. Luego, el material deseado fue eluido lavando con NH_3 0.7 M en MeOH.

Cromatografía de Líquidos de Alto Rendimiento en Fase Inversa Preparativa

15 Se llevó a cabo usando detección UV a 215 y 254 nm con una columna Waters X-Select Prep-C18, 5 μm , 19x50 mm eluyendo con un gradiente de H_2O -MeCN que contenía ácido fórmico 0,1% v/v durante 10 min, o una columna Waters X-Bridge Prep-C18, 5 μm , 19x50 mm eluyendo con un gradiente de H_2O -MeCN que contenía bicarbonato amónico al 0,1% durante 10 min.

Métodos Analíticos

Cromatografía de Líquidos de Alto Rendimiento en Fase Inversa

20 **Método 1:** Waters XSelect CSH C18 2.5 μm (4.6 x 30 mm) a 40 °C; índice de flujo 2,5–4,5 mL min^{-1} eluido con un gradiente de H_2O -MeCN que contenía ácido fórmico 0,1% v/v durante 4 min empleando detección UV a 254 nm. Información del gradiente: 0–3,00 min, subió desde 95% H_2O -5% MeCN hasta 5% H_2O -95% MeCN; 3,00–3,01 min, se mantuvo a 5% H_2O -95% MeCN, índice de flujo aumentó hasta 4,5 mL min^{-1} ; 3,01–3,50 min, se mantuvo a 5% H_2O -95% MeCN; 3,50–3,60 min, volvió a 95% H_2O -5% MeCN, índice de flujo disminuyó hasta 3,50 mL min^{-1} ; 3,60–3,90 min, se mantuvo a 95% H_2O -5% MeCN; 3,90–4,00 min, se mantuvo a 95% H_2O -5% MeCN, índice de flujo se redujo a 2,5 mL min^{-1} .

30 **Método 2:** Waters XBridge BEH C18, 2,5 μm (4,6 x 30 mm) a 40 °C; índice de flujo 2,5–4,5 mL min^{-1} eluido con un gradiente de H_2O -MeCN que contenía bicarbonato de amonio 10 mM durante 4 min empleando detección UV a 254 nm. Información del gradiente: 0–3,00 min, subió desde 95% H_2O -5% de MeCN hasta 5% de H_2O -95% de MeCN; 3,00–3,01 min, se mantuvo a 5% de H_2O -95% de MeCN, índice de flujo aumentó hasta 4,5 mL min^{-1} ; 3,01–3,50 min, se mantuvo a 5% de H_2O -95% de MeCN; 3,50–3,60 min, volvió a 95% de H_2O -5% de MeCN, índice de flujo disminuyó hasta 3,50 mL min^{-1} ; 3,60–3,90 min, se mantuvo a 95% de H_2O -5% de MeCN; 3,90–4,00 min, se mantuvo a 95% de H_2O -5% de MeCN, índice de flujo disminuyó hasta 2,5 mL min^{-1} .

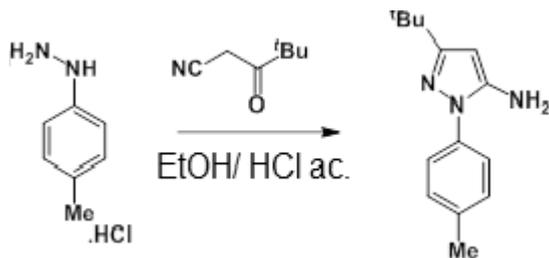
Espectroscopía de ^1H RMN

35 Los espectros de ^1H RMN fueron adquiridos en un espectrómetro Bruker Avance III a 400 MHz usando solvente no deuterado residual como referencia y a menos que se especifique lo contrario se corrieron en $\text{DMSO}-d_6$.

Ejemplos

Ejemplo 1A: 1-(3-(*terc-butil*)-1-(*p*-tolil)-1H-pirazol-5-il)-3-(4-((2-((6-etilpirazin-2-il)amino)piridin-4-il)metoxi)naftalen-1-il)urea

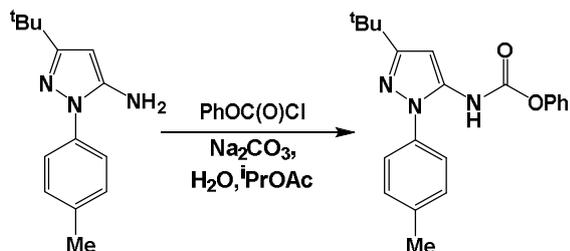
Compuesto Intermedio A: 3-*terc-butil*-1-*p*-tolil-1H-pirazol-5-amina



A una solución agitada de clorhidrato de *p*-tolilhidrazina (100 g, 630 mmol) en EtOH (1251 mL) se le agregó 4,4-dimetil-3-oxopentanitrilo (88 g, 699 mmol) y HCl (62,5 mL, 750 mmol). La mezcla resultante se agitó a reflujo durante toda la noche. La mezcla de reacción se enfrió hasta temperatura ambiente y se concentró *in vacuo* hasta

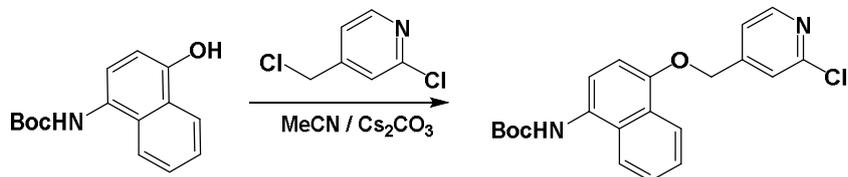
casi 1/3 del volumen original. La mezcla de reacción luego se enfrió en un baño con hielo y se llevó a cerca de pH 8–9 con NaOH ac. 6M. La mezcla de reacción se extrajo con éter dietílico (500 mL) y la fase orgánica se lavó con agua (2 x 300 mL) antes de secarse sobre sulfato de magnesio y se concentró *in vacuo* para obtener un sólido naranja. El sólido se suspendió en iso-hexano y se agitó a reflujo durante 2,5 h antes de enfriarse y filtrarse mientras aún se encontraba caliente para obtener el producto del subtítulo 3-*terc-butil*-1-*p*-tolil-1H-pirazol-5-amina como un sólido de color marrón claro (76,5 g, 52%); R^t 1,31 min (Método 1); m/z 230 (M+H)⁺ (ES⁺); ¹H RMN δ : 1,20 (9H, s), 2,32 (3H, s), 5,10 (2H, br s), 5,35 (1H, s), 7,24 (2H, d), 7,42 (2H, m).

Compuesto Intermedio B: (3-(*terc-butil*)-1-(*p*-tolil)-1H-pirazol-5-il)carbamato de fenilo



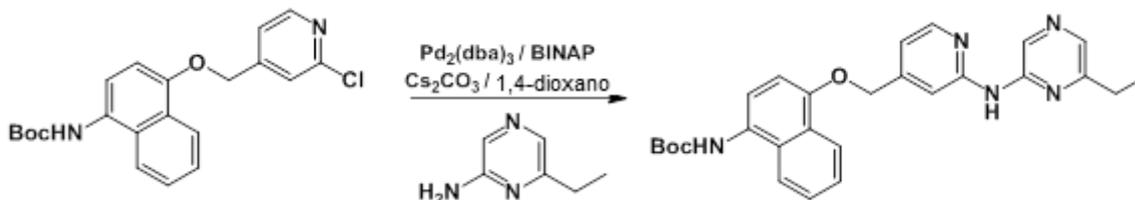
Una solución de 3-(*terc-butil*)-1-(*p*-tolil)-1H-pirazol-5-amina (Compuesto intermedio A) (20 g, 87,0 mmol) en acetato de isopropilo (240 mL) se agregó a una solución agitada de carbonato sódico (11,3 g, 106 mmol) en agua (80 mL). Después de 10 min se agregó cloroformiato de fenilo (12,1 mL, 96 mmol) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche. La mezcla de reacción se diluyó con agua (160 mL), las capas se separaron y los orgánicos se lavaron con agua (2 x 80 mL), salmuera (80 mL), se secaron (MgSO₄) y se concentraron *in vacuo*. El sólido amarillo resultante se suspendió en 10% éter/isohehexano (320 mL) y se agitó hasta que se obtuvo una suspensión uniforme. El sólido se recolectó por filtración y se lavó con isohehexano para obtener el compuesto del subtítulo (3-(*terc-butil*)-1-(*p*-tolil)-1H-pirazol-5-il)carbamato de fenilo como un polvo blanco (27,3 g, 88%); R^t 2,65 min (Método 1); m/z 350 (M+H)⁺ (ES⁺); ¹H RMN δ : 1,29 (9H, s), 2,37 (3H, s), 6,35 (1H, s), 7,10–7,23 (3H, m superpuesto), 7,33–7,46 (6H, m superpuesto), 9,99 (1H, s).

Compuesto intermedio C: (4-((2-cloropiridin-4-il)metoxi)naftalen-1-il)carbamato de *terc-butilo*



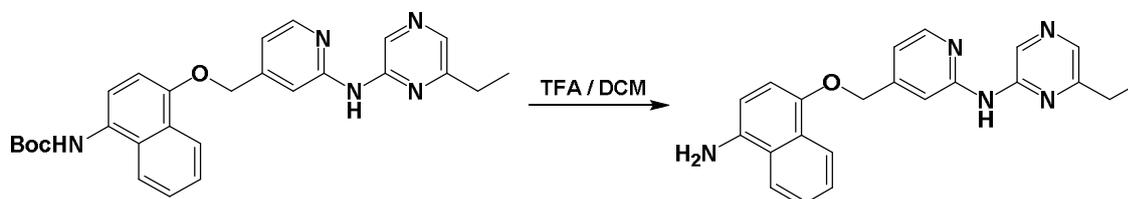
A una mezcla de 2-cloro-4-(clorometil)piridina (30 g, 185 mmol) y (4-hidroxinaftalen-1-il)carbamato de *terc-butilo* (40,0 g, 154 mmol) en acetonitrilo (200 mL) se le agregó carbonato de cesio (75 g, 231 mmol) y la mezcla resultante se calentó hasta 55 °C. Después de 16 h la mezcla de reacción se diluyó con 30% MeOH en DCM (600 mL) y agua (400 mL). Las capas se separaron y la capa acuosa se extrajo con una cantidad adicional de 30% MeOH en DCM (2 x 600 mL) y las fases orgánicas se concentraron *in vacuo* para obtener el producto en bruto. El producto en bruto se trituró con MeOH (200 mL), se sonicó durante cerca de 5 min y se suspendió durante 1 día. El sólido resultante se recolectó por filtración y se lavó con MeOH (2 x 10 mL) para obtener el compuesto del subtítulo (4-((2-cloropiridin-4-il)metoxi)naftalen-1-il)carbamato de *terc-butilo* como un sólido amarillo (43 g, 70%); R^t 2,60 min (Método 1); m/z 383 (M-H)⁻ (ES⁻); ¹H RMN δ : 1,47 (9H, s), 5,41 (2H, s), 6,98 (1H, d), 7,36 (1H, d), 7,55–7,61 (3H, m superpuesto), 7,65 (1H, m), 7,94 (1H, m), 8,29 (1H, m), 8,45 (1H, m), 9,00 (1H, bs).

Compuesto intermedio D (protegido): (4-((2-((6-etilpirazin-2-il)amino)piridin-4-il)metoxi)naftalen-1-il)carbamato de *terc-butilo*



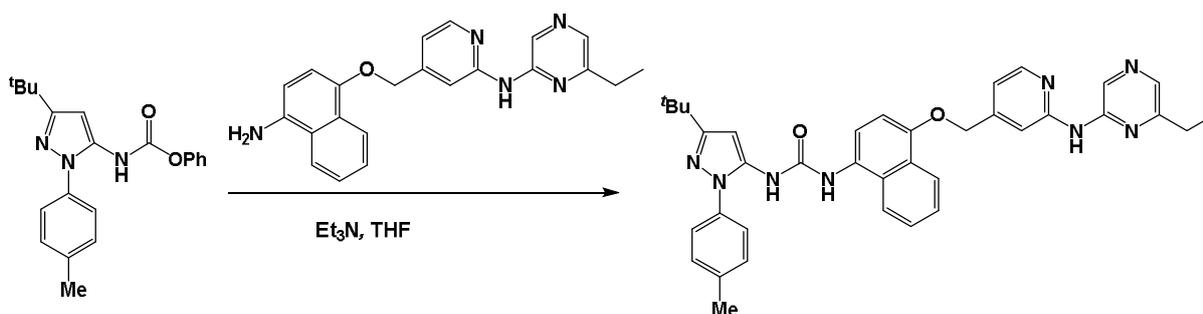
Una mezcla de 4-((2-cloropiridin-4-il)metoxi)naftalen-1-il)carbamato de *terc-butilo* (Compuesto intermedio C) (1050 mg, 2,73 mmol), 6-etilpirazin-2-amina (437 mg, 3,55 mmol), y carbonato de cesio (1333 mg, 4,09 mmol) en 1,4-dioxano (15 mL) se desgasificó con nitrógeno durante 5 min. Se agregó una solución de Pd₂(dba)₃ (125 mg, 0,136 mmol) y BINAP (170 mg, 0,273 mmol) en 1,4-dioxano (5 mL), y la mezcla de reacción se agitó a 90 °C durante 6 h. La mezcla de reacción se dejó enfriar y se agitó a temperatura ambiente durante 16 h, luego se diluyó con 10% MeOH/DCM (25 mL) y se filtró a través de un tapón de Celite, lavando con más 10% MeOH/DCM (15 mL). El solvente se eliminó *in vacuo* y el producto en bruto se combinó con MeOH (15 mL) y se suspendió durante 3 h. El sólido naranja resultante se aisló por filtración, luego se combinó con solución de MeOH/EtOH (5 mL) y se agitó durante 72 h. Nuevamente el sólido naranja resultante se aisló por filtración, luego se agregó acetona (20 mL) y la mezcla se suspendió durante 2 h. El sólido residual se separó por filtración, y el líquido filtrado se evaporó para proporcionar el compuesto del subtítulo 4-((2-((6-etilpirazin-2-il)amino)piridin-4-il)metoxi)naftalen-1-il)carbamato de *terc-butilo* (360 mg, 27%); R^t 2,6 min (Método 2); m/z 472 (M+H)⁺ (ES⁺); ¹H RMN δ: 1,18 (3H, t), 1,47 (9H, s), 2,63 (2H, q), 5,36 (2H, s), 6,99 (1H, d), 7,06 (1H, d), 7,36 (1H, d), 7,53–7,63 (2H, m), 7,90–8,06 (3H, superposición de m), 8,29 (1H, d), 8,36 (1H, m), 8,91 (1H, s), 8,96 (1H, s), 10,06 (1H, s).

15 **Compuesto intermedio D: N-(4-(((4-aminonaftalen-1-il)oxi)metil)piridin-2-il)-6-etilpirazin-2-amina**



Se agregó TFA (1,485 mL, 19,09 mmol) a una solución de 4-((2-((6-etilpirazin-2-il)amino)piridin-4-il)metoxi)naftalen-1-il)carbamato de *terc-butilo* (Compuesto intermedio D (protegido)) (360 mg, 0,763 mmol) en DCM (15 mL), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 h, luego se concentró *in vacuo*. El residuo se combinó con solución de hidrogenocarbonato sódico sat. y se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. El sólido se filtró, lavando con acetonitrilo, y se secó bajo vacío para proporcionar el compuesto del subtítulo N-(4-(((4-aminonaftalen-1-il)oxi)metil)piridin-2-il)-6-etilpirazin-2-amina como un sólido beige (200 mg, 69%); R^t 2,14 min (Método 2); m/z 372 (M+H)⁺ (ES⁺); ¹H RMN δ: 1,20 (3H, t), 2,64 (2H, q), 5,18–5,24 (4H, m superpuesto), 6,59 (1H, d), 6,82 (1H, d), 7,03 (1H, d), 7,41–7,51 (2H, m superpuesto), 7,98–8,01 (2H, m), 8,04 (1H, m), 8,22–8,29 (2H, m superpuesto), 8,91 (1H, s), 10,04 (1H, s).

25 **1-(3-(*terc-butil*)-1-(*p*-tolil)-1*H*-pirazol-5-il)-3-(4-((2-((6-etilpirazin-2-il)amino)piridin-4-il)metoxi)naftalen-1-il)urea**



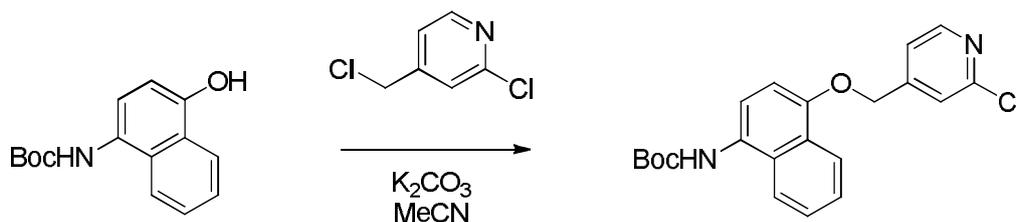
Se agregó trietilamina (0,013 mL, 0,093 mmol) a una solución de 3-(*terc-butil*)-1-(*p*-tolil)-1*H*-pirazol-5-il)carbamato de fenilo (Compuesto intermedio B) (0,042 g, 0,121 mmol) y N-(4-(((4-aminonaftalen-1-il)oxi)metil)piridin-2-il)-6-etilpirazin-2-amina (Compuesto intermedio D) (0,093 g, 0,250 mmol) en THF (1,5 mL) a 40 °C. La mezcla de reacción se agitó a 40 °C durante 40 min y luego se enfrió hasta TA y se agitó durante 3 días, y luego se concentró *in vacuo*. El producto en bruto se purificó por cromatografía en gel de sílice (columna 12 g, 0 a 5% MeOH en DCM) para proporcionar un sólido de color marrón - blancuzco. El producto se volvió a purificar por HPLC preparativa (Gilson, Ácida (Ácido fórmico al 0,1%), Ácida, columna Waters X-Select Prep-C18, 5 μm, 19x50 mm, 45–75% MeCN en agua) para obtener el compuesto del título 1-(3-(*terc-butil*)-1-(*p*-tolil)-1*H*-pirazol-5-il)-3-(4-((2-((6-etilpirazin-2-il)amino)piridin-4-il)metoxi)naftalen-1-il)urea como un sólido blancuzco (0,029 g, 49%); R^t 2,26 min (Método 1); m/z 627 (M+H)⁺ (ES⁺), 625 (M-H)⁻ (ES⁻); ¹H RMN δ: 1,18 (3H, t), 1,28 (9H, s), 2,40 (3H, s), 2,63 (2H, q), 5,36 (2H, s), 6,36 (1H, s), 7,02 (1H, d), 7,07 (1H, dd), 7,37 (2H, m), 7,45 (2H, m), 7,56–7,67 (3H, m superpuesto), 7,94 (1H, m), 7,99 (1H, s), 8,02 (1H, s), 8,30 (1H, d), 8,39 (1H, m), 8,60 (1H, s), 8,81 (1H, s), 8,92 (1H, s), 10,08 (1H, s).

