

Q.F.



Libertad y Orden

REPÚBLICA DE COLOMBIA
DIVISIÓN DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

PCT
PATENTE DE INVENCION



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

06-56309

TITULO: MÉTODOS PARA TRATAR LA INFLAMACIÓN AGUDA EN ANIMALES
CON INHIBIDORES DE p38 MAP QUINASA.

SOLICITANTE: PFIZER PRODUCTS INC.

A G I K 34/497 ; 34/506
A G I P 43/00

DIRECCIÓN: Eastern Point Road, Groton, Connecticut 06340 E.U.A.

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ, Junio 8 de 2006

S.S

Publicación
FAS. 18-07-2006



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Rad: 06-056309-00000-0000

Fec. 2006-06-09 16:48:27 Dep. 2620 NUECREACIONES

Tra. 11 PATENTE Y II

Eve: 378 FASE NACIONAL I

Act 411 PRESENTACION

Folios: 129

PETITORIO - FORMULARIO Ú
PATENTE P
ENTRADA EN FASE

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Rad: 06-056309-00000-0000

Fec. 2006-06-09 16:48:27 Dep. 2020 NUECREACIONES

Tra. 11 PATENTE Y II

Eve: 379 FASE NACIONAL II

Act 411 PRESENTACION

Folios: 129

SOLICITU

1



Patente de Invención.



Patente de Modelo de Utilidad.



Capítulo I.



Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)Nombre: PFIZER PRODUCTS INCDirección: Eastern Point Road, Groton,
Connecticut 06340 E.U.A.Nacionalidad o Domicilio: ESTADOUNIDENSELugar de Constitución: Delaware, Estados
Unidos de América.

Teléfono: _____

Fax: _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓNC.C. ☐ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

REPRESENTANTE
APODERADONombre: CARLOS R. OLARTEDirección: World Trade Center Torre A,
Calle 100 No. 8A-37 Piso 10Teléfono: 601-7700 Fax: 601-7799E-mail: office@olarteraisbeck.com**IDENTIFICACIÓN**C.C. ☒ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 79782747Bta
TP 74.295**INVENTOR (ES)**
(72)Nombre: (1) MARCUS EUGENE KEHRLI JR.; (2) SUBAS MAN SAKYADirección: (1) 5050 Pond View Circle, Ames, IA 50014 E.U.A.;(2) Eastern Point Road, Groton, Connecticut 06340, E.U.A.Nacionalidad o Domicilio: (1 y 2) Estadounidense

3

PCT (86)Solicitud Internacional No. PCT/IB2004/004035Fecha Diciembre 6, 2004Publicación Internacional No. WO 2005/060967Fecha Julio 7, 2005

4

Título (54) MÉTODOS PARA TRATAR LA INFLAMACIÓN AGUDA EN ANIMALES
CON INHIBIDORES DE p38 MAP QUINASA.**Clasificación Internacional (51)** A61K 31/497, 31/506, 31/4184, 31/4192, 31/4196,
A61P 43/00**Prioridad**SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

Diciembre 18, 2003

(31) Número de Solicitud

60/530,722

5

Comprobante de pago No. 06-42,966**Fecha** Junio 7, 2006

10

ANEXOS

☒

Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.

☐

Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.

☒

Poderes, si fuere el caso. Ver Expediente No. 06-051744. Adjunto copia simple

☒

Documento de cesión del Inventor al solicitante o a su causante.

☐

Declaraciones.

☒

Copia de la solicitud Internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☒

Traducción de la solicitud Internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☒

Copia del examen preliminar Internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).

☒

Traducción del examen preliminar Internacional efectuado por la IPEA.

☐

De ser el caso, copia del contrato de acceso.

☐

De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.

☐

De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.

☐

Arte final 12 x 12.

☐

De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.

☐

De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud Internacional.

☒

Otros. Búsqueda Internacional

11

FIGURA CARACTERÍSTICA:

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA:

C.C. 79.982.747 Btá T.P. 74.295

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

3

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-056309-00000-0000
Fec: 2006-06-09 16:48:27 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tia: 1 PATENTEYII
Cve: 378 FASIONACIONALI
Ac: 411 PRESENTACION Folios: 129

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 42,966
FECHA : JUNIO 7 DE 2006

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
OLARTE RAISDEGR	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	52332395	06/06/2006	4,837,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. CONTABILISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	463,000.00
	TOTAL :	\$ 463,000.

SON: CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

2

TRADUCCION OFICIAL No. 05-223

Efectuada el día 9 de diciembre de 2005, de un documento escrito en Inglés, al cual para su identificación se le estampa el sello de Sergio Andrés Rueda Iglesias, Traductor e Intérprete Oficial por Resolución No. 0138 expedida por el Ministerio de Justicia y del Derecho el 11 de febrero de 2002.

Traducción de las Autenticaciones Notariales y subsiguientes correspondientes a un Poder otorgado por **PFIZER PRODUCTS, INC.**, a **Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Ana María Frieri y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro**, documento este que viene en español, se explica por sí solo y fue firmado por **Grover F. Fuller, Jr.** el 17 de noviembre de 2005 en Nueva York, Estados Unidos de América.

También en inglés y en español viene Certificación Notarial mediante la cual se confirma el nombre y cargo de **Grover F. Fuller, Jr.**, así como la existencia legal de la compañía. Dicha certificación notarial está firmada por **Susan Z. Killian**, Notario Público de Nueva York, cuyo cargo expira el 4 de octubre de 2008, según consta en su correspondiente sello notarial.

Suscrito y jurado ante mi el 17 de noviembre de 2005.

(Fdo.) Susan Z. Killian


SERGIO ANDRÉS RUEDA IGLESIAS
C. C. C. C.
TRADUCTOR E INTÉRPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLÉS / INGLÉS - ESPAÑOL
RESOLUCIÓN No. 0138 del 11 de febrero de 2002
MINISTERIO DE JUSTICIA Y DEL DERECHO

5

ESTADO DE NUEVA YORK - CONDADO DE NUEVA YORK No. 467518

El suscrito, Norman Goodman, Escribano del Condado y del Tribunal Supremo del Estado de Nueva York, tribunal éste provisto de sello por ley, por medio de este documento certifico conforme a la ley ejecutiva del Estado de Nueva York que Susan Z. Killian, cuyo nombre aparece suscrito en la declaración jurada o certificado de reconocimiento anexo, desempeñaba en el momento de tomar el mismo, las funciones de Notario Público, en y para el Estado de Nueva York, estando debidamente comisionado bajo juramento y habilitado como tal; que conforme a la ley en mi despacho obra un certificado de su nombramiento con su firma autógrafa; que conozco bien la letra manuscrita de dicho Notario Público o he comparado la firma que aparece en el instrumento anexo con la que reposa en los archivos de mi oficina, y creo en conciencia que la misma es auténtica.

EN FE DE LO CUAL, firmo de mi puño y letra y estampo mi sello oficial, el día 22 de noviembre de 2005.

(Fdo.) Norman Goodman, Escribano del Condado y del Tribunal Supremo del Estado de Nueva York.

SERGIO ANDRÉS MEDA IGLESIAS
C. C. E. 773
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLÉS / INGLÉS - ESPAÑOL
REGISTRACIÓN No. 0130 DE FEBRERO 11, 2002
MINISTERIO DE JUSTICIA Y DEL DERECHO

6

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América

El presente documento público

2. Fue firmado por: Norman Goodman

3. Que actuó en su calidad de: Escribano del Condado

4. Lleva el sello del Condado de Nueva York

Se certificó:

5. En Nueva York, Nueva York

6. El 22 de noviembre de 2005

7. Por parte del Secretario de Estado, (Encargado) del
Estado de Nueva York

8. Bajo el Número NYC-10404952A

9. Aparece Sello del Estado de Nueva York

10. Firmado por: James Bizzarri, Secretario de Estado
Especial Encargado

Es traducción fiel y completa efectuada por:


Sergio Andrés Rueda Iglesias
c.c. 80.424.773 de Bogotá

SERGIO ANDRÉS RUEDA IGLESIAS
C.C. 80.424.773
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLÉS / INGLÉS - ESPAÑOL
BOGOTÁ, COLOMBIA, 11 de Noviembre de 2002
BOGOTÁ, COLOMBIA, 11 de Noviembre de 2002

Apostille

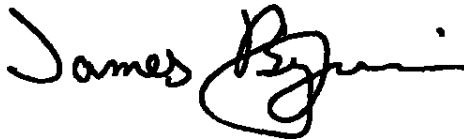
(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

7

1. Country: **United States of America**
This public document
2. has been signed by **Norman Goodman**
3. acting in the capacity of **County Clerk**
4. bears the seal/stamp of the county of **New York**

Certified

5. At New York, New York
6. the 22nd day of November 2005
7. by Special Deputy Secretary of State, State of New York
8. No. NYC-10404952A
9. Seal/Stamp
10. Signature



James Blizzarri
Special Deputy Secretary of State

Carlos R. Olarte
J. Ian Raisbeck
Ana María Frieri
Juan Guillermo Moure
Natalia Castro
Guillermo Chahín
Zuley David
Joaquín Chaparro
José Luis Londoño
Cecilio Álvarez
Felipe Mondos
Camilo Rodríguez
Santiago Parra

Of Counsel
Guillermo Chahín
Graciela Melo

Power of Attorney

Poder

The undersigned,

El suscrito,

PFIZER PRODUCTS INC.,

domiciled in

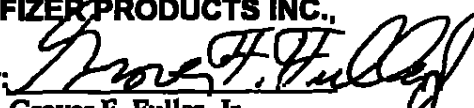
domiciliado en

Eastern Point Road, Groton, State of Connecticut 06340, United States of America

by means of these presents hereby grants to Carlos R. Olarte and/or J. Ian Raisbeck and/or Ana María Frieri and/or Juan Guillermo Moure and/or Natalia Castro full and sufficient Power of Attorney to file, prosecute, obtain, defend and enforce any and all of the company's Patents for Inventions, Utility Models, Layout-Designs (topographies) of Integrated Circuits, Industrial Designs, Trademarks, Advertising Slogans, Trade Names, Commercial Emblems, Geographical Indications, Protection of Trade Secrets, Obtainer's Certificates, Copyrights, Registration of Domain Names, Health Registrations, or any other intellectual property right in the Republic of Colombia, to which end it empowers them to take all steps necessary before any administrative or judicial authority of any class for the objects stated, to file petitions, recourses, replies and oppositions, pay taxes and annuities, request testimonies, receive documents and securities, abandon applications and collect refunds. Sufficient power is hereby granted to receive notifications on behalf of the Company, to confer powers on those who are to represent the company judicially and extrajudicially, to answer in court in the matter of all claims and demands that may be presented in connection with the objects stated, giving them likewise power to substitute these presents and revoke such substitutions.

por medio del presente otorga a Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Ana María Frieri y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro poder especial, amplio y suficiente para presentar, tramitar, obtener, defender y hacer respetar todas y cualquiera de las Patentes de Invención, Modelos de Utilidad, Esquemas de Trazados de Circuitos Integrados, Diseños Industriales, Marcas, Lemas Comerciales, Nombres Comerciales, Enseñas Comerciales, Denominaciones de Origen, Protección de Secretos Empresariales, Certificados de Obtentor, Derechos de Autor, Registro de Nombres de Dominio, Registros Sanitarios, o cualquier otro bien de propiedad intelectual de la compañía en la República de Colombia, a cuyo efecto los faculta para dar todos los pasos necesarios ante cualquier autoridad administrativa o judicial de cualquier jerarquía para cumplir con lo encomendado, elevar solicitudes, recursos, respuestas y oposiciones, pagar impuestos y anualidades, solicitar testimonios, recibir documentos y valores, deslistar y percibir. Se concede poder bastante para recibir notificaciones a nombre de la compañía, otorgar poderes a quienes vayan a representar a la compañía judicial y extrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones o demandas que por motivo de lo encomendado se presentaren, dándoles asimismo facultad para sustituir el presente y revocar dichas sustituciones.

Signature/Firma:

PFIZER PRODUCTS INC.,
By: 
Grover F. Fuller, Jr.

Vice President, Attorney-In- Fact

Date/Fecha:

17 November 2005

City/Country/Ciudad, País: New York, NY USA

State of New York
County of New York, } ss.:

467518 9 Form 1

I, NORMAN GOODMAN, County Clerk and Clerk of the Supreme Court of the State of New York, in and for the County of New York, a Court of Record, having by law a seal,
DO HEREBY CERTIFY pursuant to the Executive Law of the State of New York, that

William Z. Killian

whose name is subscribed to the annexed affidavit, deposition, certificate of acknowledgment or proof, was at the time of taking the same a NOTARY PUBLIC in and for the State of New York duly commissioned, sworn and qualified to act as such; that pursuant to law, a commission or a certificate of his official character, with his autograph signature has been filed in my office; that at the time of taking such proof, acknowledgment or oath, he was duly authorized to take the same; that I am well acquainted with the handwriting of such NOTARY PUBLIC or have compared the signature on the annexed instrument with his autograph signature deposited in my office, and I believe that such signature is genuine.