Ejemplo 1B: 1-(3-(*terc-butil*)-1-(*p*-tolil)-1*H*-pirazol-5-il)-3-(4-((2-((6-etilpirazin-2-il)amino)piridin-4-il)metoxi)naftalen-1-il)urea (lote diferente)

1–(3–(*tert*-*butil*)–1–(p-tolil)–1H-pirazol-5-il)–3–(4–((2–((6-etilpirazin-2-il)amino)piridin-4-il)metoxi)naftalen-1-il)urea (10,0 g) se agitó en acetonitrilo (770 mL) a 22 °C. La mezcla heterogénea se calentó hasta temperatura de reflujo a una velocidad de 3 °C/min y se mantuvo el reflujo durante 2,5 h. La mezcla se sembró con 1–(3–(*tert*-*butil*)–1–(p-tolil)–1H-pirazol-5-il)–3–(4–((2–((6-etilpirazin-2-il)amino)piridin-4-il)metoxi)naftalen-1-il)urea cristalina (100 mg). La mezcla se enfrió linealmente hasta 20 °C durante 18 h luego se calentó nuevamente hasta temperatura de reflujo y se calentó a reflujo durante 2 h y luego se enfrió linealmente hasta 22 °C durante 18 h. El producto sólido se filtró, se lavó con acetonitrilo (77 mL) y se secó durante 18 h a 45 °C *in vacuo* para obtener 1–(3–(*tert*-*butil*)–1–(p-tolil)–1H-pirazol-5-il)–3–(4–((2–((6-etilpirazin-2-il)amino)piridin-4-il)metoxi)naftalen-1-il)urea (8,73 g).

10 **Ejemplo 2A: maleato de 1–(3–(*tert*-*butil*)–1–(p-tolil)–1H-pirazol-5-il)–3–(4–((2–((6-etilpirazin-2-il)amino)piridin-4-il)metoxi)naftalen-1-il)urea (Forma 2)**

Compuesto intermedio C: (4–((2–cloropiridin-4-il)metoxi)naftalen-1-il)carbamato de *tert*-*butilo*

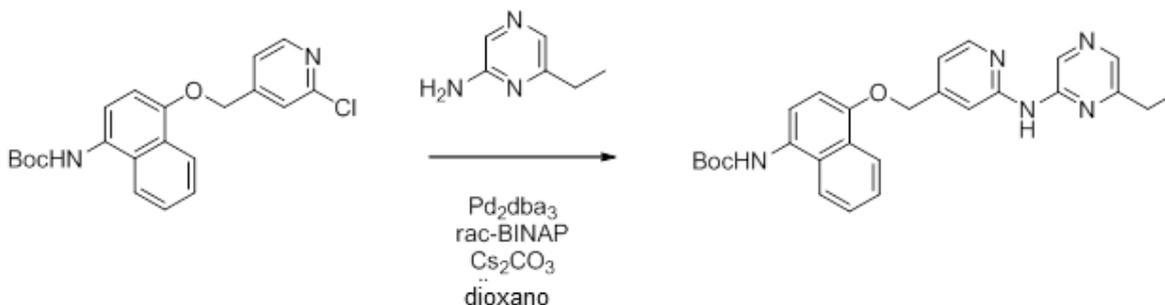


15 Se agregó acetonitrilo (420 mL) a 2-cloro-4-(clorometil)piridina (1,05 eq, 59,5 g), y la mezcla se agitó a 20 °C. Se agregó (4-hidroxinaftalen-1-il)carbamato de *tert*-*butilo* (90,8 g) a la mezcla y luego se agregó carbonato de potasio (72,6 g). La mezcla heterogénea se calentó hasta 55 °C a una velocidad de 1,0 K/min.

La mezcla se agitó durante 16 h a 55 °C y luego la mezcla de reacción se enfrió hasta 22 °C. Se agregó agua (1260 mL) durante 30 min y la mezcla se agitó durante 30 min a 22 °C.

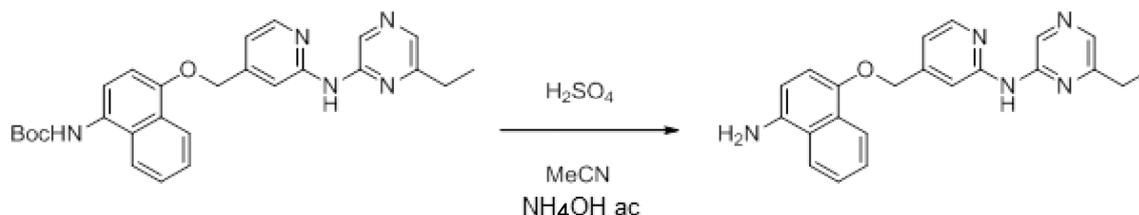
20 El precipitado se filtró y se lavó dos veces con 200 mL de agua. El producto se secó *in vacuo* a 50 °C durante 20 h para obtener (4–((2–cloropiridin-4-il)metoxi)naftalen-1-il)carbamato de *tert*-*butilo* (100,0 g, 90,6%).

Compuesto intermedio D (protegido): (4–((2–((6-etilpirazin-2-il)amino)piridin-4-il)metoxi)naftalen-1-il)carbamato de *tert*-*butilo*



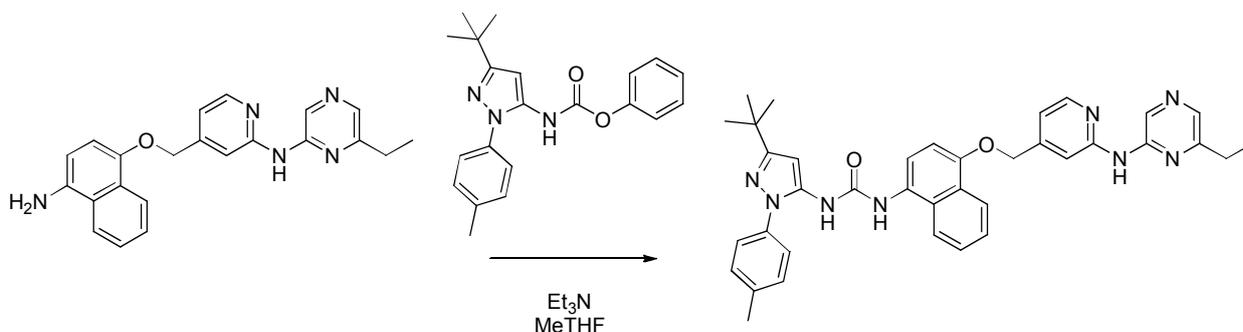
25 Se agregó dioxano (125 mL) a (4–((2–cloropiridin-4-il)metoxi)naftalen-1-il)carbamato de *tert*-*butilo* (Compuesto intermedio C) (9,6 g) y la mezcla se agitó a 20 °C. Se agregaron carbonato de cesio (2 eq, 16,3 g) y 2-amino-6-etilpirazina (1,5 eq, 4,8 g) a la mezcla agitada a 20 °C. Se purgó argón a través de la mezcla de reacción. Se agregaron *tris*(dibencilidenaetona)dipaladio(0) (0,05 eq, 1,14 g) y BINAP racémico (0,10 eq, 1,56 g) a la mezcla de reacción. La mezcla se agitó durante 15 min adicionales a 20 °C. La mezcla se calentó hasta 90 °C a una velocidad de 1,5 K/min luego se agitó durante 12 h a 90 °C. La mezcla se enfrió hasta 20 °C y se siguió agitando durante unas 6 h adicionales. La mezcla heterogénea se filtró sobre Celite, y el filtro se lavó con dioxano (dos veces 5 mL). El líquido filtrado se concentró *in vacuo* a 20 mbar y 50 °C. El residuo se disolvió en etanol (150 mL). Se produjo la cristalización espontánea. La mezcla heterogénea se agitó durante 3 h a 22 °C. El precipitado se filtró y se lavó con etanol (10 mL). El producto se secó *in vacuo* a 50 °C durante 20 h para obtener (4–((2–((6-etilpirazin-2-il)amino)piridin-4-il)metoxi)naftalen-1-il)carbamato de *tert*-*butilo* (9,05 g, 76,8%).

35 **Compuesto intermedio D: N–(4–((4-aminonaftalen-1-il)oxi)metil)piridin-2-il)–6-etilpirazin-2-amina**



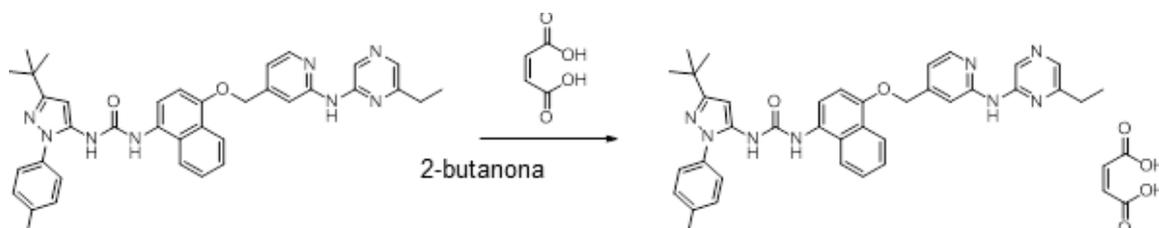
Se agregó acetonitrilo (200 mL) a (4-((2-((6-etilpirazin-2-il)amino)piridin-4-il)metoxi)naftalen-1-il)carbamato de *terc-butilo* (Compuesto intermedio D (protegido)) (10,5 g) y la mezcla heterogénea se agitó a 20 °C. Se agregó ácido sulfúrico (4,5 eq, 5,5 mL) durante 2 h a 20 °C. La mezcla heterogénea se agitó durante unas 2 h más a 20 °C. Se agregó amoníaco acuoso (10 eq, 17 mL) a la mezcla de reacción durante 15 min y la temperatura se mantuvo a 20 °C por enfriamiento. Se agregó agua (33,4 mL) a la mezcla heterogénea durante 5 min a 20 °C. Después de la agitación durante 30 min a 20 °C, la mezcla se enfrió hasta 5 °C y se agitó durante unas 2 h adicionales a 5 °C. El precipitado se filtró y se lavó con agua (33,4 mL) y 2-propanol (18 mL). El producto se secó a 50 °C *in vacuo* durante 24 h para obtener *N*-(4-(((4-aminonaftalen-1-il)oxi)metil)piridin-2-il)-6-etilpirazin-2-amina (6,2 g, 75%).

10 **1-(3-(*terc-butil*)-1-(*p*-tolil)-1H-pirazol-5-il)-3-(4-((2-((6-etilpirazin-2-il)amino)piridin-4-il)metoxi)naftalen-1-il)urea**



Se agregó 2-metiltetrahidrofurano (1809 mL) a *N*-(4-(((4-aminonaftalen-1-il)oxi)metil)piridin-2-il)-6-etilpirazin-2-amina (Compuesto intermedio D) (41,3 g) y la mezcla se agitó a 20 °C. Se agregó (3-(*terc-butil*)-1-(*p*-tolil)-1H-pirazol-5-il)carbamato de fenilo (1,2 eq, 51,3 g) a la mezcla. Se agregó trietilamina (0,25 eq, 3,9 mL) y la mezcla se agitó durante unos 10 min adicionales a 20 °C. La mezcla de reacción heterogénea se calentó hasta 48 °C durante 30 min y se mantuvo a 48 °C durante 3,5 h. Después de 10 min a 48 °C, la mezcla se volvió homogénea, y se sembró con 1-(3-(*terc-butil*)-1-(*p*-tolil)-1H-pirazol-5-il)-3-(4-((2-((6-etilpirazin-2-il)amino)piridin-4-il)metoxi)naftalen-1-il)urea cristalina (60 mg). La mezcla de reacción se dejó enfriar hasta 20 °C y se agitó durante unas 16 h adicionales. El precipitado formado se filtró y se lavó con 2-metiltetrahidrofurano (dos veces 139 mL). El producto se secó durante 18 h a 45 °C *in vacuo* para obtener 1-(3-(*terc-butil*)-1-(*p*-tolil)-1H-pirazol-5-il)-3-(4-((2-((6-etilpirazin-2-il)amino)piridin-4-il)metoxi)naftalen-1-il)urea (54,1 g, 77,5%).

maleato de 1-(3-(*terc-butil*)-1-(*p*-tolil)-1H-pirazol-5-il)-3-(4-((2-((6-etilpirazin-2-il)amino)piridin-4-il)metoxi)naftalen-1-il)urea (Forma 2)



Se agregó 2-butanona (4442 mL) a 1-(3-(*terc-butil*)-1-(*p*-tolil)-1H-pirazol-5-il)-3-(4-((2-((6-etilpirazin-2-il)amino)piridin-4-il)metoxi)naftalen-1-il)urea (111,04 g) y se agitó a 20 °C. La mezcla heterogénea se calentó hasta 65 °C y se volvió una solución homogénea. Se agregó SilicaMetS Thiol (depurador de metal) (5,55 g) y la mezcla se agitó durante 30 min a 65 °C. Se agregó Norit A Supra (carbón activado) (5,55 g) y la mezcla se agitó durante unos 20 min adicionales a 65 °C. La mezcla se filtró en caliente sobre Celite. El filtro se lavó con 2-butanona caliente (1555 mL) (60 °C). Se agregó 2-butanona (2887 mL) al líquido filtrado y se llevó hasta 60 °C agitando al mismo tiempo.

Se disolvió ácido maleico (1,0 eq, 20,56 g) en 2-butanona (555 mL). La solución de ácido maleico se agregó a la solución de 1-(3-(*terc-butil*)-1-(*p-tolil*)-1H-pirazol-5-il)-3-(4-((2-((6-etilpirazin-2-il)amino)piridin-4-il)metoxi)naftalen-1-il)urea durante 80 min a 65 °C. Después de agregarse el 10% de la solución del ácido maleico, la mezcla se sembró con maleato de 1-(3-(*terc-butil*)-1-(*p-tolil*)-1H-pirazol-5-il)-3-(4-((2-((6-etilpirazin-2-il)amino)piridin-4-il)metoxi)naftalen-1-il)urea cristalino (Forma 2). La mezcla se mantuvo bajo agitación durante 1 h a 60 °C, luego se enfrió no linealmente con un exponente de 2,3 durante 6 h a 5 °C. El precipitado se filtró y lavó dos veces con 2-butanona (278 mL). El producto se secó a 45 °C *in vacuo* durante 20 h para obtener maleato de 1-(3-(*terc-butil*)-1-(*p-tolil*)-1H-pirazol-5-il)-3-(4-((2-((6-etilpirazin-2-il)amino)piridin-4-il)metoxi)naftalen-1-il)urea (Forma 2) (113,8 g, 86,5%).

Ejemplo 2B: Maleato de 1-(3-(*terc-butil*)-1-(*p-tolil*)-1H-pirazol-5-il)-3-(4-((2-((6-etilpirazin-2-il)amino)piridin-4-il)metoxi)naftalen-1-il)urea (Forma 2) (lote diferente)

Se agregó 2-butanona (750 mL) a 1-(3-(*terc-butil*)-1-(*p-tolil*)-1H-pirazol-5-il)-3-(4-((2-((6-etilpirazin-2-il)amino)piridin-4-il)metoxi)naftalen-1-il)urea (7,50 g) y la mezcla se agitó. La mezcla se calentó hasta 60 °C durante 20 min. Se agregó una solución de ácido maleico (1,39 g) en 2-butanona (12 mL) a la mezcla durante 5 min. Se produjo la cristalización espontánea después de agregarse aproximadamente la mitad de la solución de ácido maleico. La mezcla se agitó durante 30 min a 60 °C y luego se enfrió hasta 5 °C durante 6 h con una subida exponencial (exponente = 2,3) luego se agitó durante 30 min a 5 °C luego se calentó hasta 65 °C durante 30 min y luego se agitó durante 30 min a 65 °C luego se enfrió hasta 5 °C durante 6 h con un ascenso exponencial (exponente = 2,3) luego se agitó durante 30 min a 5 °C luego se calentó hasta 65 °C durante 30 min luego se agitó durante 30 min a 65 °C luego se enfrió hasta 5 °C durante 6 h con un ascenso exponencial (exponente = 2,3). El producto se filtró y se lavó dos veces con 2-butanona (50 mL), posteriormente se secó a 45 °C *in vacuo* para obtener maleato de 1-(3-(*terc-butil*)-1-(*p-tolil*)-1H-pirazol-5-il)-3-(4-((2-((6-etilpirazin-2-il)amino)piridin-4-il)metoxi)naftalen-1-il)urea (Forma 2) (7,0 g).

Ejemplo 2C: maleato de 1-(3-(*terc-butil*)-1-(*p-tolil*)-1H-pirazol-5-il)-3-(4-((2-((6-etilpirazin-2-il)amino)piridin-4-il)metoxi)naftalen-1-il)urea (Forma 1)

Se disolvió el maleato de 1-(3-(*terc-butil*)-1-(*p-tolil*)-1H-pirazol-5-il)-3-(4-((2-((6-etilpirazin-2-il)amino)piridin-4-il)metoxi)naftalen-1-il)urea (15 mg) en THF (100 vol.) a 50 °C y la temperatura tuvo ciclos entre 50 °C y temperatura ambiente durante 24 h (4 h a cada temperatura). La solución luego se guardó en el refrigerador durante 24 h después de lo cual se aisló el material sólido (Forma 1).

Ejemplo 2D: maleato de 1-(3-(*terc-butil*)-1-(*p-tolil*)-1H-pirazol-5-il)-3-(4-((2-((6-etilpirazin-2-il)amino)piridin-4-il)metoxi)naftalen-1-il)urea (Forma 1) (lote diferente)

Se disolvió 1-(3-(*terc-butil*)-1-(*p-tolil*)-1H-pirazol-5-il)-3-(4-((2-((6-etilpirazin-2-il)amino)piridin-4-il)metoxi)naftalen-1-il)urea en THF (40 vol.) a 50 °C y se agregó 1 eq de ácido maleico. La muestra se dejó madurar entre TA y 50 °C (4 h a cada temperatura) durante 2 días. Se aisló el material sólido (Forma 1).

Ejemplo 3: Lotes micronizados

Ejemplo 3A: 1-(3-(*terc-butil*)-1-(*p-tolil*)-1H-pirazol-5-il)-3-(4-((2-((6-etilpirazin-2-il)amino)piridin-4-il)metoxi)naftalen-1-il)urea en forma micronizada

Se preparó 1-(3-(*terc-butil*)-1-(*p-tolil*)-1H-pirazol-5-il)-3-(4-((2-((6-etilpirazin-2-il)amino)piridin-4-il)metoxi)naftalen-1-il)urea micronizada micronizando material del Ejemplo 1B en un dispositivo de micronización Hosokawa Alpine Spiral Jet Mill 50 AS (5 cm) (presión 1.0 bar) (alimentación manual). Los parámetros de volumen de tamaño de partícula determinados por difracción láser usando un Malvern Mastersizer 2000S (dispersión en agua/Tween80, 0.1%p/v) se proporcionan en la tabla que aparece a continuación:

Dv10 (micrón)	Dv50 (micrón)	Dv90 (micrón)
0.15	1.54	10.76

Ejemplo 3B: maleato de 1-(3-(*terc-butil*)-1-(*p-tolil*)-1H-pirazol-5-il)-3-(4-((2-((6-etilpirazin-2-il)amino)piridin-4-il)metoxi)naftalen-1-il)urea Forma 2 en forma micronizada

Se preparó maleato de 1-(3-(*terc-butil*)-1-(*p-tolil*)-1H-pirazol-5-il)-3-(4-((2-((6-etilpirazin-2-il)amino)piridin-4-il)metoxi)naftalen-1-il)urea micronizado (Forma 2) micronizando el material del Ejemplo 2B en un dispositivo de micronización Hosokawa Alpine Spiral Jet Mill 50 AS (5 cm) (presión 1.0 bar) (alimentación manual). Los parámetros de volumen de tamaño de partícula determinados por difracción láser usando un Malvern Mastersizer 2000S (dispersión en agua/Tween80, 0.1%p/v) para el material de entrada y salida se proporcionan en la tabla que aparece a continuación:

	Dv10 (micrón)	Dv50 (micrón)	Dv90 (micrón)
material de entrada (Ejemplo 2B)	3	9	128
material de salida (Ejemplo 3B)	1.21	2.18	4.00

5 **Ejemplo 4: Composiciones que contienen lactosa que contiene 1-(3-(*terc-butil*)-1-(*p-tolil*)-1H-pirazol-5-il)-3-(4-((2-((6-etilpirazin-2-il)amino)piridin-4-il)metoxi)naftalen-1-il)urea como la base libre y maleato (Forma 2), adecuadas para inhalación**

Las composiciones se prepararon mezclando los ingredientes de la siguiente manera:

Ejemplo	Ingrediente activo (Ejemplo 3B) (maleato (Forma 2), micronizado)	Lactosa monohidratada *	Estearato de magnesio **
4a	75mg	75mg	–
4b	75mg	–	75mg
4c	75mg	35mg	35mg

Ejemplo	Ingrediente activo (Ejemplo 3A) (forma de base libre, micronizada)**	Lactosa monohidratada *	Estearato de magnesio **
4d	10µg	25mg	–
4e	10µg	25mg	1%
4f	100µg	25mg	–

Ejemplo	Ingrediente activo (Ejemplo 3B) (maleato (Forma 2), micronizado)	Lactosa monohidratada *	Estearato de magnesio **
4g	10µg	25mg	–
4h	10µg	25mg	1%
4i	100µg	25mg	–

*Lactohale LH200 **Fuente: Peter Greven (Grado: Ligamed MF-2V; grado vegetal)

Ejemplo 5: Ensayos de caracterización y estabilidad**Caracterización física del ingrediente activo***Espectrometría de infrarrojos (IR) – Micro Reflectancia Total Atenuada (microATR)*

Las muestras se analizaron usando un accesorio microATR adecuado.

5	cantidad de barridos:	32
	resolución:	1 cm ⁻¹
	rango de longitud de onda:	4000 a 400 cm ⁻¹
	aparato:	espectrómetro Thermo Nexus 670 FTIR
10	detector:	DTGS con ventanas KBr
	divisor de haz:	Ge en KBr
	accesorio micro ATR:	Harrick Split Pea con cristal de Si

El espectro de IR de una muestra del material del Ejemplo 2A, mostrado en la Figura 1, refleja los modos vibracionales de la estructura molecular del Ejemplo 1 como su sal maleato.

15 *XRD de polvo*

El análisis de difracción de rayos X de polvo (XPD) sobre el material de la Forma 2 se llevó a cabo en un difractómetro PANanalytical (Philips) X'PertPRO MPD. El instrumento está equipado con un tubo de rayos X Cu LFF.

El compuesto se esparció sobre un soporte de muestra de fondo cero.

20 **Parámetros del instrumento:**

	voltaje del generador:	45 kV
	amperaje del generador:	40 mA
	geometría:	Bragg–Brentano
	etapa:	etapa de spinner

25 **Condiciones de medición:**

	modo de barrido:	continuo
	rango de barrido:	3 a 50° 2θ
	tamaño de etapa:	0.02°/etapa
	tiempo de conteo:	30 seg/etapa

30 tiempo de revolución del

	spinner:	1 seg
	tipo de radiación:	CuK _α

Trayectoria de haz incidente:

program. hendidura

35	de divergencia:	15 mm	protección anti dispersión larga:+
	hendidura de Soller:	0.04 rad	hendidura de Soller: 0.04 rad
	máscara de haz:	15 mm	filtro de Ni: +
	hendidura anti dispersión:	1°	detector: X'Celerator
	cuchilla de haz:	+	

Trayectoria de haz difractado:

40 Se llevó a cabo el análisis de difracción de rayos X de polvo (XPD) sobre el material de Forma 1 en un difractómetro Bruker AXS C2 GADDS. El compuesto fue presionado ligeramente sobre una platina de vidrio.

Parámetros del Instrumento:

	voltaje del generador:	40 kV
	amperaje del generador:	40 mA
45	geometría:	reflexión (=Bragg–Brentano)
	etapa:	etapa XYZ automatizada

Condiciones de medición:

	modo de barrido:	continuo
	rango de barrido:	3 a 30° 2θ
50	tamaño de etapa:	0.05°/etapa
	tiempo de conteo:	120 seg
	tipo de radiación:	CuK _α

detector: HiStar bidimensional

Espejo multicapas Göbel simple acoplado con un colimador de orificio pequeño "pinhole" de 0,3 mm

5 El patrón de XRD en polvo de una muestra del material del Ejemplo 2A, que se muestra en la Figura 2, muestra picos de difracción sin la presencia de un halo, lo cual indica que el compuesto está presente como un producto cristalino. Este patrón de XRD es característico del polimorfo cristalino Forma 2.

El patrón de XRD en polvo de una muestra del material del Ejemplo 2D, mostrado en la Figura 3, muestra picos de difracción sin la presencia de un halo, lo cual indica que el compuesto está presente como un producto cristalino. Este patrón de XRD es característico del polimorfo cristalino Forma 1.

Calorimetría diferencial de barrido (DSC, por sus siglas en inglés)

10 Se transfirieron alrededor de 3 mg del compuesto de ensayo a un recipiente de muestra del instrumento TA de aluminio estándar. El recipiente de la muestra se cerró con la cubierta apropiada y se registró la curva de DSC en un TA-Instruments Q1000 MTDSC equipado con una unidad de refrigeración RCS.

Se utilizaron los siguientes parámetros:

15 temperatura inicial: 25°C
 índice de calentamiento: 10°C/min
 temperatura final: 300°C
 flujo de nitrógeno: 50 mL /min

La curva de DSC de una muestra de material del Ejemplo 2A, mostrado en la Figura 4, revela la fusión con descomposición del producto a aproximadamente 198,6 °C (Forma 2).

20 Análisis termogravimétrico (TGA, por sus siglas en inglés)

El compuesto de ensayo fue transferido a un recipiente de muestra de aluminio. Se registró la curva termogravimétrica en un aparato termogravimétrico TA Instruments Q500. Se utilizaron los siguientes parámetros:

25 temperatura inicial: temperatura ambiente
 velocidad de calentamiento: 20°C/min
 factor de resolución: 4
 condición final: 300°C o <80[(p/p)%]

Un gráfico de TGA de una muestra del material del Ejemplo 2A es mostrado en la Figura 5. No se registró pérdida de peso en la región de temperatura desde temperatura ambiente hasta 175 °C. La pérdida de peso por encima de 175 °C se debe a la evaporación y a la descomposición del producto.

30 Absorción dinámica de vapores (DVS, por sus siglas en inglés)

Aproximadamente 20 mg del compuesto de ensayo se transfirió a un aparato de absorción dinámica de vapores SMS y se registró el cambio de peso con respecto a la humedad atmosférica a 25 °C.

Se utilizaron los siguientes parámetros:

35 secado: 60 min. bajo nitrógeno seco
 equilibrio: 60 min/Etapa.
 Puntos de medición de HR (%):
 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

40 Se realizó el ensayo de DVS sobre una muestra del material del Ejemplo 2A (véase las Figuras 6 y 7). Durante la etapa de secado inicial, se registró una pérdida de peso de 0,3%. El producto no parece ser higroscópico.

El producto después de DVS, fue investigado por XRD e IR y permaneció en la misma forma en estado sólido antes del ensayo y después del ensayo (datos no mostrados). No se observó indicación alguna para la disociación de la sal.

Microscopía Electrónica de Barrido (SEM, por sus siglas en inglés)

45 Para los experimentos de SEM, los datos fueron recogidos en un Microscopio Electrónico de Barrido Phenom Pro Scanning Electron Microscope. Una pequeña cantidad de muestra fue montada sobre un portaobjetos de aluminio usando cinta adhesiva de dos lados conductora. Se aplicó una delgada capa de oro usando un revestidor por pulverización catódica (20 mA, 120 seg).

50 Las muestras del material de la Forma 1 y la Forma 2 de la sal maleato del compuesto de la invención fueron inspeccionadas por SEM. El producto de la forma 1 tenía una morfología tipo aguja. El producto de la forma 2 tenía

una morfología tipo placa. La morfología tipo placa de la Forma 2 es más adecuada para la preparación de un producto inhalado que la morfología tipo aguja de la Forma 1.

Síntesis de los resultados de la caracterización física del ingrediente activo

5 El material analizado era cristalino en base a XRD y se derrite con descomposición a alrededor de 198.6 °C. No se observó pérdida de peso alguna entre la temperatura ambiente y 175 °C por TGA. El material parecía no ser higroscópico. No había evidencia alguna de conversión de estado sólido o disociación de la sal. Estas propiedades confirman la conveniencia de la sal maleato del compuesto de fórmula (I) como un fármaco candidato.

Caracterización física del ingrediente activo en forma micronizada

10 Una muestra del material del Ejemplo 3B fue estudiada por IR, XRD de polvo, DSC, TGA y DVS de modo similar a aquel descrito con anterioridad para el material del ejemplo 2A. Los resultados de IR y XRD de polvo fueron sustancialmente iguales (datos no mostrados). El material analizado era cristalino en base a XRD y se derrite con la descomposición a alrededor de 194,6 °C de acuerdo con DSC. El material parecía no ser higroscópico (datos no mostrados). No había evidencia alguna de la conversión del estado sólido o disociación de la sal (datos no mostrados). Estas propiedades confirman la conveniencia de la sal maleato del compuesto de fórmula (I) en forma micronizada como un fármaco candidato.

Ensayos de estabilidad física – estabilidad de mezclas de lactosa

20 Las composiciones de los Ejemplos 4a, 4b y 4c se almacenaron durante 3, 6 y 13 semanas bajo condiciones de 40 °C/75% HR, 50 °C/80% HR y 50 °C/ HR del ambiente. Los patrones de XRD y los espectros de IR se obtuvieron en tiempo cero y en los tres puntos en el tiempo (los parámetros de ensayo fueron iguales a lo descrito para la caracterización del ingrediente activo, más arriba). No se observaron diferencias relevantes en los patrones de XRD o en los espectros de IR entre tiempo cero y cualquiera de los puntos de tiempo (datos no mostrados). No se observaron cambios a la forma en estado sólido o disociación de la sal.

Ensayos de estabilidad química – estabilidad de ingrediente activo y mezclas

UPLC Método para determinación de la degradación

25 Se extrajeron las muestras con mezcla de solventes (DMSO/agua 80:20) (7 mL) en un frasco de 10 mL.

Se realizó la cromatografía UPLC usando los siguientes parámetros:

Columna: Supelco Ascentis Express C18, 150 mm de largo x 3.0 mm i.d., tamaño de partícula 2,7 µm

Temperatura de la Columna: 30 °C

Temperatura del Automuestreador: 5 °C

30 Índice de flujo: 0.40 mL /min

Fase Móvil:

Solvente A: acetato de amonio 10 mM (0,771 g/L) + 0,1% v/v de ácido trifluoracético en agua

Solvente B: acetonitrilo/ alcohol isopropílico 70:30 (v/v)

Gradiente:

Solvente	Tiempo en minutos					
	0	20	25	30	31	36
%A	90	35	0	0	90	90
%B	10	65	100	100	10	10

35 Tiempo de realización del análisis: 36 min

Tiempo de recolección de datos: 30 min

Volumen de inyección: 5 µL

Longitud de onda: barrido entre 200 y 400 nm

Longitud de onda usada para cálculos de uniformidad del contenido: 334,0 nm

40 Las composiciones de los Ejemplos 4d, 4e, 4f, 4g, 4h y 4i se almacenaron durante 14 y 30 días bajo condiciones de 50 °C/75% de HR, 60 °C/30% de HR, 60 °C/50% de HR, 70 °C/10% de HR, 70 °C/ 75% de HR y 80 °C/50% de HR.

Se midió la degradación en tiempo cero y en los puntos de tiempo de 7, 14 y 30 días por UPLC y los resultados son mostrados en la Figura 8, placas A a F.

45 El porcentaje de degradación total para las composiciones que contenían la sal maleato, Forma 2 del ingrediente activo era siempre más bajo que el de las composiciones equivalentes que contienen la base libre del ingrediente activo lo cual indica que la sal maleato, Forma 2 es más estable en estas formulaciones. El porcentaje de degradación total para las composiciones que contienen la sal maleato, Forma 2 del ingrediente activo en

concentraciones más altas era más bajo que aquel para las composiciones que contienen la sal maleato, Forma 2 del ingrediente activo en concentración más baja en estas formulaciones.

5 En estudios similares sobre material del Ejemplo 1B y Ejemplo 2B (es decir, material no micronizado y no mezclado) en donde las muestras se almacenan durante hasta 30 días bajo condiciones de 50°C/75% de HR, 60 °C/50% de HR, 70 °C/10% de HR, 70 °C/75% de HR y 80 °C/50% de HR, se obtuvieron resultados cualitativamente similares, es decir, el porcentaje de degradación total para la sal maleato fue siempre más bajo que aquel para la base libre (datos no mostrados).

A partir de estos resultados, parece ser que la sal maleato del compuesto de la invención es más químicamente estable (sola y en combinación con lactosa) que la forma de base libre.

10 **Ejemplo 6: Ensayos biológicos**

Métodos experimentales para ensayos biológicos

Ensayos de Inhibición Enzimática

15 Las actividades de inhibición enzimática del compuesto descrito en la presente invención fueron determinadas por FRET usando péptidos sintéticos etiquetados con fluoróforos donantes y aceptores (Z-LYTE, Life Technologies, Paisley, Reino Unido).