IN WITNESS WHEREOF, I have hereunto set my hand affixed my official seal this

FILED PAID \$1.00

APR 2 2005

Norman Goodman

County Clerk and Clerk of the Supreme Court, New York County

10
A

Notarial Certification

Certificación Notarial

On this date,

En esta fecha,

The undersigned Notary Public certifies:

el Notario Público suscrito certifica:

1. That

1. Que

Grover F. Fuller, Jr.

of legal age and domiciled in

mayor de edad y domiciliado

Street 150 East 42nd Street
City New York
State New York 10017-5612 USA

signed the foregoing document.

suscribió el documento que antecede.

2. That the grantor has executed the foregoing document as Vice President, Attorney-In-Fact of PFIZER PRODUCTS INC.

2. Que el otorgante ha suscrito el referido documento en su carácter de de

3. That PFIZER PRODUCTS INC, having its principal place of business located in Groton, State of Connecticut 06340, United States of America

4. Que con sede principal ubicada en

is duly incorporated, is currently in existence, and that the purposes for which the Power of Attorney is granted are within the scope of its corporate purposes.

está legalmente constituida, que tiene existencia legal vigente y que los propósitos para los cuales se otorga el poder se encuentra dentro de los que comprenden su objeto social.

4. That the grantor has the authority to execute the Power of Attorney and that his/her representation is legal.

4. Que el otorgante tiene la representación para suscribir el poder, y que ésta es legítima.

NOTARY PUBLIC (Signature):

Susan E. Killian



SUSAN E. KILLIAN
Notary Public, State of New York
No. 01626114321
Qualified in New York County
Commission Expires October 4, 2008

State of New York
County of New York
SWORN to and SUBSCRIBED before me
this 17 day of Nov. 2006
Susan E. Killian

10/11

CESION

Por contraprestación valiosa pagada a nosotros por **PFIZER PRODUCTS INC.**, sociedad constituida en virtud de las leyes del **Estado de Connecticut, Estados Unidos de América.** cuya dirección postal completa es **Eastern Point Road, Groton, Connecticut 06340, Estados Unidos de América,** por el presente vendemos y traspasamos a la citada **PFIZER PRODUCTS INC,** todo nuestro derecho, título e interés en y sobre nuestro invento de una nueva y útil mejora en **METODOS PARA TRATAR LA INFLAMACION AGUDA EN ANIMALES CON INHIBIDORES DE p38 MP QUINASA** en cuanto respecta a la República de Colombia, tal como se indica y describe plenamente en la especificación y por el presente autorizamos y solicitamos al Comisionado de Patentes de Colombia expedir dicha patente a nombre de la citada **PFIZER PRODUCTS INC,** de conformidad con esta cesión. .

En fe de lo cual, firmamos de nuestro puño y letra,

5050 Pond View Circle, Ames, Iowa 20 de octubre de 2004

(Fdo) Marcus Eugene KEHRLI, Jr.

Lugar, fecha y firma – Marcus Eugene KEHRLI, Jr

Groton, CT, USA, 30 de noviembre de 2004

(Fdo) Subas Man SAKYA.

Lugar, fecha y firma – Subas Man SAKYA

7112

Por el presente certifico que este es el documento original.

(Fdo) Sami Swadek 27/Enero/06

Suscrito y jurado ante mí, el 27 de febrero de 2006.

(Fdo.) ALBERT L. THEMES, Notario Público de Washington Distrito Capital,
cuyo cargo vence el 14 de junio de 2009, según consta en su
correspondiente sello notarial.

(Sello Oficial)

13
PC

APOSTILLA

(Convención de la Haya del 5 de Octubre de 1961)

1. País: Distrito de Columbia
Estados Unidos de América
2. El presente documento público fue firmado por: Albert L. Themes
3. Que actuó en su calidad de Notario Público del Distrito de Columbia
4. Lleva el sello de Albert L. Themes Notario Público del Distrito de Columbia
Se certificó
5. En Washington D.C.
6. El 27 de febrero de 2006
7. Por parte del Secretario del Distrito de Columbia.
8. Bajo el Número 152862
9. Aparece el sello del Distrito de Columbia
10. Firmado por Patricia Elwood (Provisional).



14
17

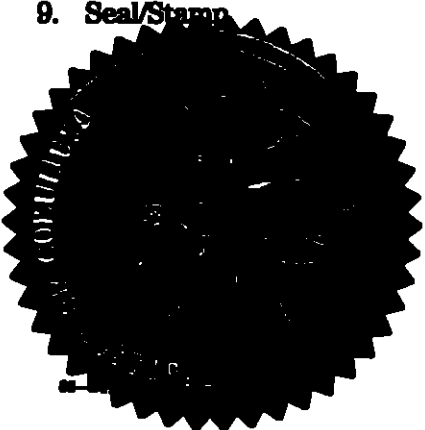
Apostille

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. *District of Columbia*
United States of America
2. This public document has been signed ALBERT L. THEMES
3. acting in the capacity of ~~NOTARY PUBLIC IN AND FOR THE DISTRICT OF COLUMBIA~~
ALBERT L. THEMES, NOTARY PUBLIC IN AND FOR THE
4. bears the seal/stamp of DISTRICT OF COLUMBIA

CERTIFIED

5. at Washington, D.C.
27 FEBRUARY 2006
6. the _____ day of _____
7. by Secretary of the District of Columbia
8. No. 152862
9. Seal/Stamp



10. Signature
PATRICIA ELWOOD

Patricia Elwood

ASSIGNMENT

For valuable consideration paid to me (us) by PFIZER PRODUCTS INC. a corporation organized under the laws of the State of Connecticut, United States of America whose full post office address is Eastern Point Road, Groton, Connecticut 06340, United States of America, I (we) do hereby sell and assign to the said PFIZER PRODUCTS INC., all my (our) right, title and interest in and to my (our) invention for a new and useful Improvement in METHODS OF TREATING ACUTE INFLAMMATION IN ANIMALS WITH p38 MAP KINASE INHIBITORS so far as the Republic of Colombia is concerned, as fully set forth and described in the specification, and I (we) do hereby authorize and request the Commissioner of Patents of Colombia to issue said patent to the said PFIZER PRODUCTS INC. in accordance with this assignment.

In witness whereof I (we) have hereunto set my (our) hand(s) this

5050 Pond View Circle, Ames, Iowa 24 OCT 04 *Marcus E. Kherli, Jr.*

Place, date and signature - Marcus Eugene KHERLI, Jr.

Groton, CT, USA. Nov 30, 2004 *Subas Man SAKYA*

Place, date and signature - Subas Man SAKYA

I HEREBY CERTIFY THAT THIS
IS THE ORIGINAL DOCUMENT
SAMI SWARRK

JAN 27 2006

Subscribed and sworn to before me, in my presence, this
27 day of FEB, 2006, a Notary Public
in and for the District of Columbia
Albert L. Themes
Notary Public

My commission expires 6/19, 2009

ALBERT L. THEMES
NOTARY PUBLIC DISTRICT OF COLUMBIA
My Commission Expires June 14, 2009

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
7 July 2005 (07.07.2005)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/060967 A1

(51) International Patent Classification⁷: A61K 31/497,
31/506, 31/4184, 31/4192, 31/4196, A61P 43/00

(21) International Application Number:
PCT/IB2004/004035

(22) International Filing Date: 6 December 2004 (06.12.2004)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/530,722 18 December 2003 (18.12.2003) US

(71) Applicant (for all designated States except US): PFIZER
PRODUCTS INC.? [US/US]; Eastern Point Road, Gro-
ton, CT 06340 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): KEHRLI, Marcus,
Engene, Jr. [US/US]; 5050 Pond View Circle, Ames, IA
50014 (US). SAKYA, Subas, Man [US/US]; Pfizer Global
Research & Development, Eastern Point Road, Groton, CT
06340 (US).

(74) Agents: FULLER, Grover, F., Jr. et al.; Pfizer Inc., 201
Labor Road, Morris Plains, NJ 07950 (US).

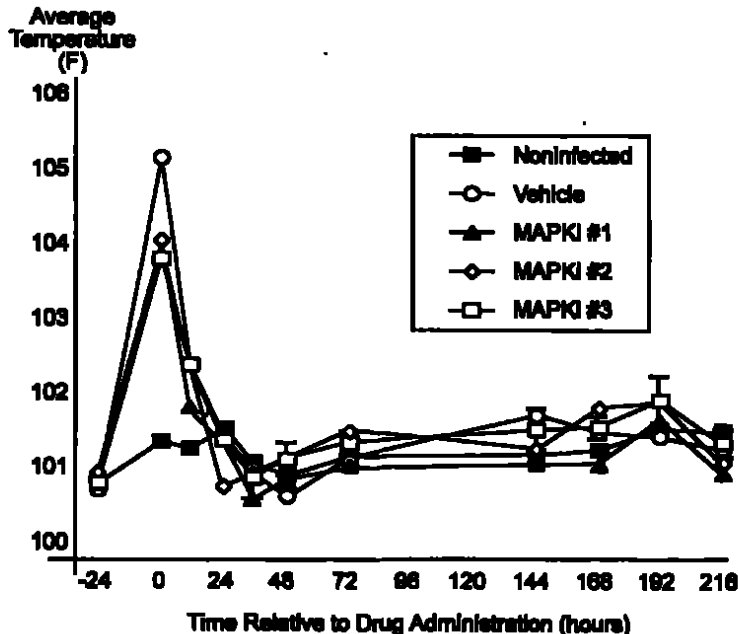
(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,
ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO,
SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN,
GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— with international search report

[Continued on next page]

(54) Title: METHODS OF TREATING ACUTE INFLAMMATION IN ANIMALS WITH p38 MAP KINASE INHIBITORS



(57) Abstract: The present invention provides methods for treating animals having acute inflammatory conditions, including mas-
titis, by administering at least one p38 MAP kinase inhibitor. The present invention also provides methods for enhancing milk
production and reducing milk discard in animals afflicted with acute inflammatory conditions by administering at least one, p38
MAP kinase inhibitor.

WO 2005/060967 A1



17
6

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

18
X

-1-

METHODS OF TREATING ACUTE INFLAMMATION IN ANIMALS WITH p38 MAP KINASE INHIBITORS

Field of the Invention

5 The present invention relates to the use of p38 MAP kinase inhibitors for the treatment of animals having acute inflammation and conditions caused thereby. In particular, the present invention provides methods for treating animals having acute inflammatory conditions, including mastitis, by administering at least one p38 MAP kinase inhibitor. The present invention also provides methods for enhancing milk
10 production and reducing milk discard in animals afflicted with acute inflammatory conditions by administering at least one p38 MAP kinase inhibitor.

Background of the Invention

 Acute inflammatory responses in mammals often damage tissue resulting in
15 loss of organ or tissue function and concomitant negative impacts on overall health, production and performance.

 Mitogen-activated protein (MAP) kinases are key enzymes involved in signal transduction and the amplification of cellular responses to stimuli. The p38 group of MAP kinases is a group of MAP kinases associated with the onset and progression
20 of inflammation. The p38 group has at least three known homologues of the original p38 MAP kinase (Ono et al. (2000) Cellular Signalling 12:1-13.). Early inflammatory events include cytokine release, activation and rapid accumulation of neutrophils with subsequent recruitment of mononuclear cells. p38 MAP kinase plays a central role in regulating a wide range of inflammatory responses in many different cells. Recent
25 studies have shown that a p38 MAP kinase inhibitor [(S)-5-[2-(1-phenylethylamino)pyrimidin-4-yl]-1-methyl-4-(3-trifluoromethylphenyl)-2-(4-piperidinyl)imidazole] reduced initial neutrophil recruitment to the lung in a murine model of mild pulmonary inflammation induced by lipopolysaccharide (LPS) (Nick et al. (2000) J. Immunol. 164:2151-2159.) p38 MAP kinase is activated by dual phosphorylation
30 after stimulation by a wide array of extracellular stimuli including physicochemical stress, treatment with lipopolysaccharide (LPS) or *E. coli*, signal transduction from the Toll-like receptors, as well as, TNF and IL-1 receptors. The products of the p38 phosphorylation mediate the production of inflammatory cytokines, including TNF, IL-1, IL-6, iNOS and cyclooxygenase-2.

18/19

Mastitis is an affliction of lactating dairy cows and is one of the most costly diseases to animal agriculture, with economic losses exceeding \$2 billion annually in the United States alone. (Blosser, T. (1979) J. Dairy Sci. 62:119-127). Mastitis is caused by intramammary infection with many bacterial pathogens, including

5 staphylococci, streptococci, and coliforms. Economic losses attributable to mastitis include reduced milk production and quality, increased veterinary costs and death of cows. Reduced milk production is widely attributed to pathophysiologic changes associated with the inflammatory response to bacterial infection. Shuster, D. and Kehrl, M.E. (1995) Am. J. Vet. Res. 56(3):212-320, incorporated herein by reference;

10 Shuster et al. (1991) J. Dairy Sci. 74:1527-1538; Shuster et al. (1991) J. Dairy Sci. 74:3407-3411.; Shuster et al. (1991) J. Dairy Sci. 74:3763-3774. Mastitis caused by the bacteria characterized above can manifest as either clinical or subclinical disease. Cullor et al. (1990) Disorders of the mammary gland in large animal medicine., B.P. Smith, The C.V. Mosby Company, St. Louis. Mo. 63146, pp. 1047-

15 1067. Clinical disease varies from mildly affected quarters with changes in the milk, through severely infected quarters with eventual loss of that quarter, to systemically ill cows that often die. Subclinical mastitis is prevalent in many dairy herds. Affected quarters are infected with the pathogenic bacteria described above, but clinical signs are absent. The level of somatic cells increases in the milk, which change can be

20 detected by conventional means. Subclinical mastitis is accompanied by lowered milk production and milk quality.

Here we disclose inhibitors of the kinase activity of p38 useful in a method to treat acute inflammatory conditions characterized by enhanced p38 MAP kinase activity resulting in animals having increased milk production with reduced loss or

25 discard.

Summary of the Invention

The present invention provides a method of treating an inflammatory disease or enhancing the recovery from acute inflammatory disease in an animal in need

30 thereof which comprises administering to said animal an effective amount of at least one p38 MAP kinase inhibitor.

Another aspect of the present invention is a method for the enhancement of milk production or reduction of milk loss in an animal suffering from an acute

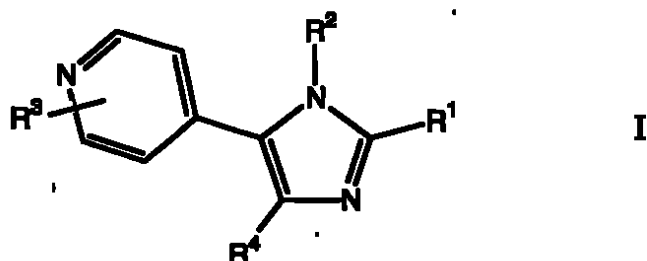
20
18

Inflammatory disease which comprises the administration to said mammal of an effective amount of at least one p38 MAP kinase inhibitor.

A third aspect of the present invention is directed to a method of inhibiting the synthesis and activity of the COX-2 enzyme, TNF or IL-1 in an animal comprising the administration of an effective amount of at least one p38 MAP kinase inhibitor.

In another aspect the present invention is directed to a method of inhibiting apoptotic cell death in an animal comprising the administration of an effective amount of at least one p38 MAP kinase inhibitor.

In a preferred embodiment, the p38 MAP kinase inhibitor is selected from
 (I) the compound of Formula I,



wherein R¹ is -H;

R² is substituted and unsubstituted heterocyclic, cycloalkyl, aryl, heteroaryl: wherein heterocyclic is a 5-, 6- or 7-membered saturated, partially saturated or unsaturated ring containing from one to three heteroatoms independently selected from the group consisting of nitrogen, oxygen and sulfur; and including any bicyclic group in which any of the above heterocyclic rings is fused to a benzene ring or another heterocycle; and the nitrogen may be in the oxidized state giving the N-oxide form; and optionally substituted with R_y;

R_y for each occurrence is independently -halo, -OH, -(C₁-C₈)alkyl, -(C₂-C₈)alkenyl, -(C₂-C₈)alkynyl, -O(C₁-C₈)alkyl, -O(C₂-C₈)alkenyl, -O(C₂-C₈)alkynyl, -(C₆-C₈)alkyl-NR¹³R¹⁴, -C(O)-NR¹³R¹⁴, -SO₂R¹³, -SOR¹³, -SR¹³, -NR¹³-SO₂R¹⁴, -NR¹³-C(O)-R¹⁴, -NR¹³-OR¹⁴, -SO₂-NR¹³R¹⁴, -CN, -CF₃, -C(O)(C₁-C₈)alkyl, =O, -SO₂-phenyl, or C(O)-Ar or het-Ar;

R³ is independently -H, -halo, -OH, -(C₁-C₁₀)alkyl, OCH₃, NH₂, NHR, wherein R is aryl, heteroaryl or alkyl; and

21

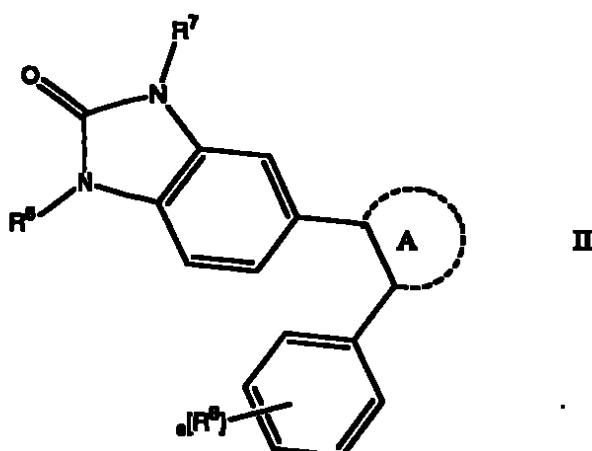
R^4 is substituted and unsubstituted aryl and heteroaryl;

R^{13} and R^{14} for each occurrence are each independently -H; $-(C_1-C_8)$ alkyl, wherein 1 or 2 carbon atoms, other than the connecting carbon atom, may optionally be replaced with 1 or 2 heteroatoms independently selected from S, O and N and wherein each carbon atom is optionally substituted with 1, 2 or 3 halo;

$-(C_2-C_8)$ alkenyl, optionally substituted with 1, 2 or 3 halo; or $-(C_2-C_8)$ alkynyl wherein one carbon atom, other than the connecting carbon atom and the ethynyl atoms, may optionally be replaced with one oxygen atom and wherein each carbon atom is optionally substituted with 1, 2 or 3 halo;

or R^{13} and R^{14} are taken together with N to which they are attached to form het;

(II) the compound of Formula II,



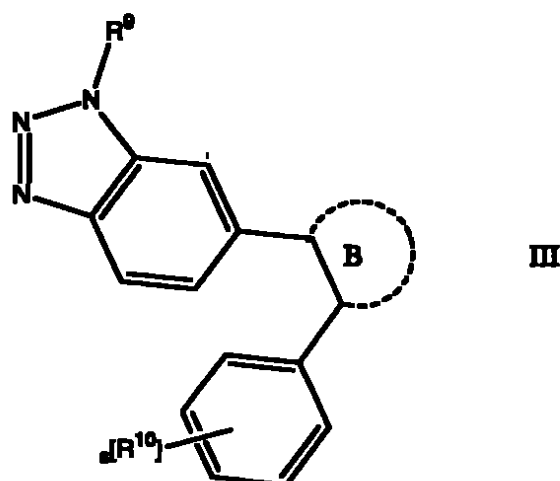
wherein "A" is substituted or unsubstituted pyrrolyl, imidazolyl, pyrazolyl, oxazolyl, isoxazolyl, thiazolyl, or isothiazolyl;

R^6 and R^7 are independently H or substituted or unsubstituted (cyclo)alkyl, phenyl, heteroaryl, or heterocyclyl;

R^8 is independently halo, (perhalo)alkyl, (perhalo)cycloalkyl, alkenyl, alkynyl, heterocyclyl(oxy), phenyl, OH, (perhalo)alkoxy, phenoxy, alkylthio, alkyl(amino)sulfonyl, alkylsulfamoyl, carbamoyl, acyl or carboxy; and

s is 0-5;

(III) the compound of Formula III



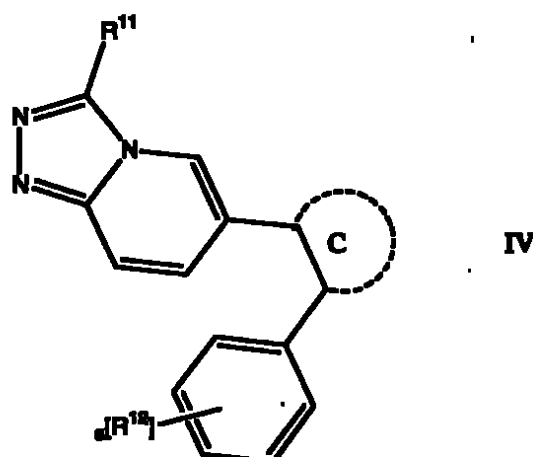
wherein "B" is a substituted or unsubstituted hetero group, such as pyrrolyl, imidazolyl, pyrazolyl, oxazolyl;

R⁹ is H, alkyl, cycloalkyl, heterocycloalkyl, aryl or heteroaryl;

5 R¹⁰ is H, alkyl, phenyl, F, Cl or CN; and

s is 0-5; or

(iv) the compound of Formula IV,



10

wherein "C" is substituted or unsubstituted pyrrolyl, imidazolyl, pyrazolyl, oxazolyl, isoxazolyl, thiazolyl, or isothiazolyl;

R¹¹ is H, alkenyl, alkynyl, or substituted or unsubstituted (cyclo)alkyl, phenyl, heteroaryl, or heterocyclyl, or amino;

15 R¹² is halo, (cyclo)alkyl(oxy), (perhalo)alkyl, alkenyl, alkynyl, phenyl, heteroaryl(oxy), heterocyclyl(oxy), OH, (perhalo)alkoxy, phenoxy, alkylthio,

23
29

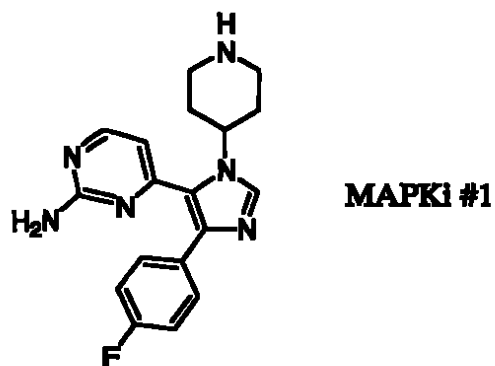
alkylsulfonyl, alkylaminosulfonyl, NO₂, substituted and unsubstituted amino or carbamoyl; and

s is 0-5.

In a preferred embodiment, the p38 MAP kinase inhibitor is

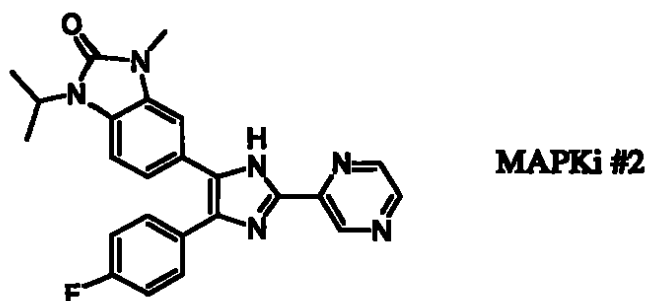
5

(i) a compound MAPKi #1



;

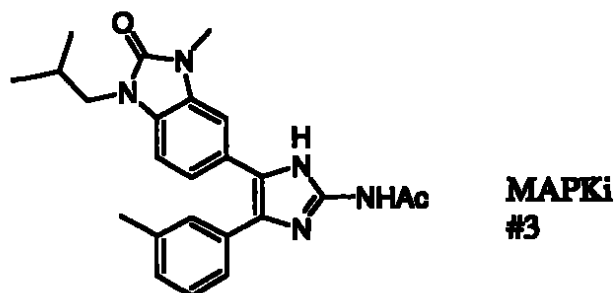
(ii) a compound MAPKi #2



; and

10

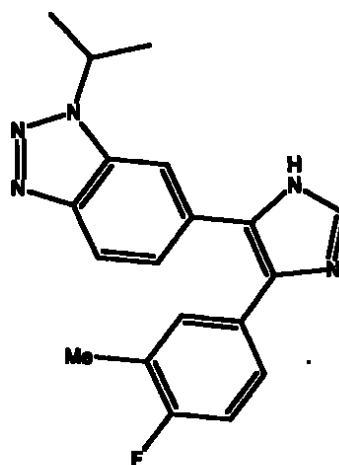
(iii) a compound MAPKi #3



(iv) a compound of Formula IIIa

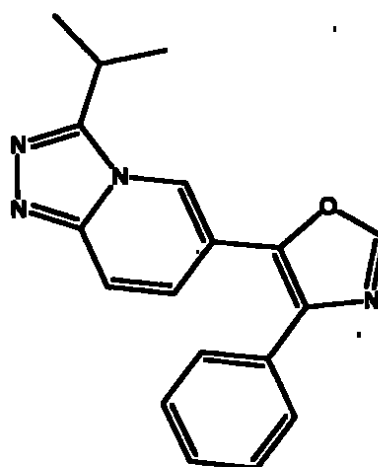
24
23

-7-



IIIa ; or

(v) a compound of Formula IVa



IVa

5 In a preferred embodiment, the inflammatory disease is selected from the group consisting of mastitis, respiratory disease, replaced placenta membranes, metritis, pyometra, enteritis, hepatitis, nephritis, septicemia, endotoxemia, laminitis, frostbite and obstructive bowel problems.