Inhibición de Enzima p38 MAPK α

20 Las actividades inhibitorias del compuesto de la invención contra la isoforma p38 MAPK α (MAPK14: Life Technologies), fueron evaluadas indirectamente determinando el nivel de activación / fosforilación del péptido objetivo de la molécula corriente abajo de p38 MAPK α , MAPKAP-K2. La enzima (40 ng/mL, 2,5 μ L) se incubó con el compuesto de ensayo (2,5 μ L de 40 μ g/mL, 12 μ g/mL, 4 μ g/mL, 1,2 μ g/mL, 0,4 μ g/mL, 0,12 μ g/mL, 0,04 μ g/mL, 0,012 μ g/mL, 0,004 μ g/mL o 0,0012 μ g/mL) durante 2 h a TA. Los péptidos de la FRET (8 μ M, 2,5 μ L) y la MAPKAP-K2 p38 α inactiva objetivo (Life Technologies, 2000 ng/mL), y solución apropiada de ATP (2,5 μ L, 40 μ M) luego se agregaron a la mezcla de enzima / compuesto y se incubó durante 1 h a TA. Se agregó reactivo de elaboración (proteasa, 5 μ L) durante 1 h antes de la detección en un lector de microplacas de fluorescencia (EnVision, Perkin Elmer, Waltham, MA, EE. UU.).

Inhibición de Enzima p38 MAPK γ

30 Las actividades de inhibición del compuesto de la invención contra p38MAPK γ (MAPK12: Life Technologies), se evaluaron determinando el nivel de activación / fosforilación del péptido objetivo. La enzima (800 ng/mL, 2,5 μ L) se incubó con el compuesto del ensayo (2,5 μ L a 40 μ g/mL, 12 μ g/mL, 4 μ g/mL, 1,2 μ g/mL, 0,4 μ g/mL, 0,12 μ g/mL, 0,04 μ g/mL, 0,012 μ g/mL, 0,004 μ g/mL o 0,0012 μ g/mL) durante 2 h a TA. Los péptidos de la FRET (8 μ M, 2,5 μ L), y solución apropiada de ATP (2,5 μ L, 400 μ M) luego se agregaron a las mezclas de enzimas / compuesto y se incubó durante 1 h a TA. Se agregó reactivo de elaboración (proteasa, 5 μ L) durante 1 h antes de la detección en un lector de microplacas de fluorescencia (EnVision, Perkin Elmer).

Inhibición de Enzimas Hck, c-*Src* y Syk

35 Las actividades de inhibición del compuesto de la invención contra las enzimas Hck, c-*Src* y Syk (Life Technologies) se evaluaron de manera similar a la descrita anteriormente en esta invención. La enzima relevante (1000 ng/mL, 1400 ng/mL o 2000 ng/mL respectivamente, 2,5 μ L) se incubó con el compuesto del ensayo (ya sea 40 μ g/mL, 12 μ g/mL, 4 μ g/mL, 1,2 μ g/mL, 0,4 μ g/mL, 0,12 μ g/mL, 0,04 μ g/mL, 0,012 μ g/mL, 0,004 μ g/mL o 0,0012 μ g/mL, 2,5 μ L cada una) durante 2 h a TA. Los péptidos de FRET (8 μ M, 2,5 μ L), y soluciones apropiadas de ATP (2,5 μ L, 800 μ M para c-*Src*, y 60 μ M ATP para HCK y Syk) luego se agregaron a las mezclas de enzima / compuesto y se incubó durante 1 h a TA. Se agregó reactivo de elaboración (proteasa, 5 μ L) durante 1 h antes de la detección en un lector de microplacas de fluorescencia (EnVision, Perkin Elmer).

Inhibición de Enzima GSK 3 α

45 Las actividades de inhibición del compuesto de la invención contra la isoforma de la enzima GSK 3 α (Life Technologies) se evaluaron de modo similar al descrito con anterioridad en la presente invención. La proteína GSK3 α (500 ng/mL, 2,5 μ L) se incubó con el compuesto del ensayo (2,5 μ L a ya sea 40 μ g/mL, 12 μ g/mL, 4 μ g/mL, 1,2 μ g/mL, 0,4 μ g/mL, 0,12 μ g/mL, 0,04 μ g/mL, 0,012 μ g/mL, 0,004 μ g/mL o 0,0012 μ g/mL) durante 2 h a TA. El péptido de FRET (8 μ M, 2,5 μ L), el cual es un objetivo de fosforilación para GSK3 α , y ATP (40 μ M, 2,5 μ L) luego se agregaron a la mezcla de enzima / compuesto y la mezcla resultante se incubó durante 1 h a TA. Se agregó reactivo de elaboración (proteasa, 5 μ L) durante 1 h antes de la detección en un lector de microplacas de fluorescencia (EnVision, Perkin Elmer).

50 En todos los casos, la proteasa sitio específica disocia al péptido no fosforilado solamente y elimina la señal de FRET. Se calcularon los niveles de fosforilación de cada reacción usando la relación de emisión de cumarina (donante) con respecto a la emisión de fluoresceína (aceptor), para lo cual las relaciones bajas indican fosforilación

elevada y las relaciones elevadas indican niveles bajos de fosforilación. Se calculó el porcentaje de inhibición de cada reacción con relación al control no inhibido y luego se calculó la concentración inhibitoria del 50% (valor IC₅₀) de la curva concentración - respuesta.

Ensayos Celulares (empleados en los Ejemplos)

- 5 Se emplearon los siguientes ensayos celulares para evaluar el compuesto de la presente invención y los resultados son proporcionados más adelante.

Liberación de TNF α / IL-8 inducida por LPS en Células d-U937

10 Las células U937, una línea celular monocítica humana, fueron diferenciadas en células tipo macrófago por incubación con PMA (100 – 200 ng/mL) durante 48 a 72 hr. Las células fueron previamente incubadas con concentraciones finales de compuesto de ensayo durante 2 h y luego fueron estimuladas con LPS (0,1 μ g/mL; de *E. Coli*: O111:B4, Sigma) durante 4 h. El sobrenadante se recolectó para la determinación de las concentraciones de TNF α e IL-8 por ELISA sándwich (Duo-set, R&D systems). La inhibición de la producción de TNF α se calculó como un porcentaje de lo logrado por 10 μ g/mL de **BIRB796** en cada concentración de compuesto de ensayo mediante comparación contra vehículo de control. Se determinó el 50% de la concentración eficaz relativa (REC₅₀) a partir de la curva resultante de concentración - respuesta. Se calculó la inhibición de la producción de IL-8 en cada concentración de compuesto de ensayo mediante comparación con vehículo de control. Se determinó el 50% de concentración de inhibición (IC₅₀) a partir de la curva resultante de concentración - respuesta.

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

20 Se utilizó poli I:C en estos estudios como una simple imitación del virus de ARN. La mezcla de poli I:C–Oligofectamina (2% Oligofectamina \pm 1 μ g/mL Poli I:C, 25 μ L; Life Technologies e Invivogen Ltd., San Diego, CA, respectivamente) se transfectó en células BEAS2B (células epiteliales bronquiales humanas, ATCC). Las células fueron previamente incubadas con concentraciones finales de compuestos de ensayo durante 2 h y se determinó el nivel de expresión de ICAM-1 en la superficie celular por ELISA basado en células. En el punto de tiempo de 18 h luego de la transfección de poli I:C, las células se fijaron con 4% de formaldehído en PBS (100 μ L) y se apagó la peroxidasa endógena mediante la adición de tampón de lavado (100 μ L, 0,05% Tween en PBS: PBS–Tween) que contenía azida de sodio al 0,1% y peróxido de hidrógeno al 1%. Las células se lavaron con tampón de lavado (3 x 200 μ L). Después del bloqueo de los pocillos con 5% de leche en PBS–Tween (100 μ L) durante 1 h, las células se incubaron con anticuerpo ICAM-1 antihumano (50 μ L; Cell Signaling Technology, Danvers, MA) en 1% BSA PBS durante toda la noche a 4°C.

30 Las células se lavaron con PBS–Tween (3 x 200 μ L) y se incubaron con el anticuerpo secundario (100 μ L; IgG anticonejo conjugado a HRP, Dako Ltd., Glostrup, Dinamarca). Luego, las células se incubaron con sustrato (50 μ L) durante 2–20 min, seguido por la adición de solución de interrupción (50 μ L, 1N de H₂SO₄). Se detectó la señal de ICAM-1 mediante la lectura de la absorbancia a 450 nm contra una longitud de onda de referencia de 655 nm usando un espectrofotómetro. Luego, las células se lavaron con PBS–Tween (3 x 200 μ L) y se determinaron las cantidades celulares totales en cada pocillo mediante la lectura de la absorbancia a 595 nm después de la tinción con Violeta Cristal (50 μ L de una solución al 2% en PBS) y elución mediante solución de SDS al 1% (100 μ L) en PBS. Se corrigieron las lecturas medidas de OD450–655 para número de células dividiendo con la lectura OD595 en cada pocillo. La inhibición de la expresión de ICAM-1 se calculó en cada concentración de compuesto de ensayo por comparación con vehículo de control. Se determinó el 50% de la concentración inhibitoria (IC₅₀) a partir de la curva resultante de concentración – respuesta.

Ensayo de Mitosis Celular

45 Se separaron de la sangre entera los mononucleocitos de sangre periférica (PBMCs, por sus siglas en inglés) de sujetos sanos (Quintiles, Londres, Reino Unido) usando un gradiente de densidad (Histopaque®–1077, Sigma–Aldrich, Poole, Reino Unido). Los PBMCs (3 millones de células por muestra) fueron tratados posteriormente con 2% PHA (Sigma–Aldrich, Poole, Reino Unido) durante 48 h, seguido por una exposición de 20 h a concentraciones variables de compuestos de ensayo. A 2 h antes de la recolección, los PBMCs fueron tratados con demecolcina (0,1 μ g/mL; Life Technologies, Paisley, Reino Unido) para detener las células en metafase. Para observar las células mitóticas, PBMCs fueron permeabilizados y fijados agregando Intraprep (50 μ L; Beckman Coulter, Francia), y se tiñeron con anti–fosfo–histona 3 (0,26 ng/L; #9701; Cell Signaling) y yoduro de propidio (1 mg/mL; Sigma–Aldrich según lo descrito previamente (Muehlbauer P.A. *et al.*, *Mutation Res.*, 2003, 537, 117–130). Se observó la fluorescencia usando un citómetro de flujo ATTUNE (Life Technologies), que se vincula con los linfocitos. Se calculó el porcentaje de inhibición de la mitosis para cada tratamiento con relación al tratamiento con vehículo (0,5% de DMSO).

El Efecto de los Compuestos de Ensayo sobre la Viabilidad Celular: Ensayo de MTT

55 Las células U937 diferenciadas fueron previamente incubadas con cada compuesto de ensayo (concentración final 10 μ g/mL en 200 μ L de medio indicado más abajo) bajo dos protocolos: el primero para 4 h en 5% FCS medio RPMI1640 y el segundo en 10% FCS medio RPMI1640 para 24 h. Se reemplazó el sobrenadante con medio nuevo

(200 μ L) y se agregó solución inicial de MTT (10 μ L, 5 mg/mL) a cada pocillo. Después de la incubación durante 1 h, se eliminó el medio, se agregó DMSO (200 μ L) a cada pocillo y las placas se agitaron ligeramente durante 1 h antes de la lectura de la absorbancia a 550 nm. Se calculó el porcentaje de pérdida de la viabilidad celular para cada pocillo con relación al tratamiento con vehículo (0,5% de DMSO). Por lo tanto, se tabula un aumento aparente de la viabilidad celular para el tratamiento farmacológico con relación al vehículo como un porcentaje negativo.

Producción de citoquinas en macrófagos de esputo tratados con LPS de pacientes con EPOC

Los pacientes con EPOC inhalaban una solución nebulizada de 3% (p/v) solución salina hipertónica usando un nebulizador ultrasónico (Devillebiss, Carthage, MO) con respiración a volumen corriente durante 5 min. Este procedimiento fue repetido un máximo de tres veces hasta que se obtuvo suficiente esputo. Las muestras de esputo fueron homogenizadas y mezcladas vigorosamente usando un mezclador de vórtice en 0,02% v/v de solución de ditiotreitol (DTT). Las muestras se resuspendieron en PBS (40 mL) seguido por centrifugación a 1500 rpm a 4°C durante 10 min para obtener pellets celulares de esputo. Los pellets se lavaron con PBS (40mL). Luego las células de esputo se resuspendieron en 4 mL de medio libre de suero de macrófagos (macrófago-SFM, Life technologies, que contenía 20 U/mL de penicilina, 0,02 mg/mL de estreptomina y 5 μ g/mL de anfotericina B) y se sembraron en placa de 96 pocillos de elevada unión, seguido por incubación durante 1 h a 37 °C y a 5% de CO₂ para permitir que los macrófagos se adhieran al fondo de la placa. Las células en la placa se lavaron con macrófago nuevo-SFM (200 μ L/pocillo) para eliminar a los neutrófilos y otras células contaminadas. Se utilizaron las células adherentes (principalmente los macrófagos de esputo) en la placa para el análisis posterior. Se llevaron a cabo inducciones de esputo en la Unidad de Investigación de Fármacos de Quintiles en Guys Hospital y se obtuvo de parte de Quintiles la aprobación de ética y el consentimiento informado por escrito.

En caso apropiado, se agregó 1 μ L de una solución que contenía ya sea el compuesto de ensayo o el artículo de referencia en las concentraciones indicadas (ya sea 0,1 μ g/mL, 0,01 μ g/mL, o 0,001 μ g/mL) o alternativamente 1 μ L de DMSO como el control vehicular en cada pocillo (200 μ L en medio) y las células se incubaron durante 2 h. Las células fueron estimuladas con solución de LPS (50 μ L, concentración final: 1 μ g/mL) y se incubaron durante 18 h a 37 °C y 5% CO₂. Luego, el sobrenadante se recolectó y se guardó a -80 °C. Se utilizaron kits luminex adecuados para medir los analitos seleccionados. Después de descongelar el sobrenadante, se multiplexaron y se incubaron las perlas magnéticas de anticuerpo en una placa de 96 pocillos con solución estándar de base o el volumen apropiado de muestra durante toda la noche con agitación a 4 °C. Después de lavar dos veces con 200 μ L de tampón de lavado proporcionado por el kit por pocillo usando un lavador de placa magnético, las perlas se incubaron durante 1 h a TA con solución de anticuerpo conjugado con biotina proporcionada por el kit con agitación. Se agregó solución de estreptavidina durante 30 min con agitación a TA. Después del lavado con 200 μ L de tampón de lavado por pocillo, las perlas se resuspendieron en fluido envolvente (150 μ L) y se analizaron de inmediato. Se calculó el nivel de cada analito en el sobrenadante usando el programa informático Xcel Fit con una ecuación de 4 o 5 parámetros usando cada curva estándar. Se calcularon las inhibiciones de cada producción de citoquinas en cada concentración por comparación con el vehículo de control.

Liberación de IL-8 inducida por Rinovirus

Se obtiene rinovirus humano RV16 de la Recolección Americana de Cultivos Tipificados (American Type Culture Collection) (Manassas, VA). Se generan cepas virales infectando células MRC5 con HRV hasta que el 80% de las células eran citopáticas.

Se infectan células BEAS2B con HRV a un MOI de 1.2 y se incuban durante 1 h a 33 °C con suave agitación para promover la absorción. Luego las células se lavan con PBS, se agrega medio nuevo y las células se incuban durante otras 72 h. Se recolecta el sobrenadante para ensayo de las concentraciones de IL-8 usando un kit de elaboración de ELISA DuoSet (R&D systems, Minneapolis, MN). Los compuestos son agregados 2 h antes de la infección con HRV y 1 h después de la infección cuando se lava HRV no infectado.

45 Ensayos Celulares (no empleados en los Ejemplos)

Los siguientes ensayos celulares pudieron ser empleados para evaluar el compuesto de la presente invención:

Liberación de IL-8 inducida por Rinovirus (variación del método antes expuesto) y Expresión de ICAM-1

Se obtiene rinovirus humano RV16 de la Recolección Americana de Cultivos Tipificados (Manassas, VA). Se generan cepas virales infectando células Hela con HRV hasta que el 80% de las células eran citopáticas.

Se infectan células BEAS2B con HRV a un MOI de 5 y se incuban durante 1 a 2 h a 33 °C con agitación suave para promover la absorción. Luego las células se lavan con PBS, se agrega medio nuevo y las células se incuban durante otras 72 h. Se recolecta el sobrenadante para ensayo de las concentraciones de IL-8 usando un kit de elaboración de ELISA DuoSet (R&D systems, Minneapolis, MN).

Se determina el nivel de expresión de ICAM-1 de superficie celular mediante ELISA basado en células. A 72 h después de la infección, las células se fijaron con 4% de formaldehído en PBS. Después de templar la peroxidasa endógena agregando azida sódica al 0,1% y peróxido de hidrógeno al 1%, los pocillos se lavan con tampón de

lavado (0,05% Tween en PBS: PBS-Tween). Después del bloqueo del pocillo con 5% de leche en PBS-Tween durante 1 h, las células se incuban con anticuerpo ICAM-1 antihumano en 5% BSA PBS-Tween (1:500) durante toda la noche. Los pocillos se lavan con PBS-Tween y se incuban con el anticuerpo secundario (IgG anticonejo conjugado con HRP, Dako Ltd.). La señal de ICAM-1 se detecta agregando sustrato y por la lectura a 450 nm con una longitud de onda de referencia de 655 nm usando un espectrofotómetro. Luego, los pocillos se lavan con PBS-Tween y se determinaron las cantidades celulares totales en cada pocillo por la lectura de la absorbancia a 595 nm después de la tinción con Violeta Cristal y elución mediante solución de SDS al 1%. Las lecturas medidas de OD₄₅₀₋₆₅₅ son corregidas para el número de células dividiendo con la lectura de OD₅₉₅ en cada pocillo. Los compuestos son agregados 2 h antes de la infección con HRV y 1 a 2 h después de la infección cuando se lava el HRV no infectado.