Preferred obstructive bowel problems are selected from the group consisting of colic, displaced abomasums, and cecal torsion.

10 In a preferred embodiment, the inflammatory disease is mastitis and the animal is a cow.

In a further embodiment, a pharmaceutically acceptable carrier is preferred.

The term "A," "B," "C," "het" or "heterocycle" refers to an optionally substituted
15 hetero group containing one to two heteroatoms selected from nitrogen, sulfur and

25
24

oxygen, such as pyrrolyl, imidazolyl, pyrazolyl, oxazolyl, isoxazolyl, thiazolyl, or isothiazolyl.

The term "alkyl," as well as the alkyl moieties of other groups referred to herein (e.g. alkoxy), may be linear or branched (such as methyl, ethyl, *n*-propyl, isopropyl, *n*-butyl, iso-butyl, secondary-butyl, tertiary butyl), and they may also be cyclic (e.g. cyclopropyl or cyclobutyl).

The term "halogen" includes fluoro, chloro, bromo or iodo or fluoride, chloride, bromide or iodide.

The term "aryl" means aromatic radicals such as phenyl, naphthyl, tetrahydronaphthyl, indanyl and the like, optionally substituted by 1-3 suitable substituents such as fluoro, chloro, trifluoromethyl, (C₁-C₆)alkoxy, (C₆-C₁₀)aryloxy, trifluoromethoxy, difluoromethoxy or (C₁-C₆)alkyl.

The term "heteroaryl" refers to an aromatic heterocyclic group usually with one heteroatom selected from O, S and N in the ring.

The term "heterocyclic" as used herein refers to a cyclic group containing 1-9 carbon atoms and 1-4 hetero atoms selected from N, O, S and NR. Examples of such rings include, *inter alia*, azetidiny, tetrahydrofuranyl, imidazolidinyl, pyrrolidinyl, piperidinyl.

Further examples of the above terms are described more fully in the references cited herein that further describe the compounds utilized in the claimed invention.

The term "treating or treat" with respect to an acute inflammatory condition as used herein means to inhibit, reduce, prevent or ameliorate symptoms associated with inflammatory responses mediated by p38 MAP kinase including the inhibition of Tumor Necrosis Factor (TNF), Interleukin-1 (IL-1) and cyclooxygenase-2 (COX-2), and to alleviate the symptoms of inflammatory conditions or diseases caused by amplification of inflammatory cytokines including TNF, IL-1 and COX-2. The treatment is considered therapeutic if there is an enhanced recovery from symptoms of acute inflammation.

An "enhanced recovery" as contemplated by the present invention is conventionally determined from a comparison of the condition of infected, treated animals with infected-non-medicated animals. An enhanced recovery is assessed by

any one of the following: an approximate return to the antecedent physiological performance level of the inflamed tissue, such as respiratory function, growth rate, reproductive performance, locomotion, milk synthesis and secretion. Examples might include a reduction in milk discard, increase in milk yield, decrease in
5 Inflammation, decreased *E. coli* levels in milk, or decreased levels of whey PGE₂ levels, for example. The method of the present invention is, for example, effective in enhancing the recovery from acute inflammatory responses in animals.

The term "acute inflammatory condition" as used herein means an affliction or disease of an animal including but not limited to mastitis, respiratory disease,
10 retained placental membranes, metritis, pyometra, enteritis, hepatitis, nephritis, septicemia, laminitis, frostbite and obstructive bowel problems including, colic, displaced abomasums, cecal torsion and endotoxemia.

The term "animal" as used herein refers to all mammals, including but not limited to equids, companion animals and livestock.

15 The term "cattle" as used herein refers to bovine animals including but not limited to steer, bulls, cows, and calves. Preferably, the method of the present invention is applied to an animal which is a lactating non-human mammal; most preferably, a cow.

The term "effective amount" refers to an amount of at least one p38 MAP
20 kinase inhibitor sufficient to increase milk production, decrease milk discard, decrease *E. coli* count, or decrease whey PGE₂ levels in animals to which the p38 MAP kinase inhibitor is administered. An effective amount of p38 MAP kinase inhibitor means, for example, that the inhibitor enhances the recovery of an animal afflicted with an acute inflammatory condition or disease.

25 The term "pharmaceutically acceptable carrier" refers to a carrier medium that does not interfere with the effectiveness of the biological activity of the active ingredient, is chemically inert and is not toxic to the subject to whom it is administered.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 depicts the average body temperature of cows administered saline or 30 cfu *E. coli* into a single quarter followed 13 hours later by administration of MAPKi #1, MAPKi #2, MAPKi #3, or vehicle.

Figure 2 depicts the average daily milk production of cows administered saline or 30 cfu *E. coli* into a single quarter followed 13 hours later by administration of MAPKi #1, MAPKi #2, MAPKi #3, or vehicle.

Figure 3 depicts the average milk clinical scores of cows administered saline or 30 cfu *E. coli* into a single quarter followed 13 hours later by administration of MAPKi #1, MAPKi #2, MAPKi #3, or vehicle.

Figure 4 depicts the average gland clinical scores of cows administered saline or 30 cfu *E. coli* into a single quarter followed 13 hours later by administration of MAPKi #1, MAPKi #2, MAPKi #3, or vehicle.

Figure 5 depicts the average cumulative clinical score of cows administered saline or 30 cfu *E. coli* into a single quarter followed 13 hours later by administration of MAPKi #1, MAPKi #2, MAPKi #3, or vehicle.

Figure 6 depicts the average log₁₀ of milk somatic cell count (SCC) of cows administered saline or 30 cfu *E. coli* into a single quarter followed 13 hours later by administration of MAPKi #1, MAPKi #2, MAPKi #3, or vehicle.

Figure 7 depicts the average total WBC (peripheral blood) of cows administered saline or 30 cfu *E. coli* into a single quarter followed 13 hours later by administration of MAPKi #1, MAPKi #2, MAPKi #3, or vehicle.

Figure 8 depicts the average total PMN (peripheral blood) of cows administered saline or 30 cfu *E. coli* into a single quarter followed 13 hours later by administration of MAPKi #1, MAPKi #2, MAPKi #3, or vehicle.

Figure 9 depicts the average whey PGE₂ concentration of cows administered saline or 30 cfu *E. coli* into a single quarter followed 13 hours later by administration of MAPKi #1, MAPKi #2, MAPKi #3, or vehicle.

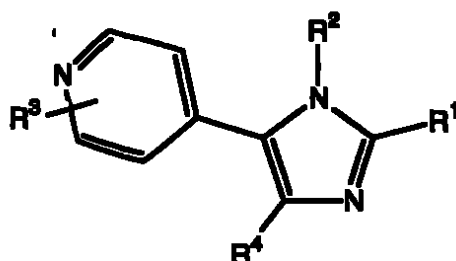
Figure 10 depicts bacteria (*E. coli*) numbers (ln ml) from cows administered saline or 30 cfu *E. coli* into a single quarter followed 13 hours later by administration of MAPKi #1, MAPKi #2, MAPKi #3, or vehicle.

DETAILED DESCRIPTION

The present invention provides for methods for treating animals having acute inflammatory conditions including mastitis by administering at least one p38 MAP kinase inhibitor. The present invention also provides methods for enhancing milk production and reducing milk discard in animals afflicted with acute inflammatory conditions by administering at least one, p38 MAP kinase inhibitor.

The p38 MAP kinase inhibitor compounds utilized for the present invention may be synthesized by synthetic routes that include processes analogous to those well-known in the chemical arts, particularly in light of the description contained herein or through the references cited.

The compound of Formula I is also a p38 MAP kinase inhibitor, and is useful in the treatment of inflammation, osteoarthritis, rheumatoid arthritis, cancer, reperfusion or ischemia in stroke or heart attack, autoimmune diseases, and other disorders.



I

The compounds of Formula I, a prodrug of said compound or isomer, or a pharmaceutically acceptable salt of said compound, isomer or prodrug; wherein R¹ is -H;

R² is substituted and unsubstituted heterocyclic, cycloalkyl, aryl, heteroaryl; wherein heterocyclic is a 5-, 6- or 7-membered saturated, partially saturated or unsaturated ring containing from one to three heteroatoms independently selected from the group consisting of nitrogen, oxygen and sulfur; and including any bicyclic group in which any of the above heterocyclic rings is fused to a benzene ring or another heterocycle; and the nitrogen may be in the oxidized state giving the N-oxide form; and optionally substituted with R_y;

R_y for each occurrence is independently -halo, -OH, -(C₁-C₈)alkyl, -(C₂-C₈)alkenyl, -(C₂-C₈)alkynyl, -O(C₁-C₈)alkyl, -O(C₂-C₈)alkenyl, -O(C₂-C₈)alkynyl,

$-(C_1-C_6)alkyl-NR^{13}R^{14}$, $-C(O)-NR^{13}R^{14}$, $-SO_2R^{13}$, $-SOR^{13}$, $-SR^{13}$, $-NR^{13}-SO_2R^{14}$, $-NR^{13}-C(O)-R^{14}$, $-NR^{13}-OR^{14}$, $-SO_2-NR^{13}R^{14}$, $-CN$, $-CF_3$, $-C(O)(C_1-C_6)alkyl$, $=O$, $-SO_2$ -phenyl, or $C(O)-Ar$ or $het-Ar$;

R^3 is independently $-H$, $-halo$, $-OH$, $-(C_1-C_{10})alkyl$, OCH_3 , NH_2 , NHR ,

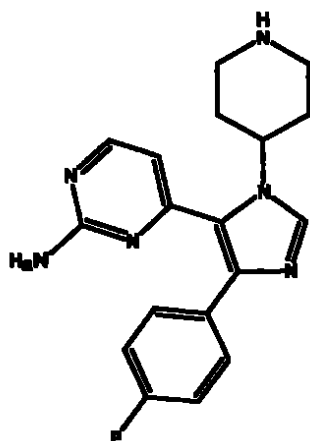
5 wherein R is aryl, heteroaryl or alkyl; and

R^4 is substituted and unsubstituted aryl and heteroaryl;

R^{13} and R^{14} for each occurrence are each independently $-H$; $-(C_1-C_6)alkyl$, wherein 1 or 2 carbon atoms, other than the connecting carbon atom, may optionally be replaced with 1 or 2 heteroatoms independently selected from S , O and N and
10 wherein each carbon atom is optionally substituted with 1, 2 or 3 halo;
 $-(C_2-C_6)alkenyl$, optionally substituted with 1, 2 or 3 halo; or $-(C_2-C_6)alkynyl$ wherein one carbon atom, other than the connecting carbon atom and the ethynyl atoms, may optionally be replaced with one oxygen atom and wherein each carbon atom is optionally substituted with 1, 2 or 3 halo;

15 or R^{13} and R^{14} are taken together with N to which they are attached to form het .

In particular, the compound, MAPKI #1, is a species of the genus described in compound of Formula I. MAPKI #1 is the subject of W095/02591A1 and W098/21452A1 (hereby incorporated by reference in its entirety) and may be
20 prepared as more fully described therein.

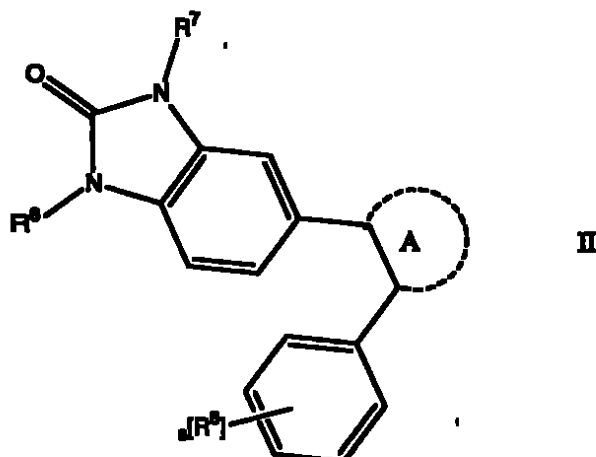


MAPKI #1

The compound of Formula II, 5-(phenylheteroaryl)-1,3-dihydro-2-benzimidazolones, is also a p38 MAP kinase inhibitor, and is useful in the treatment
25

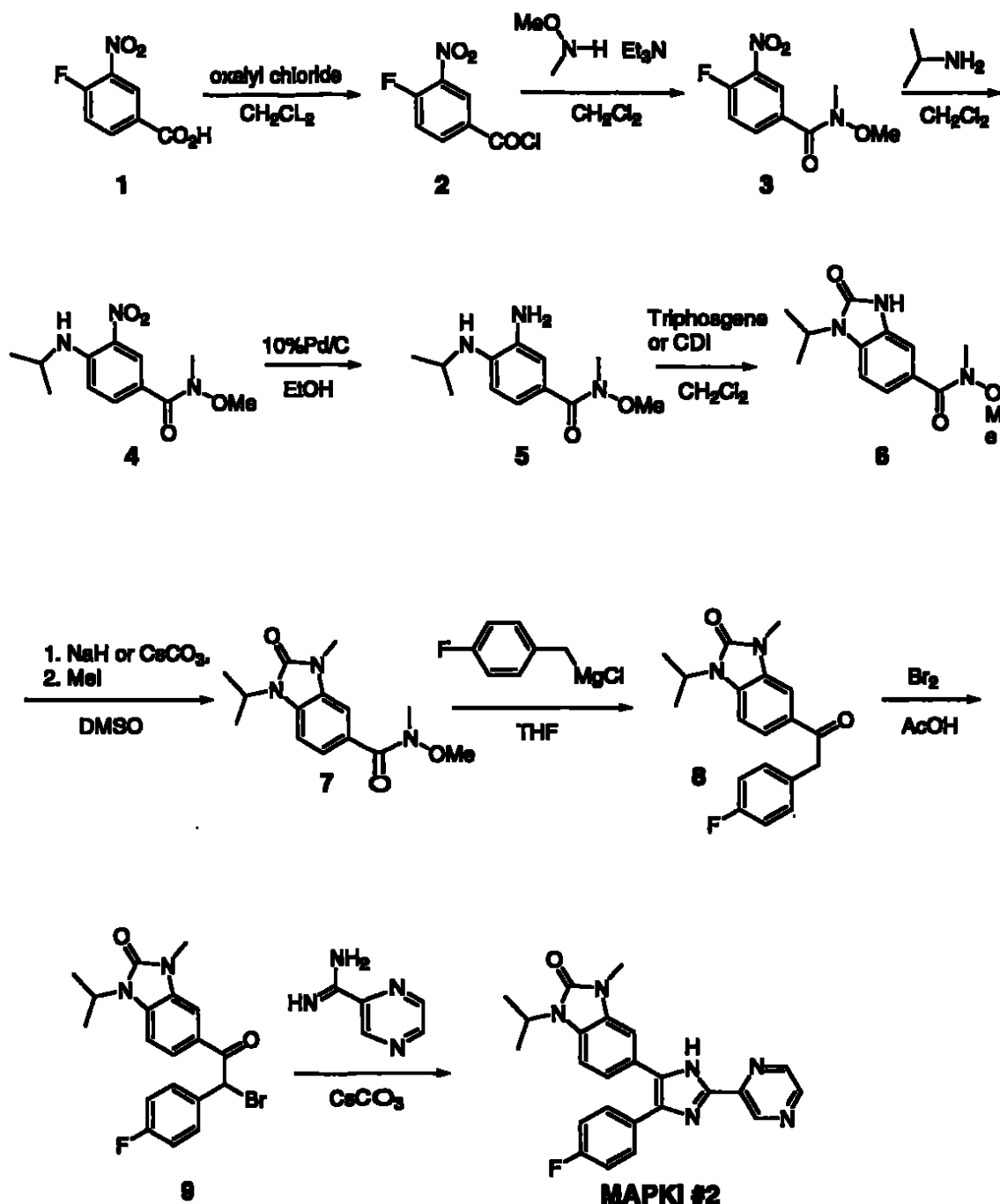
2/30

of inflammation, osteoarthritis, rheumatoid arthritis, cancer, reperfusion or ischemia in stroke or heart attack, autoimmune diseases, and other disorders.



- 5 The compound of Formula II, wherein "A" is substituted or unsubstituted pyrrolyl, imidazolyl, pyrazolyl, oxazolyl, isoxazolyl, thiazolyl, or isothiazolyl; R⁶ and R⁷ are independently H or substituted or unsubstituted (cyclo)alkyl, phenyl, heteroaryl, or heterocyclyl; R⁸ is independently halo, (perhalo)alkyl, (perhalo)cycloalkyl, alkenyl, alkynyl, heterocyclyl(oxy), phenyl, OH, (perhalo)alkoxy, phenoxy, alkylthio, alkyl(amino)sulfonyl, alkylsulfamoyl, carbamoyl, acyl or carboxy; and s is 0-5 is the
10 subject of WO 2002/072576 (hereby incorporated by reference in its entirety) and the preparation of the compound of Formula II is described therein.

- 15 The compounds of Formula II, wherein "A," R⁶, R⁷, R⁸ and s are defined above, may be prepared, as more fully described in WO 2002/072576 (Note: the variables "A, R⁶, R⁷, R⁸" may be identified with different designations in WO 2002/072576). In particular, the compound, MAPK1 #2, may be prepared as set forth below in Scheme I.

20
31**SCHEME I**

- 5 The compound, MAPK1 #2, was prepared as set forth above in Scheme I. 4-Fluoro-N-methoxy-N-methyl-3-nitro-benzamide (3) was prepared by taking up 4-Fluoro-3-nitrobenzoic acid (1) (100 g, 0.54 mol) in dry methylene chloride (1 L) and

3132

-15-

1.5 mL of DMF was added. To this solution was added oxalyl chloride (61 mL, 0.702 mol). After 1.5 hours, the solvent was removed *in vacuo* and the crude acid chloride (2) (yellow oil) was taken up in methylene chloride (50 mL) and slowly added to a stirring mixture of triethylamine (150.5 mL, 1.08 mol) and Walnreb amine
5 hydrochloride (68.5 g, 0.702 mol) in methylene chloride (950 mL) at 0°C. The reaction was allowed to warm to room temperature and stirred overnight. The reaction mixture was washed with saturated sodium dihydrogen phosphate, followed by water. The organic phase was dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated *in vacuo* to an orange-yellow oil. The crude oil was triturated with
10 pentane to give 110.28 g (90%) of a yellow to off-white powder (3).

To a solution of 4-fluoro-N-methoxy-N-methyl-3-nitro-benzamide (3) (20 gm, 87.6 mmol) in methylene chloride (250 mL) was added isopropyl amine (11.4 g, 192.8 mmol) in several portions. The reaction was stirred overnight at room temperature; the reaction was determined to be complete by ¹HNMR the following
15 morning. The reaction mixture was washed with water (2 X 100 mL) and the organic phase was dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated *in vacuo* to afford 24.95 g (97%) of a yellow solid (4).

To a solution/slurry of 4-isopropylamino-N-methoxy-N-methyl-3-nitro-benzamide (4) (24.95 g, 93 mmol) in ethanol (500 mL) was added 10% Pd on carbon
20 (approximately 1 g). The resulting black slurry was hydrogenated on a Parr shaker for 5 hours, after which TLC (ethyl acetate) showed complete consumption of starting material. (Also, the color of the ethanol solution goes from bright yellow to clear, indicating complete consumption of starting material.) The catalyst was removed by filtration through celite, and the solvent was removed *in vacuo* to give 21.95 gm
25 (>98%) of the substituted aniline (5) as a dark purple, viscous oil which was used without further purification.

To a solution of 3-amino-4-isopropylamino-N-methoxy-N-methyl-benzamide (5) (21.95 g, 92 mmol) in methylene chloride (300 mL) was added triphosgene (27 g, 92 mmol) in small portions (CAUTION: GAS EVOLUTION). After the addition of the
30 triphosgene was complete, the reaction was stirred overnight at room temperature, after which time ¹HNMR and TLC showed complete reaction. The organic phase was washed three times with saturated sodium bicarbonate solution, the organic phase

2/33

was dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated *in vacuo* to give 24.2 g (quantitative) of a red foam (6) which was used without further purification.

An alternate cyclization to avoid the use of triphosgene can be accomplished by using carbonyl diimidazole. To a stirred solution of 3-amino-4-tert-butylamino-N-methoxy-N-methyl-benzamide (22.5 g, 89.5 mmol) in dry methylene chloride (250 mL) was added carbonyl diimidazole (16.0 g 98.5 mmol) in small portions (heat evolution). After stirring for 4 hours, ¹HNMR of an aliquot of the reaction showed no starting material. Saturated sodium bicarbonate solution was added to the reaction mixture and the organic phase was separated, washed with saturated bicarbonate solution and brine, then dried over anhydrous sodium sulfate. Concentration *in vacuo* afforded 25.68 g of a dark foam (6, but with alternate amine), which was used without further purification.

To a slurry of sodium hydride (720 mg of a 60% dispersion in mineral oil, 18 mmol) in dry DMSO (25 mL) was added 1-isopropyl-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzimidazole-5-carboxylic acid methoxy-methyl-amide (6). (4.2 g, 16 mmol) in small portions (CAUTION: GAS EVOLUTION). The resulting mixture was stirred for 30 minutes during which time the solution turned brown. A solution of methyl iodide (1.5 mL, 24 mmol) in DMSO (10 mL) was then added dropwise and the resulting solution stirred until TLC (ethyl acetate) showed complete reaction. The reaction was quenched with water (15 fold volume excess) and the aqueous phase was extracted with ethyl acetate (3 X 200 mL). The combined organic phases were washed with water and brine. The organic phase was dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated *in vacuo* to afford 4.8 g (98%) of a brown oil (7).

An alternate alkylation may be accomplished by using cesium carbonate. To a stirred solution of 4-amino-3-ethoxycarbonylamino-benzoic acid methyl ester (23.8 g, 99 mmol) in DMF (330 mL, 0.3 M final concentration) was added cesium carbonate (114 g, 350 mol, 3.5 eq.). The resulting green slurry was heated at 70° C overnight, after which time ¹HNMR of an aliquot of the reaction mixture showed complete cyclization (as the reaction proceeds, the color changes from green to brown). The reaction was then cooled to room temperature and ethyl iodide (22.7 mL, 218 mmol) was added. The reaction was stirred at room temperature for 1 hour after which time ¹HNMR of an aliquot showed complete reaction. The reaction mixture

3334

-17-

was then diluted with water (15 volumes) and the resulting aqueous layer was extracted with ethyl acetate (3 X 150 mL). The organics were combined, washed with 1N HCl and water. The organic phase was dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated *in vacuo* to give 19.4 g of an orange solid (7, but with alternate amine) which was used without further purification.

To a stirred solution of 1-isopropyl-3-methyl-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzimidazole-5-carboxylic acid methoxy-methyl-amide (7) (17 g, 61 mmol) in dry DME (700 mL) was added *p*-fluorobenzylmagnesium chloride (Rieke Metals, 0.25 M in Et₂O, 400 mL, 100 mmol). The reaction mixture was allowed to stir overnight, after which time ¹H NMR of an aliquot of the reaction indicated no starting material remained. The excess Grignard reagent in the reaction mixture was quenched with saturated aqueous sodium dihydrogen phosphate, and the DME was removed *in vacuo*. The remaining aqueous phase was extracted with ethyl acetate (3 X 200 mL) and the combined extracts were dried over anhydrous sodium sulfate and the solvent was concentrated *in vacuo*. Chromatography (Flash 75, gradient elution 25% ethyl acetate-hexanes to 50% ethyl acetate-hexanes) afforded 15 g of a white solid (8).

To a stirred solution of 1-isopropyl-3-methyl-5-*p*-fluorophenylacetyl-1,3-dihydro-benzimidazol-2-one (8) (10.0 g, 31 mmol) in acetic acid (60 mL) was added bromine (1.63 mL, 31.6 mmol) in one portion. The reaction was allowed to stir overnight (c.a. 4 hours) after which time it was found to be complete by ¹H NMR. The reaction was concentrated *in vacuo* and the residue was taken up in ethyl acetate (150 mL) and washed twice with saturated sodium bicarbonate solution. The organic phase was dried with anhydrous sodium sulfate and concentrated *in vacuo* to afford 12.1 g of a tan solid (9) that was used without purification.