10 Liberación de TNF α / IL-8 inducida por LPS en Células PBMC

Se separan de la sangre entera células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de sujetos sanos usando un gradiente de densidad (Lymphoprep, Axis-Shield Healthcare). Las PBMCs son sembradas en placas de 96 pocillos y tratadas con los compuestos a la concentración deseada durante 2 h antes de la adición de 1 ng/mL de LPS (*Escherichia Coli* 0111:B4 de Sigma Aldrich) durante 24 h bajo condiciones normales de cultivo tisular (37°C, 5% de CO₂). El sobrenadante es recolectado para la determinación de las concentraciones de TNF α por ELISA sándwich (Duo-set, R&D systems) y se leen en el lector de microplacas por fluorescencia (Varioskan® Flash, ThermoFisher Scientific). La concentración a 50% de inhibición (IC₅₀) de la producción de IL-8 y TNF α se calcula a partir de la curva de respuesta a la dosis.

Liberación de IL-2 e IFN gamma en células PBMC estimuladas con CD3/CD28

20 PBMCs de sujetos sanos son separadas de sangre entera usando un gradiente de densidades (Lymphoprep, Axis-Shield Healthcare). Las células se agregan a una placa de 96 pocillos previamente recubierta con una mezcla de anticuerpos monoclonales CD3/CD28 (0,3 μ g/mL eBioscience y 3 μ g/mL BD Pharmingen respectivamente). Luego se agrega el compuesto a la concentración deseada a los pocillos y la placa se deja durante 3 días bajo condiciones normales de cultivo de tejidos. Se recolectan los sobrenadantes y se determina la liberación de IL-2 e IFN gamma por ELISA Sándwich (Duo-set, R&D System). Se determina la IC₅₀ a partir de la curva de respuesta a la dosis.

Liberación de IL-8 inducida por IL-1 β en células HT29

30 Las células HT29, una línea celular humana de adenocarcinoma de colon, se plaquean en una placa de 96 pocillos (24 h) y son pretratadas con los compuestos a la concentración deseada durante 2 h antes de la adición de 5 ng/mL de IL-1 β (Abcam) durante 24 h. Los sobrenadantes son recolectados para la cuantificación de IL-8 por ELISA Sándwich (Duo-set, R&D System). Se determina la IC₅₀ a partir de la curva de respuesta a la dosis.

Proliferación de células T

35 PBMCs de sujetos sanos son separadas de sangre entera usando un gradiente de densidades (Lymphoprep, Axis-Shield Healthcare). La fracción de linfocitos es primero enriquecida para células T CD4+ mediante clasificación celular magnética negativa de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotec 130-091-155). Luego las células T CD4+ no sometidas anteriormente al tratamiento de ensayo (naïve) se separan usando selección magnética positiva de células CD45RA+ usando microperlas de acuerdo con las instrucciones del fabricante (130-045-901). Las células se colocan en placa a 2x10⁵ células por pocillo en 100 μ L de RPMI/10%FBS en una placa con fondo plano de 96 pocillos (Corning Costar). Se diluyen 25 μ L de compuesto de ensayo hasta la concentración apropiada (8x conc. final) en medio normal y se agregan a pocillos por duplicado en la placa para lograr un rango de respuesta a la dosis de 0,03 ng/mL – 250 ng/mL. Se agrega DMSO como un control negativo. Las placas se dejan preincubar durante 2 h antes de la estimulación con 1 μ g/mL de anti-CD3 (OKT3; eBioscience). Después de 72 h, el medio en cada pocillo es reemplazado por 150 μ L de medio nuevo que contiene 10 μ M de BrdU (Roche). Luego de 16 h, se retira el sobrenadante, la placa se seca y las células se fijan agregando 100 μ L de solución fijadora/desnaturadora a cada pocillo durante 20 min de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Roche). Las placas se lavan una vez con PBS antes de la adición del anticuerpo de detección anti-BrdU y se incuban durante 90 min a temperatura ambiente. Luego, las placas son lavadas suavemente 3x con el tampón de lavado provisto y elaborado por la adición de 100 μ L de solución de sustrato. La reacción se detiene mediante la adición de 50 μ L de H₂SO₄ 1 M, y se lee para absorbancia a 450 nm en un lector de placas (Varioskan® Flash, ThermoFisher Scientific). Se determina la IC₅₀ a partir de la curva de respuesta a la dosis.

50 Ensayo de Biopsia Humana

55 Se obtienen biopsias de la mucosa intestinal de las regiones inflamadas del colon de pacientes con EII. El material de biopsia se corta en pequeños pedazos (2–3 mm) y se coloca sobre mallas de acero en una cámara de cultivo orgánico a 37 °C en una atmósfera de 5% CO₂/95% O₂ en medio libre de suero. Se agregan el control de DMSO o los compuestos de ensayo a la concentración deseada al tejido y se incuban durante 24 h en la cámara de cultivo de órganos. El sobrenadante se recolecta para la determinación de los niveles de IL-6, IL-8, IL-1 β y TNF α mediante R&D ELISA. Se calcula el porcentaje de inhibición de la liberación de citoquinas mediante los compuestos de ensayo con relación a la liberación de citoquinas determinada para el control de DMSO (100%).

Liberación de IL-2 e IFN γ en células LPMC estimuladas con CD3/CD28 de pacientes con EII (Enfermedad Inflamatoria Intestinal)

Las células mononucleares de la lámina propia (LPMCs) se aíslan y se purifican de la mucosa de EII inflamada de muestras quirúrgicas o de la mucosa normal de las muestras quirúrgicas de la siguiente manera:

- 5 La mucosa es retirada de las capas más profundas de las muestras quirúrgicas con un escalpelo y se corta en fragmentos de 3–4 mm de tamaño. El epitelio se remueve lavando los fragmentos de tejido tres veces con EDTA 1 mM (Sigma–Aldrich, Poole, Reino Unido) en HBSS (Sigma–Aldrich) con agitación usando un agitador magnético, descartando el sobrenadante después de cada lavado. La muestra es posteriormente tratada con colagenasa tipo 1A (1 mg/mL; Sigma–Aldrich) durante 1 h con agitación a 37 °C. Luego, la suspensión celular resultante se filtra usando un filtro celular de 100 μ m, se lava dos veces, se resuspende en medio RPMI–1640 (Sigma–Aldrich) que contiene suero de ternero fetal 10%, 100 U/mL de penicilina y 100 μ g/mL de estreptomina, y se utiliza para el cultivo celular.

- 15 Las LPMCs recientemente aisladas (2×10^5 células/pocillo) son estimuladas con 1 μ g/mL de α -CD3/ α -CD28 durante 48 h en presencia de control de DMSO o concentraciones apropiadas de compuesto. Después de 48 h, el sobrenadante es retirado y ensayado para determinar la presencia de TNF α e IFN γ por R&D ELISA. Se calcula el porcentaje de inhibición de la liberación de citoquinas mediante los compuestos de ensayo con relación a la liberación de citoquinas determinada para el control de DMSO (100%).

Inhibición de la liberación de citoquinas de miofibroblastos aislados de pacientes con EII

Los miofibroblastos de la mucosa inflamada de EII se aíslan de la siguiente manera:

- 20 La mucosa se disecciona y se descarta y se cultivan muestras de mucosa de 1 mm de tamaño a 37 °C en una incubadora de CO₂ humidificada en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, por sus siglas en inglés, Sigma–Aldrich) suplementado con 20% FBS, 1% aminoácidos no esenciales (Invitrogen, Paisley, Reino Unido), 100 U/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomina, 50 μ g/mL de gentamicina, y 1 μ g/mL de anfotericina (Sigma–Aldrich). Las colonias establecidas de miofibroblastos se siembran en frascos de cultivo de 25 cm² y se cultivan en 25 DMEM suplementado con 20% FBS y antibióticos hasta por lo menos pasaje 4 para proporcionar una cantidad suficiente para utilizar en experimentos de estimulación.

- 30 Luego las monocapas subconfluentes de miofibroblastos se siembran en placas de 12 pocillos a 3×10^5 células por pocillo se privan de alimento en medio libre de suero durante 24 h a 37 °C, 5% CO₂ antes de su cultivo durante 24 h en presencia de control de DMSO o concentraciones apropiadas de compuesto. Después de 24 h el sobrenadante es retirado y analizado para determinar la presencia de IL–8 e IL–6 por R&D ELISA. Se calcula el porcentaje de inhibición de la liberación de citoquina mediante los compuestos de ensayo con relación a la liberación de citoquina determinada para el control de DMSO (100%).

Desgranulación de neutrófilos humanos

Los neutrófilos son aislados de sangre periférica humana de la siguiente manera:

- 35 Se recolecta sangre por venopunción y es anticoagulada por la adición de 1:1 EDTA: solución salina tamponada con fosfato estéril (PBS, sin Ca⁺/Mg⁺). Se agrega dextrano (3% p/v) (1 parte de solución de dextrano a 4 partes de sangre) y la sangre se deja reposar durante aproximadamente 20 min a TA. El sobrenadante es cuidadosamente colocado sobre un gradiente de densidad (Lymphoprep, Axis–Shield Healthcare) y se centrifuga (15 min, 2000 rpm, sin freno). El sobrenadante se separa por aspiración y el pellet celular se resuspende en solución salina estéril (0,2%) durante no más de 60 segundos (para lisar los glóbulos rojos contaminantes). Luego se agrega 10 veces el volumen de PBS y las células se centrifugan (5 min, 1200 rpm). Las células se resuspenden en HBSS+ (solución salina equilibrada de Hank (sin rojo fenol) que contiene citocalasina B (5 μ g/mL) y CaCl₂ 1 mM) para lograr 5×10^6 células/mL.

- 45 Se agregan 5×10^4 células a cada pocillo de una placa de 96 pocillos con fondo en V y se incuban (30 min, 37 °C) con la concentración apropiada de compuesto de ensayo (0,3–1000 ng/mL) o vehículo (DMSO, 0,5% de conc. final). La desgranulación es estimulada por la adición de fMLP (conc. final 1 μ M) y luego de una incubación adicional (30 min, 37 °C) las células son removidas por centrifugación (5 min, 1500 rpm) y los sobrenadantes son transferidos a una placa de 96 pocillos de fondo plano. Se agrega un volumen igual de tetrametilbenzidina (TMB) y después de 10 min la reacción es terminada mediante la adición de un volumen igual de ácido sulfúrico (0,5 M) y se lee la absorbancia a 450 nm (fondo a 655 nm sustraído). Se determina el 50% de la concentración inhibitoria (IC₅₀) a partir de la curva resultante de concentración – respuesta.

Ensayo de citotoxicidad celular

- 55 Se agregan 5×10^4 células TK6 (línea de células T linfoblásticas) a la cantidad apropiada de pocillos de una placa de 96 pocillos en 195 μ L de medio (RPMI suplementado con suero bovino fetal al 10%). Se agregan 5 μ L de control de DMSO (concentración final 0,5% v/v) o compuesto de ensayo (concentración final ya sea 5 o 1 μ g/mL) a los pocillos

y se incuban a 37 °C, 5% CO₂. Después de 24 h, la placa se centrifuga a 1300 rpm durante 3 min y el sobrenadante se descarta. Luego, las células son resuspendidas en 7,5 µg/mL de yoduro de propidio (PI, por sus siglas en inglés) en PBS. Después de 15 min, las células son analizadas mediante citometría de flujo (BD accuri). Se calcula el % de viabilidad como el % de células que son PI negativas en los pocillos de ensayo normalizados al control de DMSO.

5 ***Análisis In Vivo: Farmacodinámica y Actividad Antiinflamatoria (empleado en los Ejemplos)***

Se emplearon los siguientes análisis *in vivo* para evaluar el compuesto de la presente invención y los resultados son proporcionados más adelante.

Acumulación de neutrófilos inducida por LPS en ratones

10 Ratones Balb/c no privados de alimento recibieron dosis, por ruta intratraqueal, de vehículo, o de la sustancia de ensayo en los tiempos indicados (dentro del rango de 2–8 h) antes de la estimulación de la respuesta inflamatoria por aplicación de un desafío con LPS. En T = 0, los ratones fueron colocados en una cámara de exposición y fueron expuestos a LPS (7,0 mL, 0,5 mg/mL de solución en PBS durante 30 min). Después de otras 8 h los animales fueron anestesiados, sus tráqueas fueron canuladas y se extrajo BALF por infusión y luego se extrajo de sus pulmones 1,0 mL de PBS *vía* el catéter traqueal. Se midieron los recuentos de glóbulos blancos totales y diferenciales en las muestras de BALF usando un hemocitómetro Neubaur. Se prepararon frotis 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 fueron contadas usando microscopía de inmersión en aceite. Los datos para las cantidades de neutrófilos en BAL se muestran como media ± S.E.M. (error estándar de la media). Se calculó el porcentaje de inhibición de la acumulación de neutrófilos para cada tratamiento con relación al tratamiento con vehículo.

20 *Modelo de Humo de Cigarrillo*

Ratones A/J (machos, 5 semanas de edad) fueron expuestos al humo de cigarrillo (4% humo de cigarrillo, diluido con aire) durante 30 min/día durante 11 días usando un Sistema de Inhalación de Humo de Tabaco para animales pequeños (Modelo SIS-CS; Sibata Scientific Technology, Tokio, Japón). Se administraron las sustancias del ensayo por *vía* intranasal (35 µL de solución en 10% de DMSO/PBS) una vez al día durante 3 días después de la exposición final al humo del cigarrillo. A las 12 h después de la última dosis, cada uno de los animales fue anestesiado, la tráquea canulada y se recolectó fluido de lavado bronquioalveolar (BALF, por sus siglas en inglés). Se determinaron las cantidades de macrófagos alveolares y neutrófilos por análisis FACS (EPICS[®] ALTRA II, Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, EE. UU.) usando anticuerpo MOMA2 antirratón (macrófago) o anticuerpo 7/4 antirratón (neutrófilo). BALF se centrifugó y el sobrenadante se recolectó. Se cuantificó el nivel de quimioatrayente de queratinocitos (KC; CXCL1) en BALF usando un kit de ELISA Quantikine[®] de ratón KC (R&D systems, Inc., Minneapolis, MN, EE. UU.).

Análisis In Vivo: Farmacodinámica y Actividad Antiinflamatoria (no empleado en los Ejemplos)

Se podrían haber empleado los siguientes análisis *in vivo* para evaluar el compuesto de la presente invención.

Colitis inducida por DSS en ratones

35 Ratones BDF1 macho, de 10-12 semanas de edad, no sometidos a ayuno reciben dosificación por *vía* oral mediante sonda dos veces al día de vehículo, artículo de referencia (5-ASA) o compuesto de ensayo un día antes (Día 1) de la estimulación de la respuesta inflamatoria por tratamiento con DSS. En el Día 0 del estudio se administra DSS (5% p/v) en el agua para beber seguido por dosificación dos veces al día del vehículo (5 mL/kg), referencia (100 mg/kg) o compuesto de ensayo (5 mg/kg) durante 7 días. El agua para beber con DSS se repone cada 3 días. Durante el estudio los animales son pesados todos los días y se realizan observaciones de las heces fecales y se registran como un resultado, en base a la consistencia de las heces fecales. Al momento del sacrificio en el Día +6 se extrae el intestino grueso y se registra la longitud y el peso. Se toman secciones del colon para el análisis MPO para determinar la infiltración de neutrófilos o para el resultado de histopatología para determinar la severidad de la enfermedad.

45 *Colitis inducida por TNBS en ratones*

Ratones BDF1 macho, de 10-12 semanas de edad, no sometidos a ayuno reciben dosificación por *vía* oral mediante sonda dos veces al día de vehículo (5 mL/kg), artículo de referencia (Budesonide 2,5 mg/kg) o compuesto de ensayo (1, 5 o 50 mg/kg) un día antes (Día -1) de la estimulación de la respuesta inflamatoria por tratamiento con ácido 2,4,6-trinitrobenzensulfónico (TNBS) (15 mg/mL en 50% de etanol / 50% de solución salina). En el Día 0 del estudio se administra TNBS (200 µL) por *vía* intracolónica por un catéter de plástico seguido por la dosificación dos veces al día del vehículo, el artículo de referencia o del compuesto de ensayo durante 2 o 4 días. Durante el estudio, los animales son pesados todos los días y se realizan observaciones de las heces fecales y se registran como un resultado, en base a la consistencia de las heces fecales. Al momento del sacrificio en el Día 2 (o Día 4) se extrae el intestino grueso y se registra el largo y el peso. Se toman secciones del colon para el análisis MPO para determinar la infiltración de neutrófilos o para el resultado que involucra histopatología para determinar la severidad de la enfermedad.

Transferencia adoptiva en ratones

En el día 0 del estudio, se liquidan ratones Balb/C hembra y se obtienen los bazos para aislamiento celular CD45RB^{elevado} (Usando el protocolo de Separación celular EII SCID). Aproximadamente 4×10^5 células/mL de células CD45RB^{elevado} son luego inyectadas IP (100 μ L/ratón) en animales SCID hembra. En el día 14 del estudio, los ratones se pesan y se distribuyen al azar en grupos de tratamiento en base al peso corporal. En el día 21, los compuestos son administrados dos veces al día, por vía oral mediante sonda, en un vehículo de aceite de maní en los niveles de dosis expuestos a continuación y un volumen de dosis de 5 mL/kg. El tratamiento continúa hasta el día 42 del estudio, punto en el cual los animales son sometidos a necropsia 4 h después de la administración a.m. Se registra el largo y el peso del colon y se utiliza como un criterio de valoración secundario en el estudio como una medición del edema de colon. El colon es luego dividido en seis secciones transversales, cuatro de las cuales se utilizan para el resultado histopatológico (criterio de valoración primario) y dos se homogenizan para el análisis de citoquina. Los datos mostrados son el % de inhibición de la ventana de inducción entre animales no expuestos previamente al tratamiento de ensayo (naïve) y animales vehículo, donde una inhibición superior indica más cercanía al fenotipo, sin tratamiento previo (naïve), sin enfermedad.