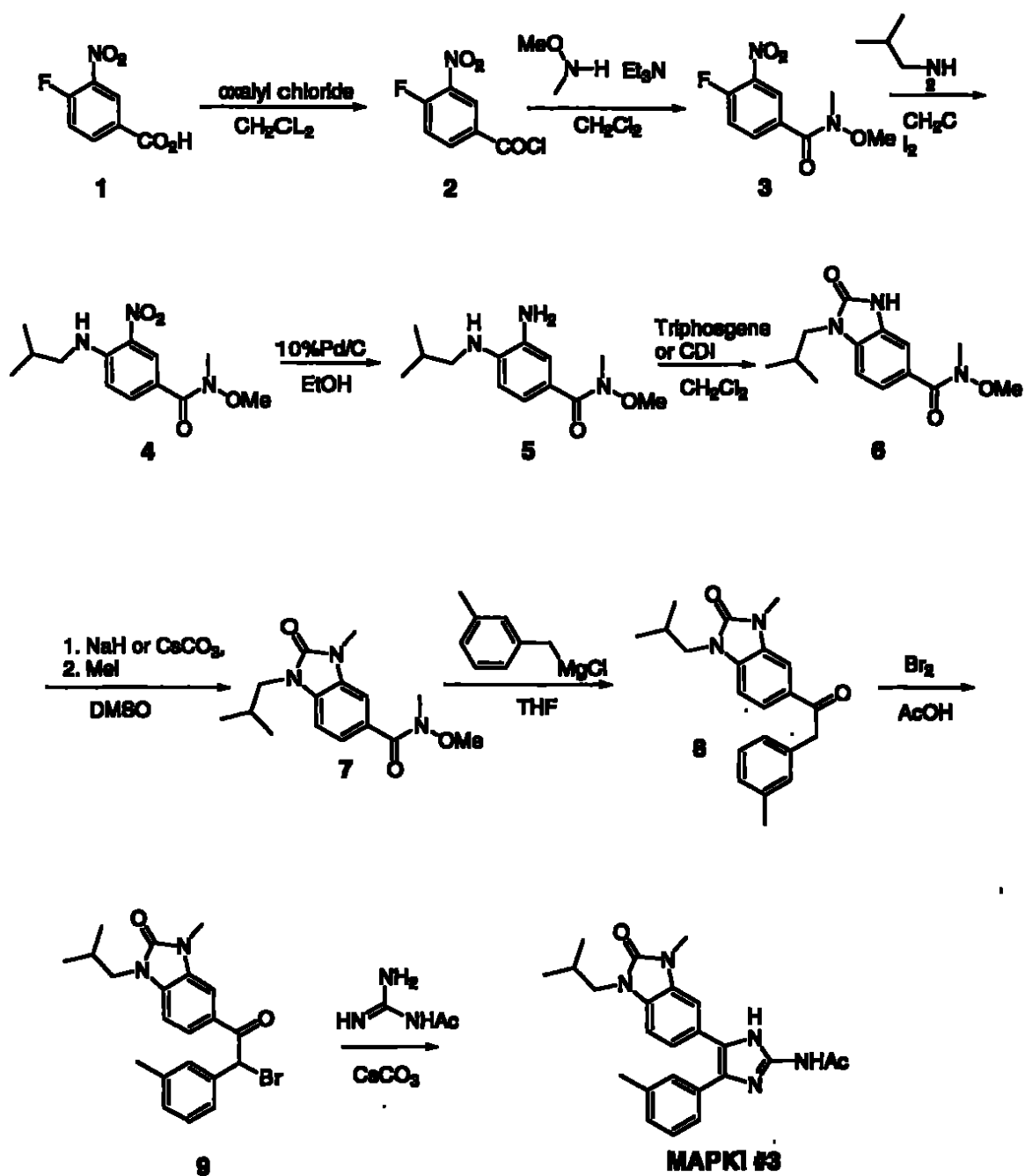
A stirred mixture of 5-(bromo-*p*-fluorophenyl-acetyl)-1-isopropyl-3-methyl-1,3-dihydro-benzimidazol-2-one (8) (0.5 g, 1.23 mmol), pyrazine-2-carboxamide hydrochloride (0.395 g, 2.49 mmol), cesium carbonate (1.22 g, 3.74 mmol) and DMF (4.0 mL) was heated to 60° C. After 1 hour, the reaction was determined to be complete by LCMS. The reaction was cooled to room temperature and diluted with water (40 mL). After stirring for 1 hour, the crude suspension was filtered and the solids were purified by flash chromatography (diethyl ether, followed by ethyl acetate to afford 40 mg of the title compound (MAPK1 #2) as a light tan solid.

3435

The compound, MAPKI #3, was prepared as described above in Scheme I and below in Scheme II, except that in Step 3, *t*-butyl amine is utilized, instead of isopropyl amine, to prepare the compound of Formula 4.

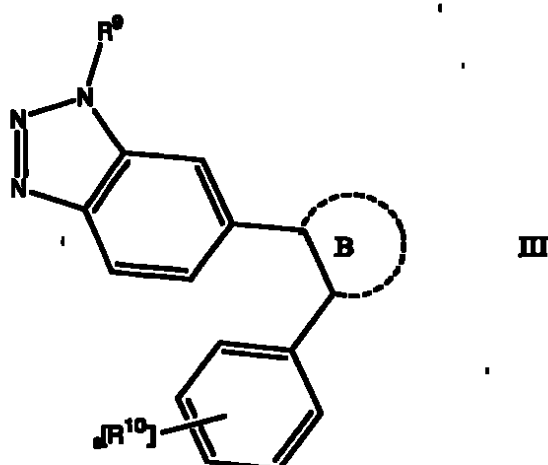
SCHEME II

5



3536

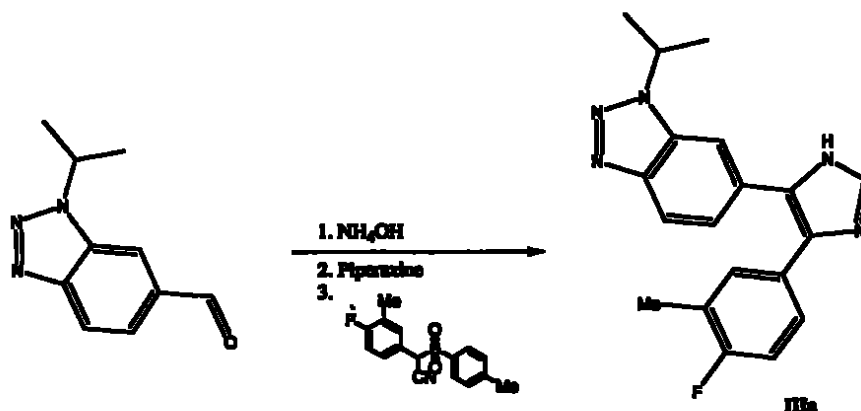
The compound of Formula III is a potent inhibitor of MAP kinases, preferably p38 kinase, and is useful in the treatment of inflammation, osteoarthritis, rheumatoid arthritis, cancer, reperfusion or ischemia in stroke or heart attack, autoimmune diseases and other disorders. The compound of Formula III, wherein "B" is a substituted or unsubstituted hetero group, such as pyrrolyl, imidazolyl, pyrazolyl, oxazolyl; R⁹ is H, alkyl, cycloalkyl, heterocycloalkyl, aryl or heteroaryl; R¹⁰ is H, alkyl, Ph, F, Cl or CN; and s is 0-5, is the subject of U.S. 2003-078432 (incorporated herein by reference in its entirety. Note the variables R⁹ and R¹⁰ are defined as different variables in US 2003-078432), and the preparation of the compound of Formula III is described therein.



For general illustrative purposes, the reaction Scheme III depicted below provides a potential route for synthesizing the compound of Formula IIIa. For a more detailed description of the individual reaction steps, see the reference described above.

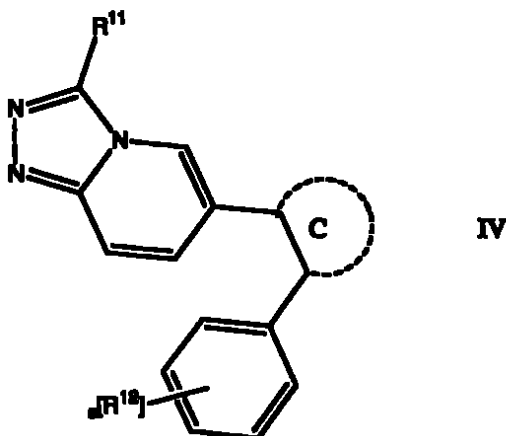
37
26

SCHEME III



In particular, the compound of Formula III, wherein "B," R^9 , R^{10} and s are defined above, may be prepared, as set forth in Scheme III and as more fully described in U.S. 2003-078432 (Note: the designation of "B," R^9 , R^{10} is different and is described with different variables in U.S. 2003-078432) by treating a THF solution of 3-isopropyl-3H-benzotriazole-5-carbaldehyde with concentrated NH_4OH , followed by the addition of piperazine and the isocyanide compound to provide the compound of Formula IIIa.

The compounds of Formula IV, 8-(phenylheterocyclyl)-[1,2,4]triazolo[4,3-a]pyridines, are useful in the treatment of inflammation, osteoarthritis, rheumatoid arthritis, cancer, reperfusion or ischemia in stroke or heart attack, autoimmune diseases, and other disorders. The compound of Formula IV is the subject of WO 2002072579 (incorporated herein by reference in its entirety), and the preparation of the compound of Formula II is described therein.

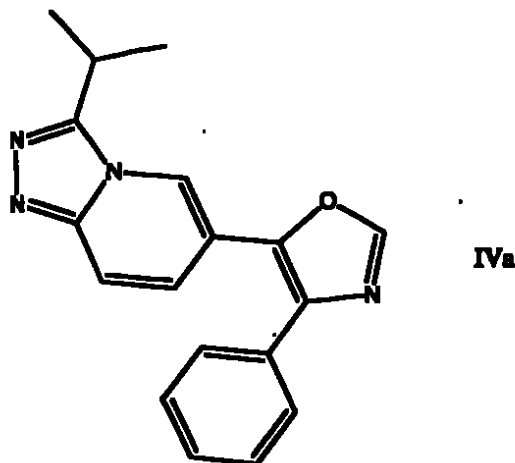


30
27

-21-

The compounds of Formula IV, wherein "C" is substituted or unsubstituted pyrrolyl, imidazolyl, pyrazolyl, oxazolyl, isoxazolyl, thiazolyl, or isothiazolyl; R¹¹ is H, alkenyl, alkynyl, or substituted or unsubstituted (cyclo)alkyl, phenyl, heteroaryl, or heterocyclyl, or amino; R¹² is halo, (cyclo)alkyl(oxy), (perhalo)alkyl, alkenyl, alkynyl, phenyl, heteroaryl(oxy), heterocyclyl(oxy), OH, (perhalo)alkoxy, phenoxy, alkylthio, alkylsulfonyl, alkylaminosulfonyl, NO₂, substituted and unsubstituted amino or carbamoyl; and s is 0-5; or pharmaceutically acceptable salts thereof, are useful in treating acute inflammation in animals.

The compounds of Formula IV, wherein "C," R¹¹, R¹² and s are defined above, may be prepared, as more fully described in WO 2002072579 (Note: the designation of "C," R¹¹, R¹² are defined with different variables in WO 2002072579). For example, the compound of Formula IVa was prepared by condensing 6-chloronicotinic acid with N,O-dimethylhydroxylamine.hcl.HCl (98%). Treatment of the amide with (t-Bu)₂AlH provided the aldehyde (24%), which was then coupled with (phenyl)(p-tolylsulfonyl)methylisocyanide to afford 2-chloro-5-(4-phenyloxazol-5-yl)pyridine (71%). Conversion to the hydrazine (100%), followed by coupling with isobutyryl chloride and cyclization using POCl₃ (32%), produced the compound of Formula IVa.



20

In accordance with the present invention, a subject animal suffering from an acute inflammatory condition, such as, for example, mastitis, is administered an effective amount of at least one p38 MAP kinase inhibitor and within about one to two

31
258
7

weeks the animal produces more than twice as much milk as an infected, non-medicated animal. In a preferred embodiment the animal is a lactating cow.

Lactating animals suffering from infections caused by *E. coli*, for example, often produce milk which contains elevated *E. coli* counts and which milk is not suitable for mammalian consumption, even after processing. The present invention also provides for the reduction of milk discard in an animal suffering from an acute inflammatory condition with the administration of at least one p38 MAP kinase inhibitor. Milk discard reduction is rapid and occurs within about one week. The present invention further provides methods for the reduction in *E. coli* numbers in milk samples from animals treated with p38 MAP kinase inhibitors.

The p38 MAP kinase inhibitor of the present invention can be used in the treatment of an inflammatory condition in an animal, which is exacerbated or caused by excessive or unregulated cytokine production in animal cells including but not limited to monocytes and/or macrophages. Preferred p38 MAP kinase inhibitors include MAPK1 #1, MAPK1 #2 and MAPK1 #3.

The p38 MAP kinase inhibitors of the present invention are thus capable of inhibiting the production and activity of cytokines associated with the inflammatory process such as IL-1, IL-6 and TNF and are therefore of use in therapy. IL-1, IL-6 and TNF affect a wide variety of cells and tissues and these cytokines, as well as other leukocyte-derived cytokines, are important inflammatory mediators of a wide variety of disease states and conditions. The p38 MAP kinase inhibitors of the present invention also inhibit pro-inflammatory proteins, such as COX-2, also referred to by many other names such as prostaglandin endoperoxide synthase-2 (PGHS-2). Regulation of COX-2 which is responsible for the production of proinflammatory lipid mediators also affects a wide variety of cells and tissues. The regulation of inflammatory cytokines and inflammatory proteins is thus critical for ameliorating a wide variety of diseases and conditions including, but not limited to mastitis.

Accordingly, in another aspect, the present invention provides a method of treating an animal by inhibition of the synthesis of the COX-2 enzyme comprising the administration of an effective amount of at least one p38 MAP kinase inhibitor.

The present invention also provides a method of treating cytokine-mediated acute inflammation which comprises administering an effective amount of a p38 MAP

40
99

-23-

kinase inhibitor and a pharmaceutically acceptable carrier. In one embodiment the present invention provides a method of inhibiting TNF. In another embodiment the present invention provides a method of inhibiting IL-1. In still another embodiment, the present invention provides a method of inhibiting apoptotic cell death mediated through the p38 MAP kinase pathway.

In particular, p38 MAP kinase inhibitors are employed in the treatment of a disease or condition in an animal which is exacerbated by or caused by excessive or unregulated IL-1 or TNF production in animal cells including but not limited to, monocytes and/or macrophages.

There are many conditions or diseases in which excessive or unregulated cytokine production is implicated in exacerbating and/or causing disease. These include acute inflammatory disease states in animals such as mastitis, respiratory disease, retained placental membranes, metritis, pyometra, enteritis, hepatitis, nephritis, septicemia, laminitis, frost bite, colic, displaced abomasums, endotoxemia and cecal torsion.

The p38 MAP kinase inhibitors are administered in an amount sufficient to inhibit cytokine effects and production, in particular IL-1, IL-6 or TNF, production such that cytokine production is down-regulated to normal levels, or in some case to subnormal levels, so as to ameliorate or prevent the disease state. Cytokine level measurement is accomplished by the skilled artisan using conventional means.

As used herein, the term "cytokine" refers to any secreted polypeptide that affects the functions of cells and is a molecule which modulates interactions between cells in the inflammatory response. A cytokine includes, but is not limited to, monokines and lymphokines, regardless of which cells produce them. Examples of cytokines include, but are not limited to, Interleukin-1, (IL-1), Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α) and Tumor Necrosis Factor beta (TNF- β).

In order to employ a p38 MAP kinase inhibitor in therapy, such inhibitor will normally be formulated into a pharmaceutical composition in accordance with standard pharmaceutical practice. This invention, therefore, also relates to a pharmaceutical composition comprising an effective, non-toxic amount of at least one p38 MAP kinase inhibitor and a pharmaceutically acceptable carrier.

241
210

p38 MAP kinase inhibitors and pharmaceutical compositions incorporating such may be conveniently administered to an animal by any of the routes conveniently used for drug administration, for instance, orally, topically, parenterally or by inhalation. The p38 MAP kinase inhibitors may be administered in conventional dosage forms prepared by combining a p38 MAP kinase inhibitor with standard pharmaceutical carriers according to conventional procedures. The p38 MAP kinase inhibitor may also be administered in conventional dosages in combination with a known, second therapeutically active compound or two or more p38 MAP kinase inhibitors can be administered at once to take advantage of the synergistic properties of the p38 MAP kinase inhibitors and provide enhanced inhibition of inflammation and conditions caused thereby.

Procedures for administering conventional dosages of p38 MAP kinase inhibitors may involve mixing, granulating and compressing or dissolving the ingredients as appropriate to the desired preparation. It will be appreciated that the form and character of the pharmaceutically acceptable character or diluent is dictated by the amount of active ingredient with which it is to be combined, the route of administration and other well-known variables. The carrier(s) must be "acceptable" in the sense of being compatible with the other ingredients of the formulation and not deleterious to the animal recipient thereof.

The pharmaceutical carrier employed may be, for example, either a solid or liquid. Exemplary of solid carriers are lactose, sucrose, talc, gelatin, agar, pectin, acacia, magnesium stearate, steric acid and the like. Exemplary of liquid carriers are syrup, peanut oil, olive oil, water and the like. Similarly, the carrier or diluent may include sustained release material well known to the art, such as glyceryl monostearate or glyceryl distearate alone or with a wax.

The term "systemic administration" refers to intravenous, subcutaneous and intramuscular administration. Systemic administration is preferred.

p38 MAP kinase inhibitors are preferably administered parenterally that is by intravenous, intramuscular, intramammary or subcutaneous administration. The subcutaneous and intramuscular forms of parental administration are generally preferred. Appropriate dosage forms for such administration may be prepared by conventional techniques.

42
H

For all methods of use disclosed herein for p38 MAP kinase inhibitors, the parenteral dosage regimen will preferably be from about 0.05 mg/kg to about 20 mg/kg of total body weight, preferably from about 0.1 mg/kg to 5 mg/kg, more preferably from about 0.1 mg/kg to 1 mg/kg. It will also be recognized by one of skill
5 In the art that the optimal quantity and spacing of individual dosages of p38 MAP kinase inhibitors thereof will be determined by the nature and extent of the condition being treated, the form, route and site of administration, and the particular patient being treated, and that such optimums can be determined by conventional techniques. It will also be appreciated by one of skill in the art that the optimal
10 course of treatment, *i.e.*, the number of doses of a p38 MAP kinase inhibitor given per day for a defined number of days, can be ascertained by those skilled in the art using conventional course of treatment determination tests.

EXAMPLE

15 Thirty-three lactating Holstein cows were randomly allotted to 5 treatment groups blocked by milk production and days in milk. Milk and blood samples and temperature data were collected at the morning milking on day -1. One normal quarter was selected from each cow based on clinical scores and California Mastitis Test (CMT) results performed at morning milking on day -1. After the evening
20 milking on day 41, selected quarters were infused with approximately 30 cfu of *E. coli* (MacDonald 487). Milk and blood samples and temperature data were collected prior to treatment at the morning milking on day 0. Cows were treated after the morning milking on day 0 according to the study design. After treatment, milk and blood samples and temperature data were collected at 11, 24, 35, 48, 72, 144, 168, 192,
25 and 216 hours. Clinical scores of infused quarters and milk production were assessed at each milking. Milk samples were analyzed for culture (*E. coli*), SCC, TNF- α and PGE₂ and blood leukograms were determined.

43
H**TABLE 1**

Treatment	Dose	Route	Number of Animals
1. Non-Infected, Vehicle-treated*		IV	6
2. Infected, Vehicle-treated		IV	6
3. Infected, MAPK1 #1	10 mg/kg	IV	7
4. Infected, MAPK1 #2	10 mg/kg	IV	7
5. Infected, MAPK1 #3	10 mg/kg	IV	7

*Vehicle in this study was 25% N-methyl-pyrrolidone and 25% dimethylsulfoxide in polyethylene glycol of a nominal weight of 400 Daltons.

5

Data Analysis

Assessment of test article efficacy was determined based upon a comparison of the treatment effect on each variable versus the challenged, non-medicated group. Data were analyzed using the MIXED procedure of PC-SAS version 6.12. The model included treatment, time and their interaction. Covariance within cows across time was modeled using the Repeated statement analysis with a spherical covariance structure to account for unequally spaced sampling times. Tests for significance ($P \leq 0.10$) were based upon the main treatment effect compared with the challenged, non-medicated group. The P value of ≤ 0.10 was selected based on the number of animals per treatment group and the conservative nature of the SAS procedure.

15

Response to *E. coli* challenge

Challenge of a single quarter of each cow with ~30 cfu of *E. coli* (MacDonald 487 strain) resulted in a severe mastitis within 13-24 hours. In all, 27 of 27 quarters challenged developed clinical mastitis. Peak rectal temperature and bacterial colony count data after challenge suggest that the resulting mastitis was more severe than observed in previous studies.

20

44
113

**Effects of treatment on acute phase
response to *E. coli* induced mastitis Body Temperature**

No significant differences in body temperature were observed after treatment between cows treated with any of the p38 MAP kinase inhibitor compounds and
5 infected, non-medicated cows (Figure 1).

Milk Production

Cows treated with MAPKI #1 demonstrated significantly less milk production loss associated with mastitis following treatment compared to infected cows treated
10 with vehicle ($P=0.1$, Figure 2). Based on the mean daily milk production values from Figure 2, a cow treated with MAPKI #1 produced more than twice as much milk as an infected, non-medicated cow during the 13 days after treatment (847 lbs vs. 365 lbs). Cows treated with MAPKI #2 also produced more milk than control cows (689 lbs vs. 365 lbs). Cows treated with MAPKI #3 produced the same amount of milk as
15 infected, non-medicated control cows during that time period (366 lbs vs. 365 lbs).

Clinical Score

Cows treated with MAPKI #1 and MAPKI #2 had significantly improved milk clinical scores than the non-medicated controls (Figure 3, $P<0.001$, $P=0.006$, respectively). Cows treated with MAPKI #3 had milk clinical scores similar to the
20 infected, non-medicated controls.

Significantly improved gland clinical scores were observed for cows treated with any of the three p38 MAP kinase inhibitor compounds (Figure 4, $P=0.0004$, $P=0.004$, $P<0.001$, respectively for MAPKI #1, MAPKI #2, MAPKI #3). Cows treated with MAPKI #1 and MAPKI #2 demonstrated significant improvement in both milk and
25 gland score. Cumulative clinical scores were also significantly lower for cows treated with MAPKI #1 and MAPKI #2 compared to controls (Figure 5, $P=0.0001$ and 0.07 , respectively).

Milk Somatic Cell Count (SCC)

30 Milk SCCs were increased at 13 hours post-challenge for cows in all treatment groups (Figure 6). Some milk samples that were grossly clotted were not analyzed for SCC, instead they were assigned the maximum value readable by the instrument of 10,000,000 cells/ml for data analysis purposes ($\log_{10} = 7$). Some

normal milk samples had SCC lower than the detectable limit of the instrument (2000 cells/ml) and were assigned a value of 1000 instead of 0 for data analysis purposes. Treatment of cows with the p38 MAPK1 compounds did not significantly improve SCC compared to infected, non-medicated control cows in this study. Cows treated with
5 MAPK1 #1 and MAPK1 #3 did show a trend towards lower SCC, particularly after 6 days post-treatment ($P=0.13$, 0.18 , respectively).

Leukograms

Total white blood cell and total neutrophil counts remained relatively
10 unchanged throughout the study for non-infected, non-medicated cows (Figures 7 and 8). Infected, non-medicated cows demonstrated the typical biphasic response for WBCs and PMNs. Both dropped dramatically after challenge (0-72 hours) and the WBC numbers returned to near pre-challenge levels and PMN numbers reached more than double the pre-challenge levels late in the study (144-216 hours). Total
15 WBC and PMN numbers for cows treated with MAPK1 #1 or MAPK1 #2 returned to pre-challenge levels significantly faster than for controls or cows treated with MAPK1 #3 when data was analyzed for 0-72 hours ($P=0.004$, 0.06 , respectively). These data suggest that soon after treatment with MAPK1 #1 or MAPK1 #2, fewer PMNs were recruited into the mammary gland from the peripheral blood. It is known that
20 neutrophils contribute to the tissue pathology in the mammary gland when they lyse and release their contents to the surrounding environment. Fewer neutrophils recruited to the gland results in less tissue pathology. Less tissue pathology results in a reduction in loss of milk production and a quicker return to normal milk and glands.

25

Whey PGE₂

After treatment at time 0 cows treated with MAPK1 #1, MAPK1 #2, or MAPK1 #3 all demonstrated a significant reduction in mean whey PGE₂ levels compared to infected, non-medicated control cows (Figure 9, $P=0.0038$, 0.0741 , 0.0934 ,
30 respectively). Whey PGE₂ levels were elevated at 13 hours after *E. coli* challenge (time 0) and prior to treatment. After treatment, cows treated with MAPK1 #1 showed a decline in whey PGE₂ levels at 11 hours, whey PGE₂ of cows treated with MAPK1 #2 remained at the same level and cows treated with MAPK1 #3 had whey PGE₂

levels continue to rise. Cows from all three treatment groups demonstrated declining whey PGE₂ levels 24 hours after treatment and all had returned to near baseline by 48 hours.

5

Milk *E. coli* Colony Counts

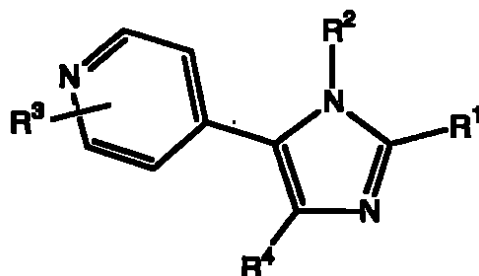
E. coli numbers in milk samples are illustrated in Figure 10. At the time of treatment (0 hour) mean *E. coli* colony counts in milk ranged from 14.5-19.1 log₂ cfu/ml for challenged groups. After treatment (11-168 hours) mean *E. coli* colony counts were significantly decreased for cows treated with MAPK1 #1 compared to infected, non-medicated controls ($P=0.007$). Cows treated with MAPK1 #2 also showed a decline in milk *E. coli* numbers compared to controls but the difference was not significant ($P=0.15$). Cows treated with MAPK1 #3 did not show a decline in milk *E. coli* numbers compared to controls. It is not believed that these compounds are directly antibacterial in nature but the p38 MAPK enzyme itself is involved in a number of cell processes, some of which may influence growth and/or survival of bacteria in the milk and mammary gland. Natural antibacterial peptides produced by bovine neutrophils (defensins) may be blocked or inhibited by the p38 MAPK enzyme. Inhibition of the enzyme by these compounds may allow natural release of these peptides and enhance bacterial killing by neutrophils. Another possible explanation is the p38 MAPK enzyme system contributes to activating apoptosis of neutrophils, by inhibiting p38 MAPK neutrophil apoptosis may be delayed and prolong the ability of neutrophils to fight infection.

Challenge of cows with *E. coli* resulted in a 100% incidence of clinical mastitis. Significant improvement in the acute phase response (less milk production loss, improved milk clinical score, gland clinical score, cumulative clinical score, total leukocyte count, whey PGE₂ and milk *E. coli* count) was observed for cows treated with MAPK1 #1 compared to infected, non-medicated controls. Significant reductions in milk, gland, and cumulative clinical scores and reduced milk *E. coli* counts were observed for cows treated with MAPK1 #2 compared to control cows. Cows treated with MAPK1 #3 showed significantly reduced whey PGE₂ and improved gland clinical scores but no trend for improved milk production or milk scores compared to infected controls.

47
 11/16

CLAIMS

1. A method of treating an inflammatory disease or enhancing the recovery from acute inflammatory disease in an animal in need thereof which comprises administering to said animal an effective amount of one or more p38 MAP kinase inhibitors.
2. A method for the enhancement of milk production or reduction of milk loss in an animal suffering from an acute inflammatory disease which comprises the administration to said mammal of an effective amount of one or more p38 MAP kinase inhibitors.
3. A method of inhibiting the synthesis and activity of the COX-2 enzyme, TNF or IL-1 in an animal comprising the administration of an effective amount of one or more p38 MAP kinase inhibitors.
4. A method of inhibiting apoptotic cell death in an animal comprising the administration of an effective amount of one or more p38 MAP kinase inhibitors.
5. The method of Claims 1, 2, 3 or 4 wherein the p38 MAP kinase inhibitor is selected from
 - (i) the compound of Formula I,



I

wherein R^1 is -H;

R^2 is substituted and unsubstituted heterocyclic, cycloalkyl, aryl, heteroaryl: wherein heterocyclic is a 5-, 6- or 7-membered saturated, partially saturated or unsaturated ring containing from one to three heteroatoms independently selected from the group consisting of nitrogen, oxygen and sulfur; and including any bicyclic group in which any of the above heterocyclic rings is fused to a benzene ring or another heterocycle; and the nitrogen may be in the oxidized state giving the N-oxide form; and optionally substituted with R_5 ;

48
H7

R_y for each occurrence is independently -halo, -OH, $-(C_1-C_6)$ alkyl, $-(C_2-C_6)$ alkenyl, $-(C_2-C_6)$ alkynyl, $-O(C_1-C_6)$ alkyl, $-O(C_2-C_6)$ alkenyl, $-O(C_2-C_6)$ alkynyl, $-(C_1-C_6)$ alkyl- $NR^{13}R^{14}$, $-C(O)-NR^{13}R^{14}$, $-SO_2R^{13}$, $-SOR^{13}$, $-SR^{13}$, $-NR^{13}-SO_2R^{14}$, $-NR^{13}-C(O)-R^{14}$, $-NR^{13}-OR^{14}$, $-SO_2-NR^{13}R^{14}$, $-CN$, $-CF_3$, $-C(O)(C_1-C_6)$ alkyl, $=O$, $-SO_2$ -phenyl, or $C(O)-Ar$ or $het-Ar$;

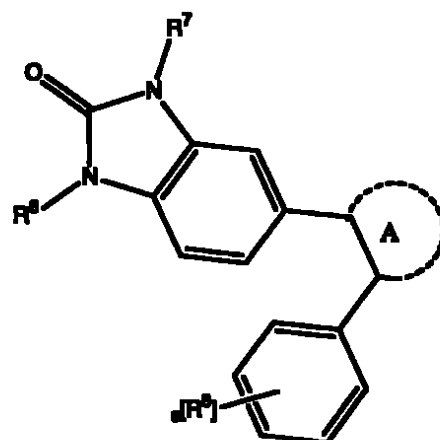
R^3 is independently -H, -halo, -OH, $-(C_1-C_{10})$ alkyl, OCH_3 , NH_2 , NHR , wherein R is Aryl, heteroaryl or alkyl; and

R^4 is substituted and unsubstituted aryl and heteroaryl;

R^{13} and R^{14} for each occurrence are each independently -H; $-(C_1-C_6)$ alkyl, wherein 1 or 2 carbon atoms, other than the connecting carbon atom, may optionally be replaced with 1 or 2 heteroatoms independently selected from S, O and N and wherein each carbon atom is optionally substituted with 1, 2 or 3 halo; $-(C_2-C_6)$ alkenyl, optionally substituted with 1, 2 or 3 halo; or $-(C_2-C_6)$ alkynyl wherein 1 carbon atom, other than the connecting carbon atom and the ethynyl atoms, may optionally be replaced with 1 oxygen atom and wherein each carbon atom is optionally substituted with 1, 2 or 3 halo;

or R^{13} and R^{14} are taken together with N to which they are attached to form het ;

(II) the compound of Formula II,



II

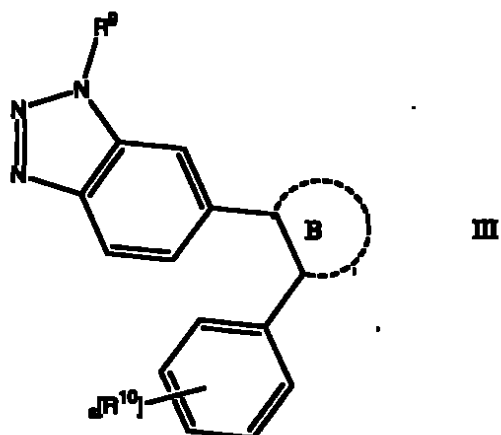
wherein "A" is substituted or unsubstituted pyrrolyl, imidazolyl, pyrazolyl, oxazolyl, isoxazolyl, thiazolyl, or isothiazolyl;

R^8 and R^7 are independently H or substituted or unsubstituted (cyclo)alkyl, phenyl, heteroaryl, or heterocyclyl;

R^8 is independently halo, (perhalo)alkyl, (perhalo)cycloalkyl, alkenyl, alkynyl, heterocycliyl(oxy), phenyl, OH, (perhalo)alkoxy, phenoxy, alkylthio, alkyl(amino)sulfonyl, alkylsulfamoyl, carbamoyl, acyl or carboxy; and

s is 0-5;

5 (III) the compound of Formula III



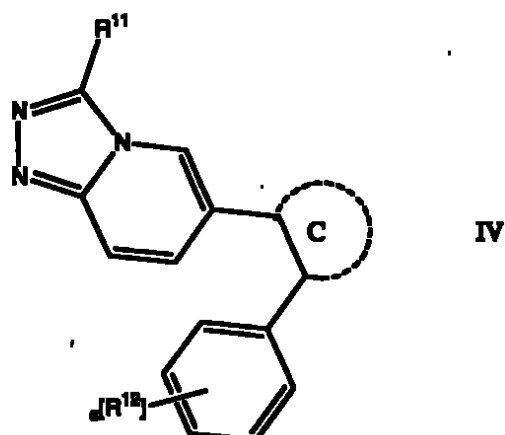
wherein "B" is a substituted or unsubstituted hetero group, pyrrolyl, imidazolyl, pyrazolyl or oxazolyl;

10 R^8 is H, alkyl, cycloalkyl, heterocycloalkyl, aryl or heteroaryl;

R^{10} is H, alkyl, phenyl, F, Cl or CN; and

s is 0-5; or

(IV) the compound of Formula IV,



15 wherein "C" is substituted or unsubstituted pyrrolyl, imidazolyl, pyrazolyl, oxazolyl, isoxazolyl, thiazolyl, or isothiazolyl;

50
#19

R^{11} is H, alkenyl, alkynyl, or substituted or unsubstituted (cyclo)alkyl, phenyl, heteroaryl, or heterocyclyl, or amino;

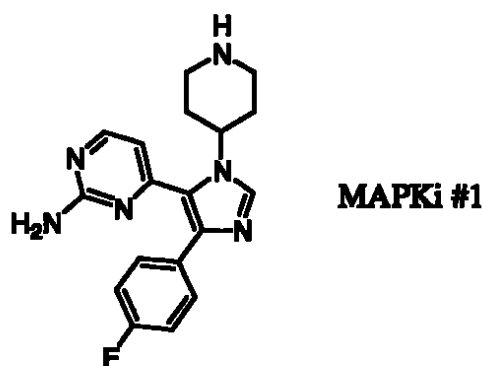
R^{12} is halo, (cyclo)alkyl(oxy), (perhalo)alkyl, alkenyl, alkynyl, phenyl, heteroaryl(oxy), heterocyclyl(oxy), OH, (perhalo)alkoxy, phenoxy, alkylthio, alkylsulfonyl, alkylaminosulfonyl, NO_2 , substituted and unsubstituted amino or carbamoyl; and

s is 0-5.

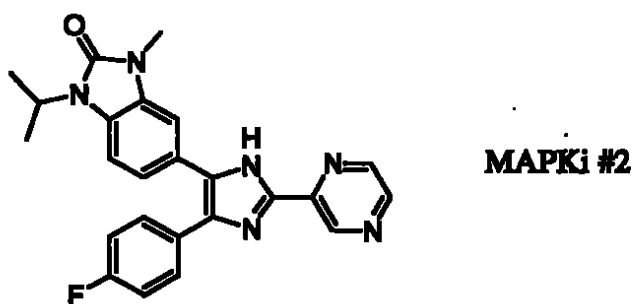
6. The method of Claim 5 wherein the p38 MAP kinase inhibitor is

(i) a compound MAPKi #1

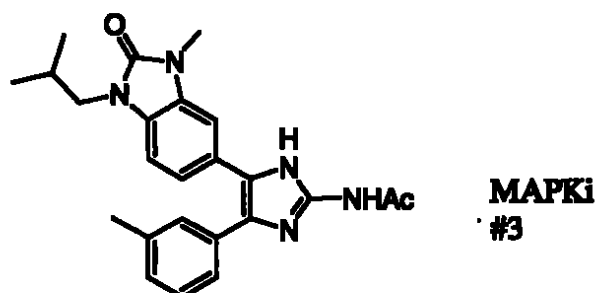
10



(ii) a compound MAPKi #2



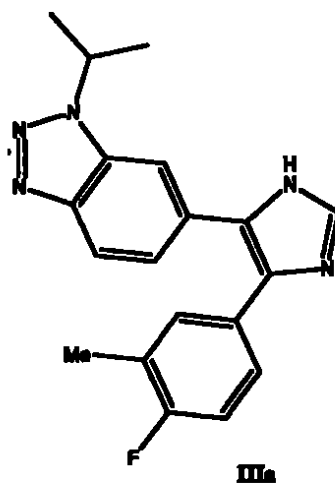
(iii) a compound MAPKi #3



15

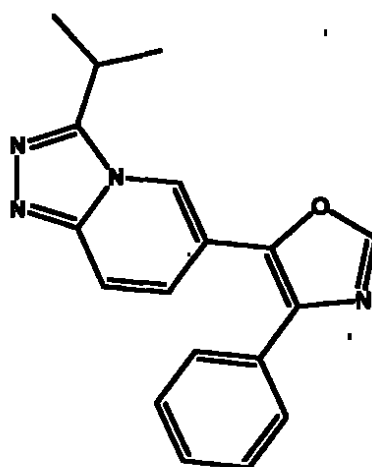
(iv) a compound of Formula IIIa

-34-



IIIa ; or .

(v) a compound of Formula IVa



IVa

7. The method of Claim 5 wherein the inflammatory disease is selected
5 from the group consisting of mastitis, respiratory disease, replaced