15 **Resultados del Análisis *in vitro* e *in vivo***

Los resultados del análisis *in vitro* para el compuesto de la invención (forma de base libre) son mostrados en la Tabla 2, Tabla 3, Tabla 4 y Tabla 5 a continuación y en la Figura 9. Se realiza una comparación con un Compuesto de Referencia estructuralmente relacionado *N*-(4-(4-(3-(3-*terc*-butil-1-*p*-tolil-1*H*-pirazol-5-il)ureido)naftalen-1-iloxi)piridin-2-il)-2-metoxiacetamida (Ejemplo 1 de WO2010/112936), el cual ha sido previamente descrito como un potente agente antiinflamatorio con efectos antivirales, así como también con propionato de fluticasona el cual es un agente antiinflamatorio bien conocido.

Tabla 2: Perfil Enzimático de p38 MAPK α y γ , HCK, c-Src, Syk y GSK3 α de los Compuestos de Ensayo

Compuesto de Ensayo	Valores IC ₅₀ para Inhibición Enzimática (nM)					
	p38 MAPK α	p38 MAPK γ	HCK	c-Src	Syk	GSK3 α
Compuesto de referencia	10	87	7	11	42	18
Compuesto de la invención	26	152	55	199	>15955	>15105

Tabla 3: Inhibición de Liberación de TNF α e IL-8 inducida por LPS y Expresión de ICAM Inducida por PolilC para los Compuestos de Ensayo

Compuesto de ensayo	Liberación Inducida por LPS (nM)		PolilC / ICAM1 (nM)
	IL-8	TNF α	
	IC ₅₀ (dU937)	REC ₅₀ (dU937)	IC ₅₀ (BEAS2B)
Compuesto de referencia	1,2	0,7	3,8
Compuesto de la invención	11,4	5,5	61,1

Tabla 4: Efecto de los compuestos de ensayo sobre la Viabilidad Celular

Compuesto de ensayo	Ensayo MTT ¹		Ensayo de Mitosis ²
	Viabilidad celular en punto de tiempo indicado en células d-U937		Inhibición (%) de mitosis
	4h	24h	A 5 ug/mL
Compuesto de referencia	-	+	93 ± 5
Compuesto de la invención	-	-	18 ± 7

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

2. Media ± SEM

- 5 **Tabla 5:** Efecto de los compuestos de ensayo sobre la producción de citoquina en macrófagos de esputo tratados con LPS de pacientes con EPOC

Compuesto de ensayo	Porcentaje de inhibición a 0,1 µg/mL
	IL-6
Propionato de fluticasona	29 ± 21
Compuesto de la invención	48 ± 9

Síntesis de Resultados del Análisis *in vitro* e *in vivo*

El compuesto de la invención demuestra un perfil en ensayos *in vitro* e *in vivo* consistente con una buena actividad antiinflamatoria. Tiene actividad muy débil en Syk y GSK3α quininas (Tablas 2 y 3).

- 10 El compuesto de la invención muestra una actividad marcadamente inferior en sistemas de ensayo que miden su impacto sobre la viabilidad celular lo cual indica que probablemente posea un índice terapéutico superior con respecto al Compuesto de referencia (Tabla 4).

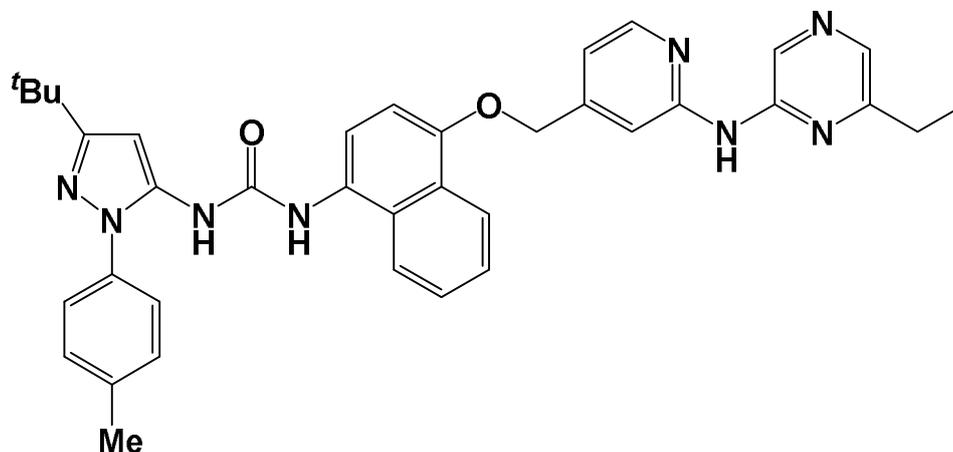
El compuesto de la invención mostró una actividad antiinflamatoria superior en comparación con el propionato de fluticasona en el sistema de ensayo empleado (Tabla 5).

- 15 El compuesto de la invención muestra una inhibición dependiente de la dosis de IL-8 inducida por HRV (Figura 9).

Resumidamente, estos resultados sugieren que el compuesto de la invención tiene propiedades antiinflamatorias similares al Compuesto de referencia descrito con anterioridad y, ventajosamente, se asocia con un índice terapéutico superior.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I):



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

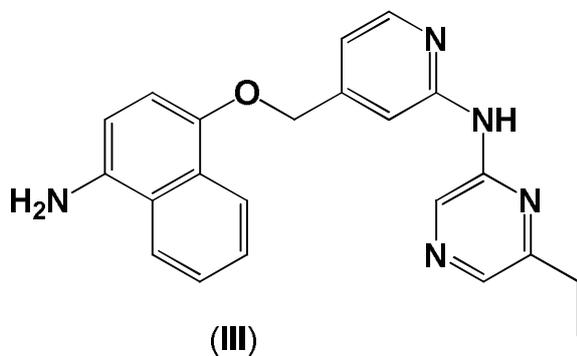
- 5 2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 en la forma de su sal maleato.
3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 2 en la forma de su polimorfo cristalino Forma 2.
4. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 opcionalmente en combinación con uno o más diluyentes o portadores farmacéuticamente aceptables.
- 10 5. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en forma particulada en combinación con lactosa particulada.
6. Un producto combinado que comprende:
- (A) un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3; y
- (B) uno o más agentes terapéuticos diferentes,
- 15 donde cada uno de los componentes (A) y (B) es formulado en mezcla con un adyuvante, diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.
7. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 para usar como un medicamento en combinación con uno o más ingredientes activos diferentes.
8. Un producto combinado de acuerdo con la reivindicación 6 o un compuesto para usar de acuerdo con la
 20 reivindicación 7, donde el o los diferentes agentes terapéuticos o ingredientes activos se seleccionan del grupo que consiste en esteroides, agonistas beta, xantinas, anticolinérgicos, antagonistas muscarínicos, inhibidores de PI3 quinasa y agentes antivirales.
9. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, una composición de acuerdo con la reivindicación 4 o la reivindicación 5 o un producto combinado de acuerdo con la reivindicación 6 o la
 25 reivindicación 8 para usar como un medicamento.
10. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, una composición de acuerdo con la reivindicación 4 o la reivindicación 5, o un producto combinado de acuerdo con la reivindicación 6 o la
 30 reivindicación 8 para utilizar en el tratamiento de EPOC (incluyendo bronquitis crónica y enfisema), asma, asma pediátrico, fibrosis quística, sarcoidosis, fibrosis pulmonar idiopática, rinitis alérgica, rinitis, sinusitis, conjuntivitis alérgica, conjuntivitis, queratoconjuntivitis seca (sequedad ocular), glaucoma, retinopatía diabética, edema macular (incluyendo edema macular diabético), oclusión de la vena central de la retina (OVCR), degeneración macular relacionada con la edad seca y/o húmeda (DMAE), inflamación causada por catarata posoperatoria, uveítis (incluyendo uveítis posterior, anterior y panuveítis), rechazo de injerto de córnea y de trasplante de células limbares, enteropatía sensible al gluten (enfermedad celíaca), esofagitis eosinófila, enfermedad intestinal de injerto versus huésped, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, EII, artritis reumatoidea u osteoartritis.
- 35

11. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, una composición de acuerdo con la reivindicación 4 o la reivindicación 5, o un producto combinado de acuerdo con la reivindicación 6 o la reivindicación 8 para utilizar en el tratamiento de EPOC, asma, queratoconjuntivitis seca (sequedad ocular), uveítis (incluyendo uveítis posterior, anterior y panuveítis), enfermedad de Crohn o colitis ulcerativa, especialmente EPOC o asma.

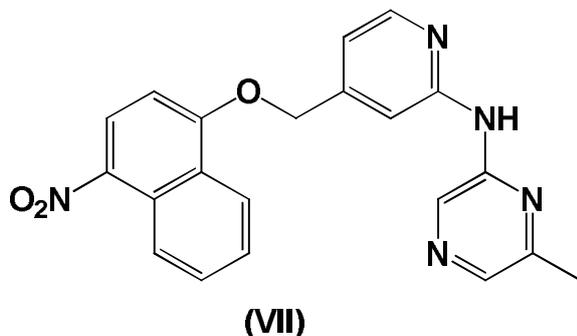
12. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, una composición de acuerdo con la reivindicación 4 o la reivindicación 5, o un producto combinado de acuerdo con la reivindicación 6 o la reivindicación 8 para utilizar en el tratamiento de las exacerbaciones de enfermedades inflamatorias, en particular de las exacerbaciones virales, o en el tratamiento de las infecciones virales, en pacientes con una o más afecciones crónicas tales como insuficiencia cardíaca congestiva, EPOC, asma, diabetes, cáncer y/o en pacientes inmunosuprimidos, por ejemplo luego de un trasplante de órgano.

13. Un compuesto, una composición o un producto combinado de acuerdo con la reivindicación 12 para utilizar en combinación con terapia antiviral tales como zanamivir, oseltamivir (por ejemplo fosfato de oseltamivir) peramivir o laninamivir.

14. Un compuesto de fórmula (III)

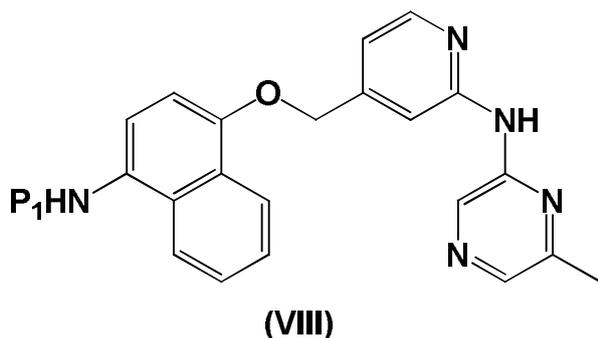


o un derivado del mismo en el cual el grupo amino está protegido, o una sal del mismo; o un compuesto de fórmula (VII)



o una sal del mismo.

15. Un compuesto de fórmula (III) de acuerdo con la reivindicación 14, el cual es un compuesto de fórmula (VIII)



donde P_1 representa un grupo protector de amina;
o una sal del mismo.

Figura 1:

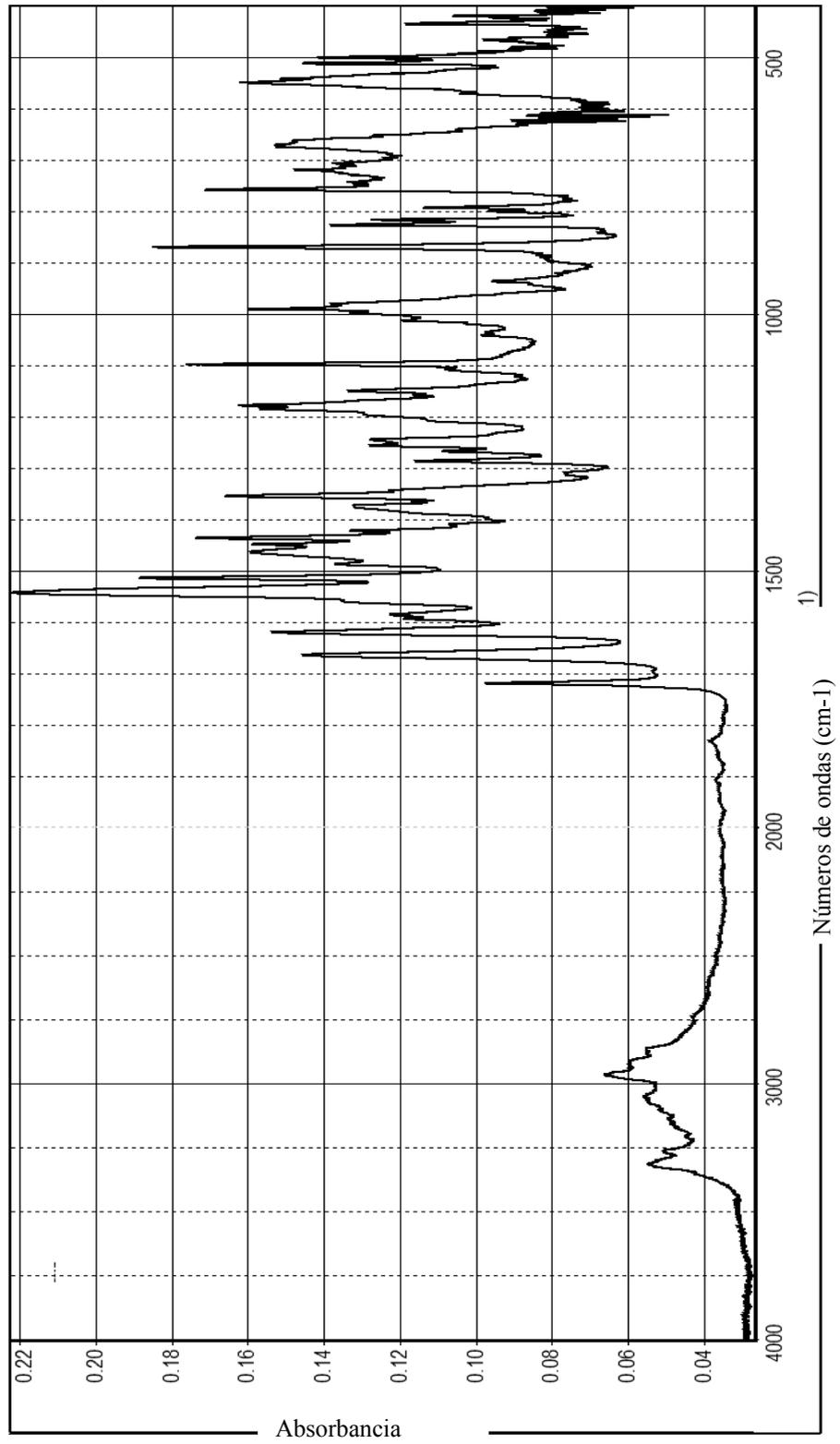


Figura 2:

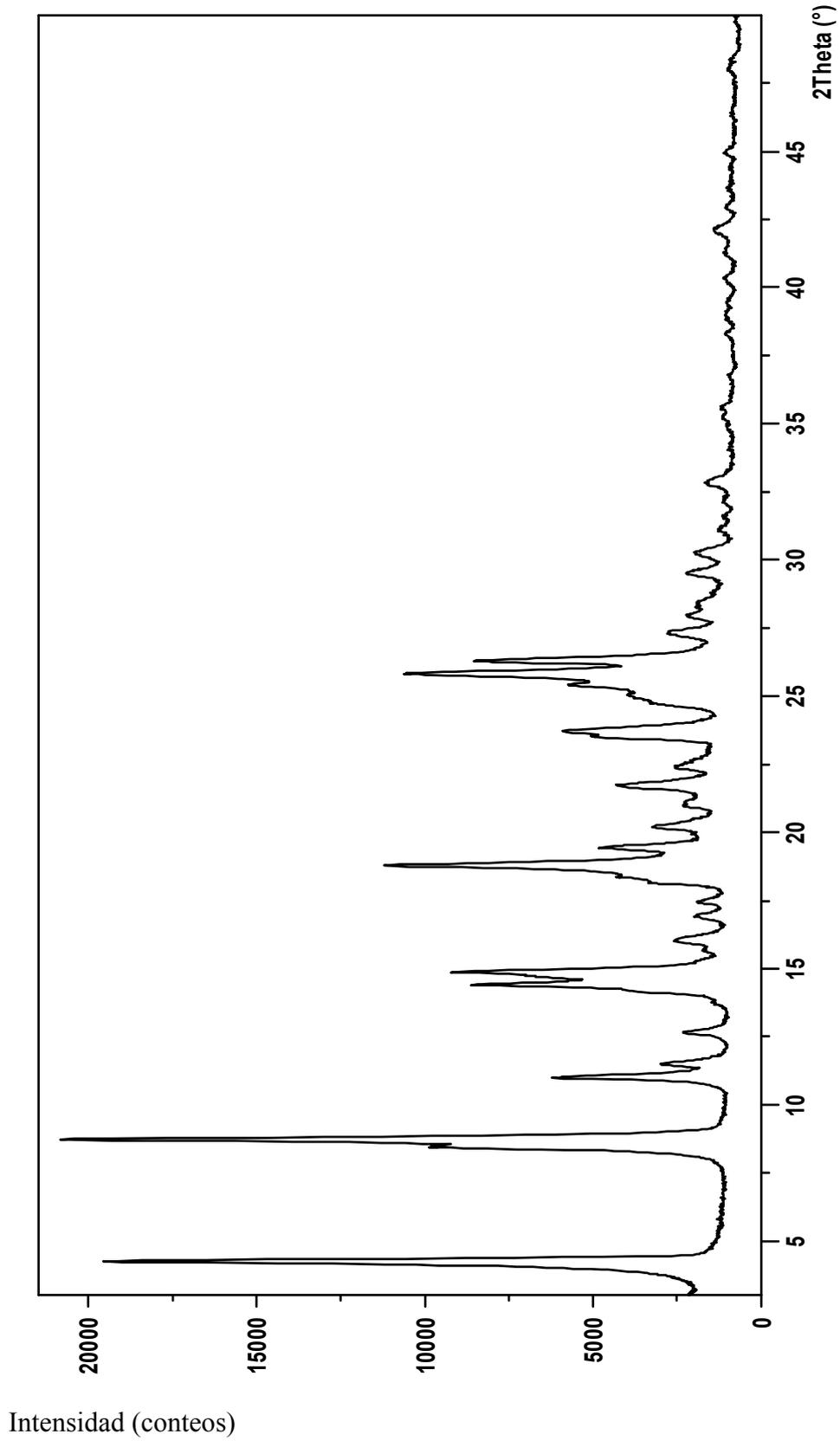


Figura 3:

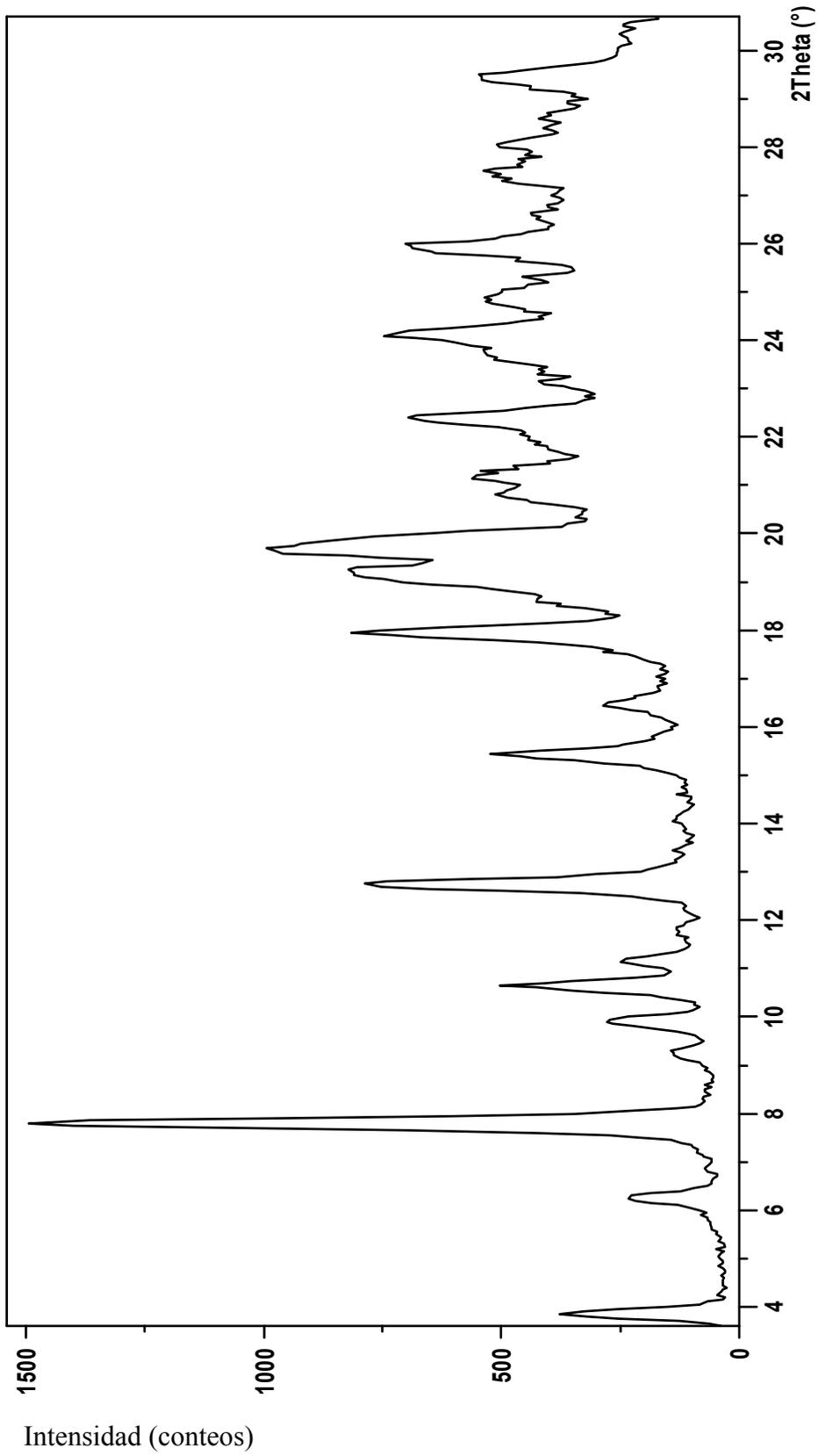


Figura 4:

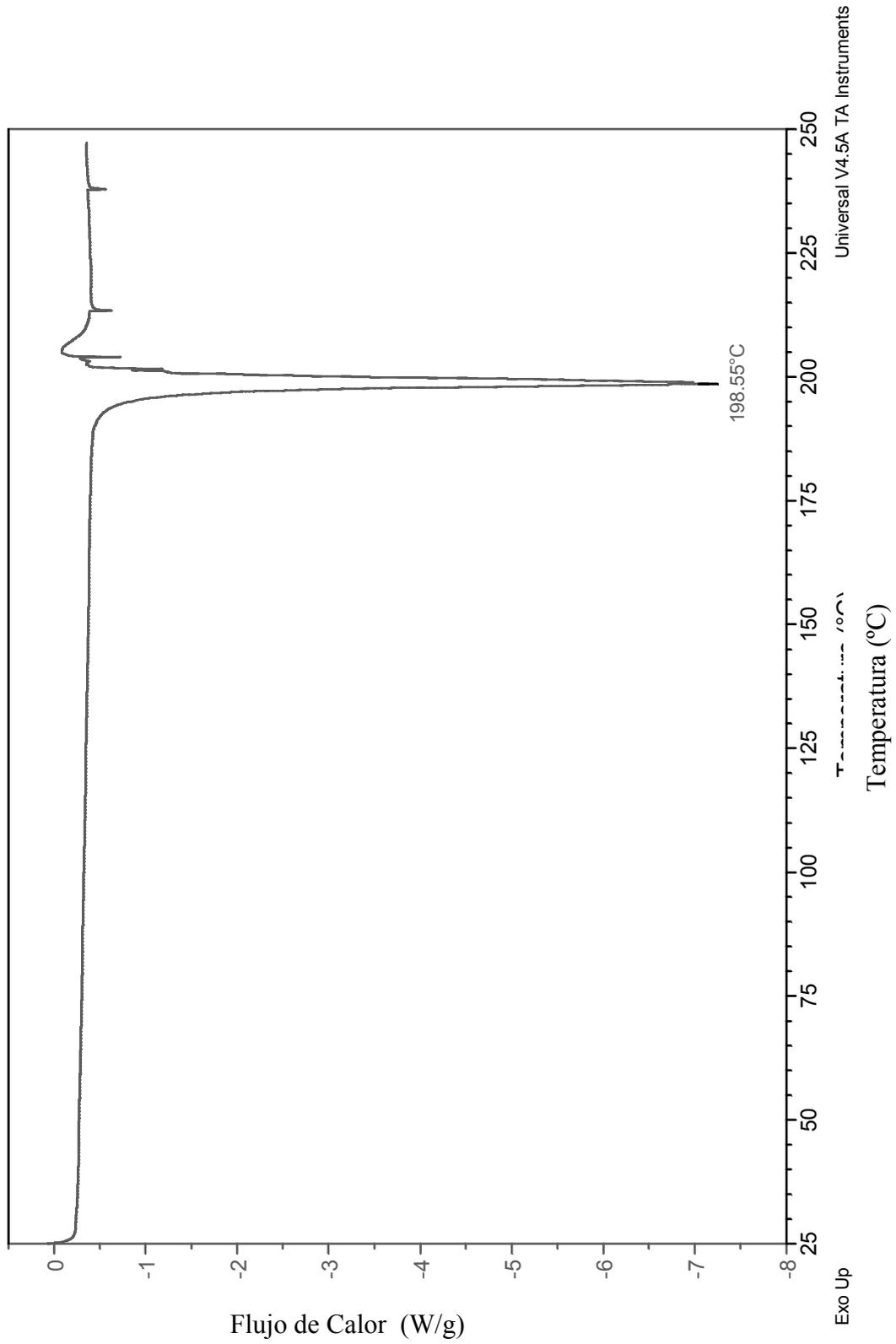


Figura 5:

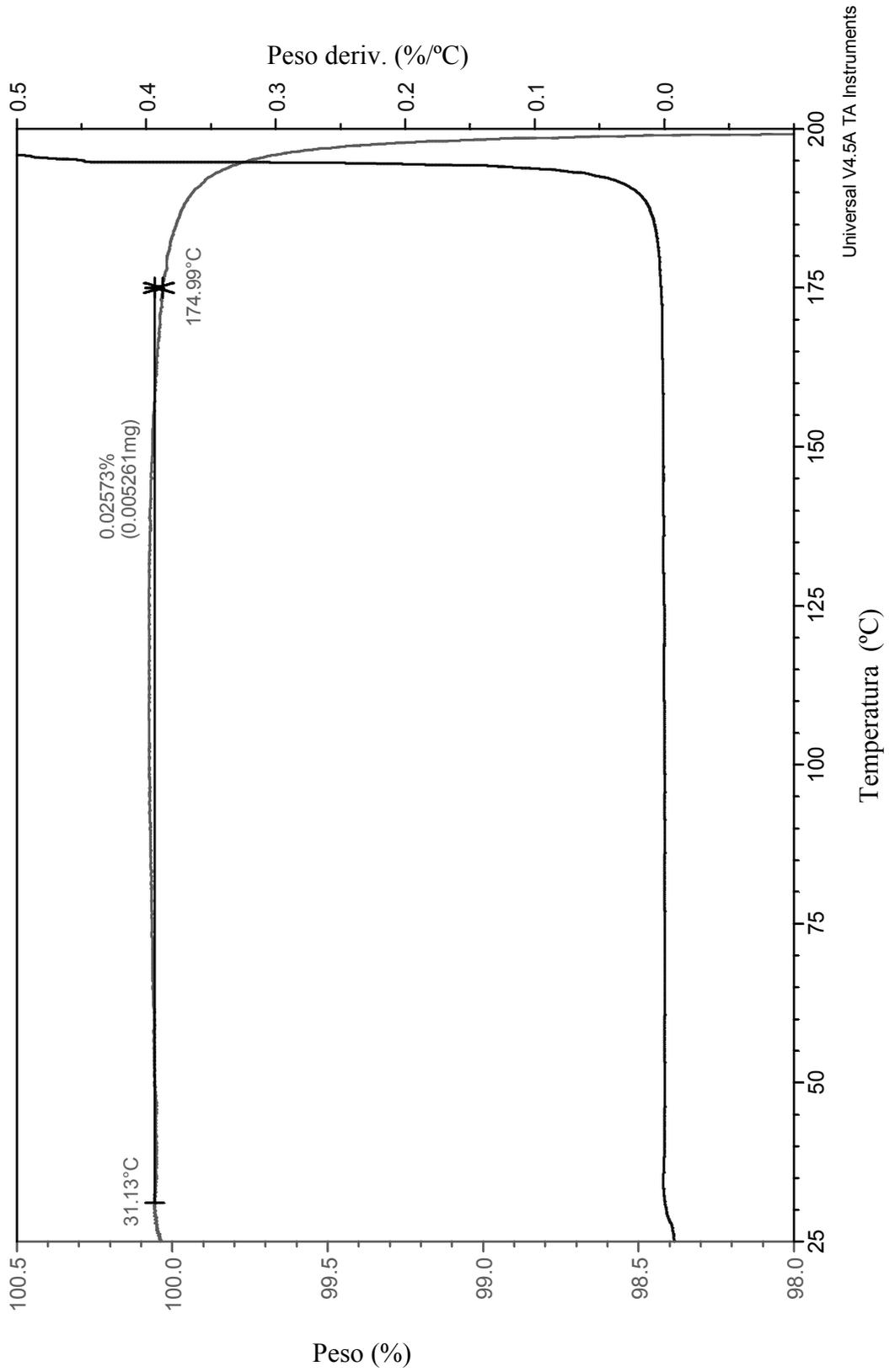


Figura 6:

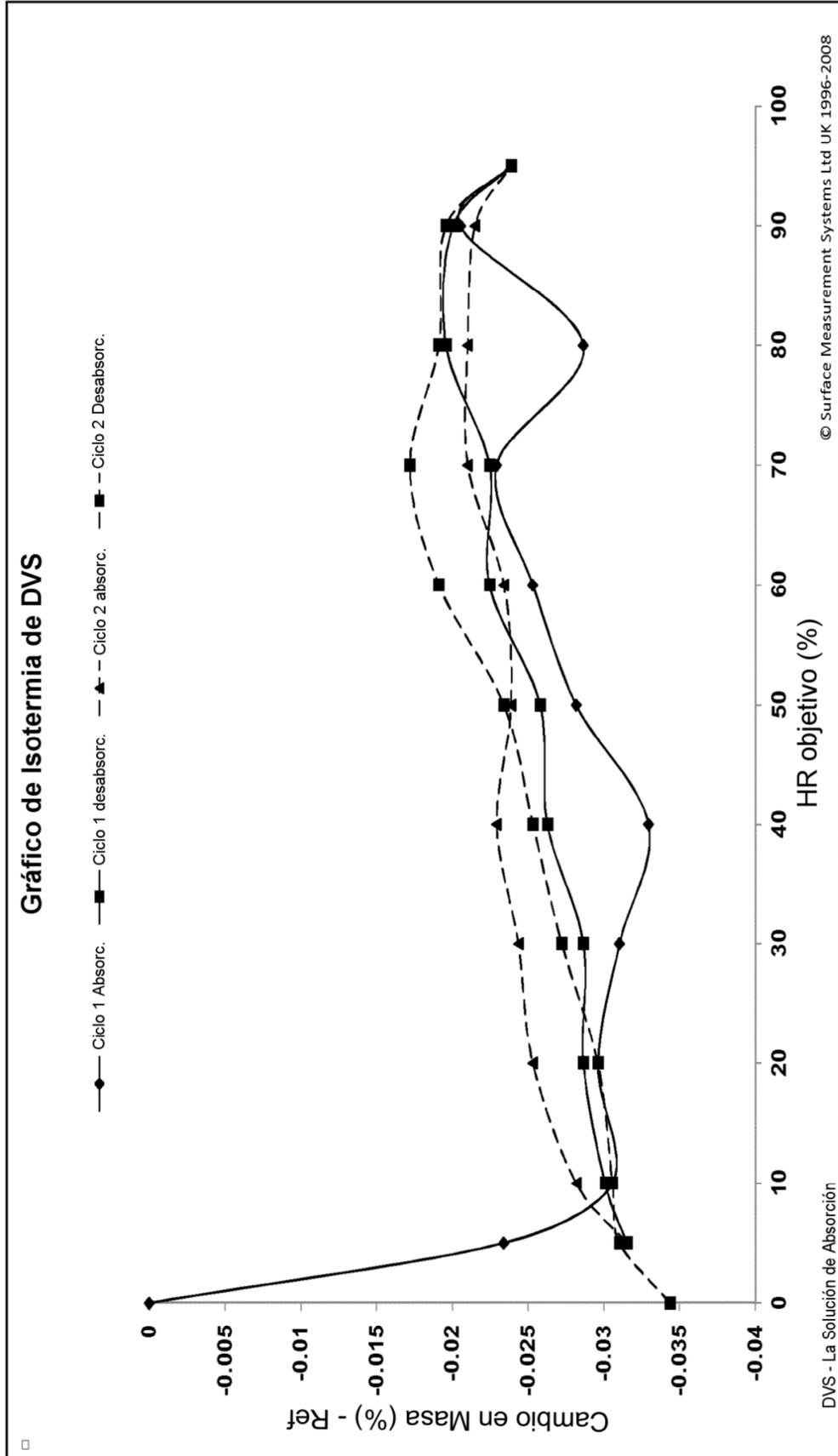


Figura 7:

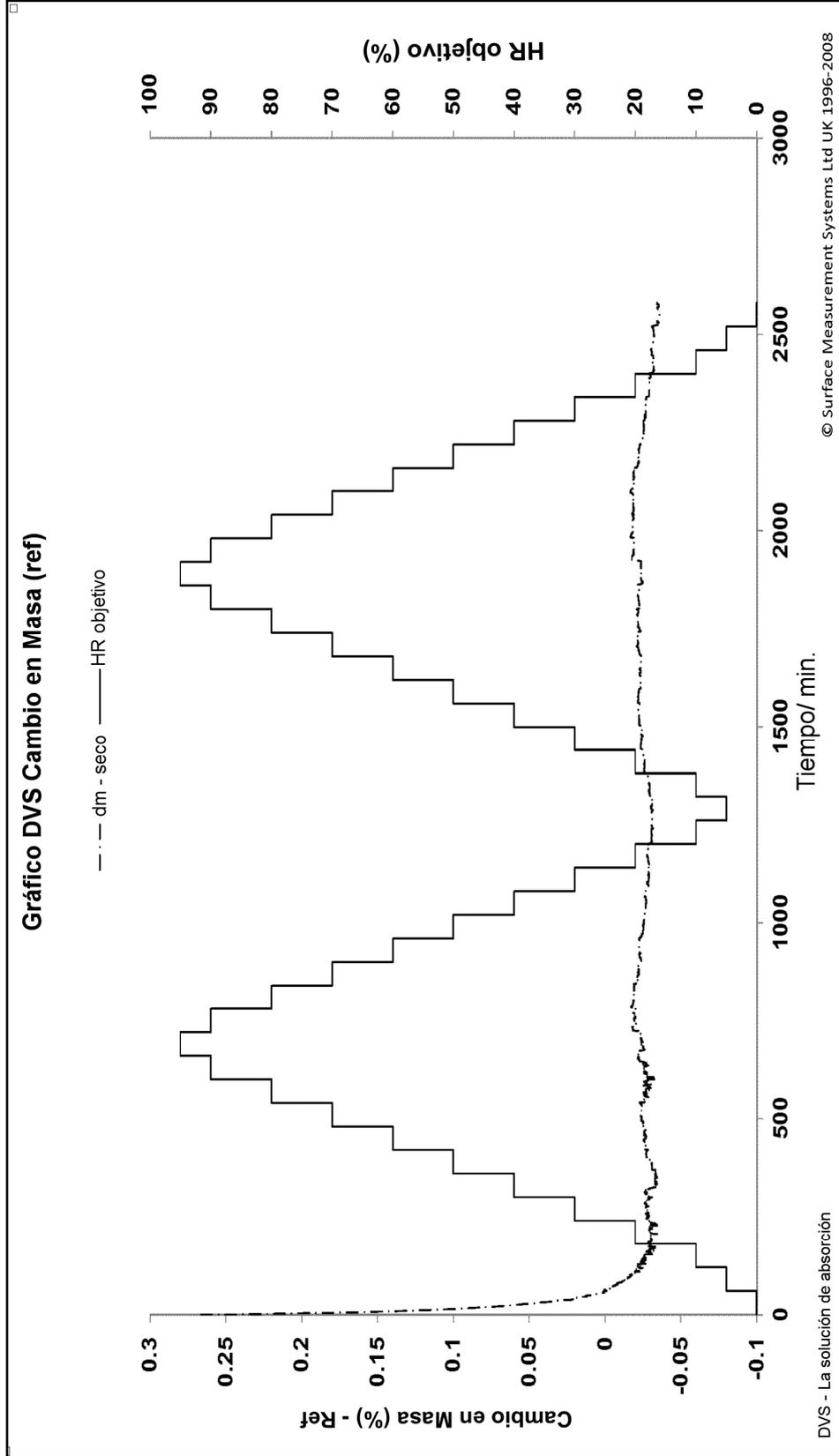
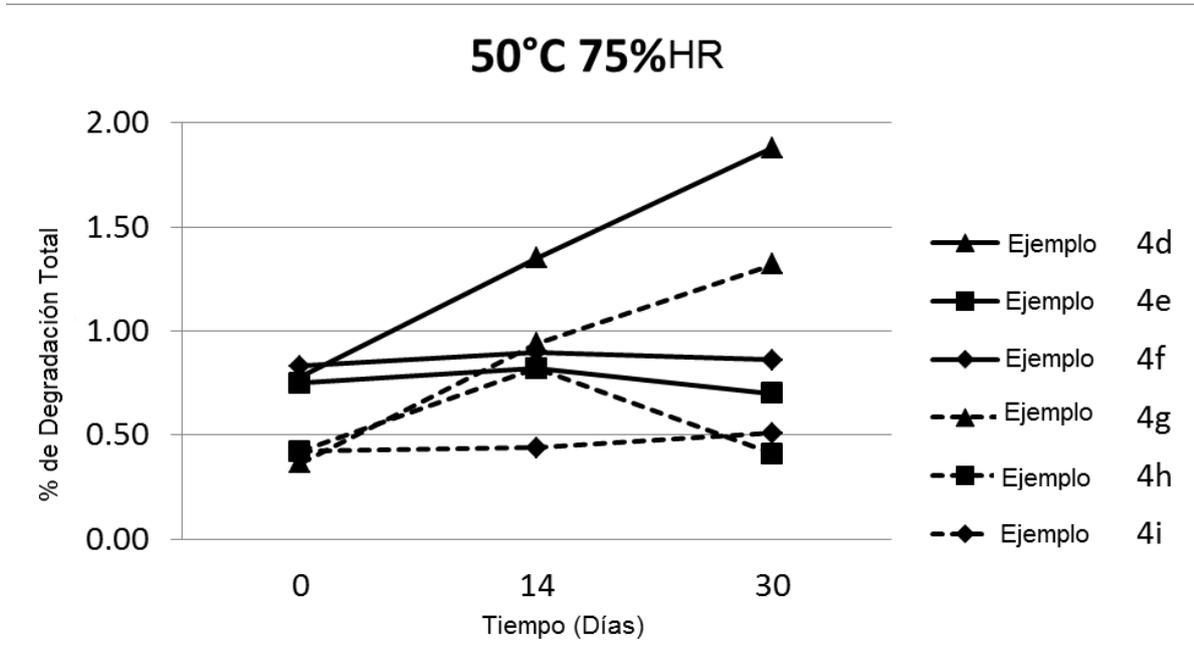


Figura 8:

A



B

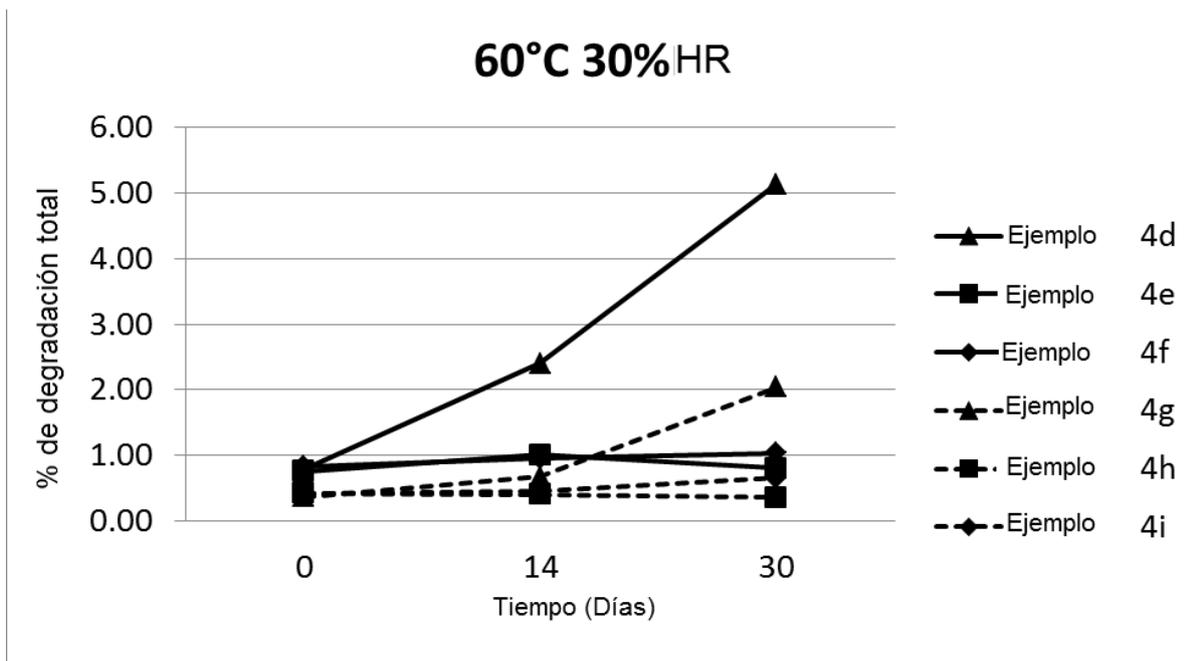
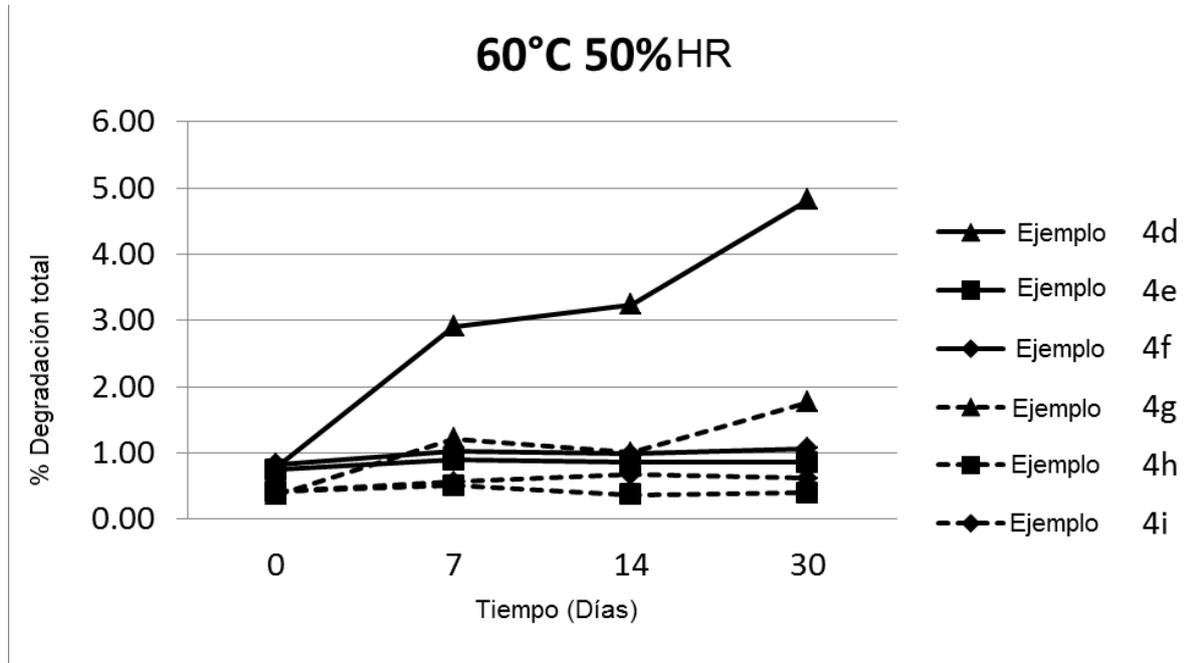


Figura 8 continuación:

C



D

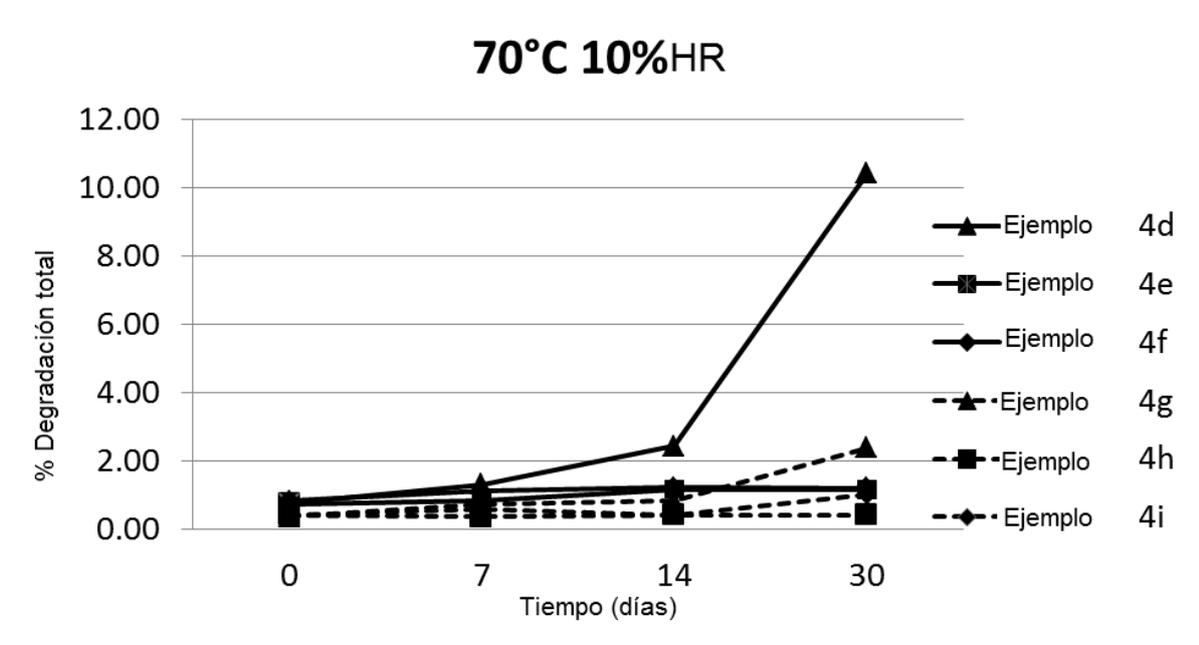
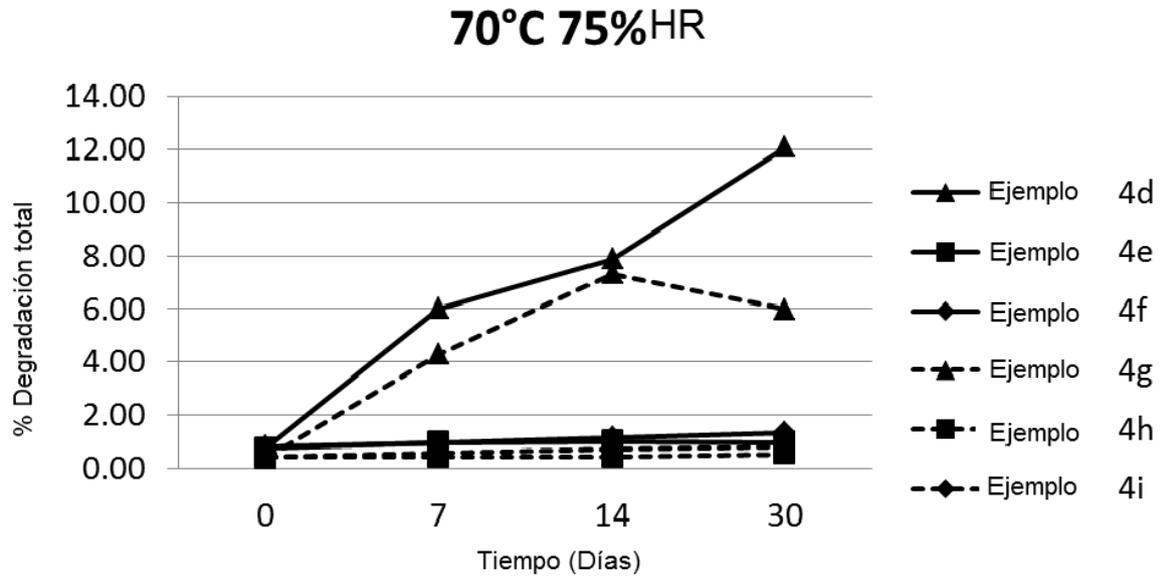


Figura 8 continuación:

E



F

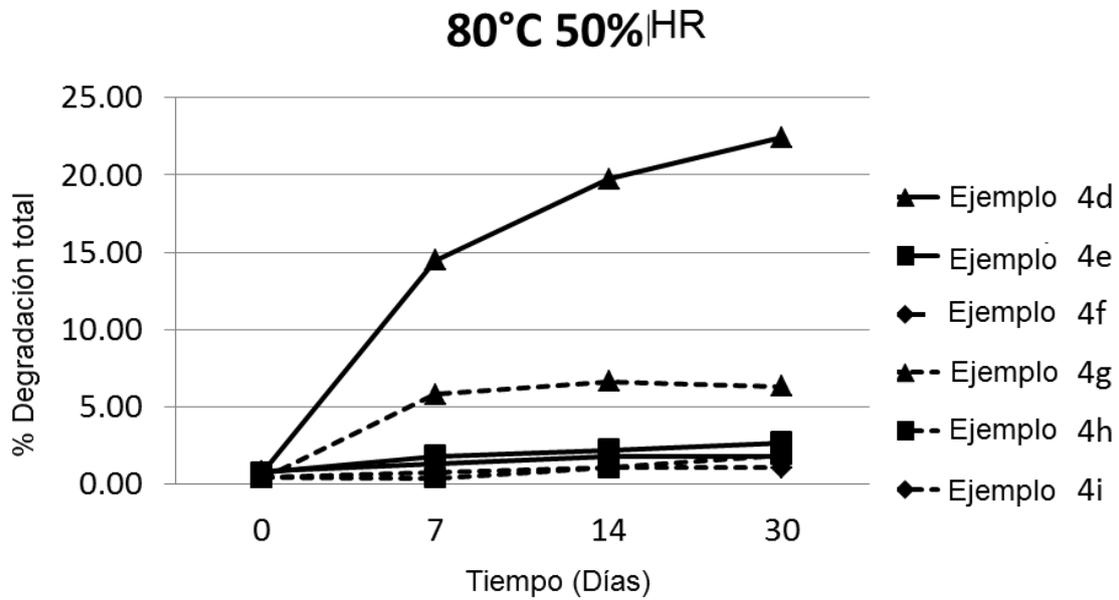


Figura 9:

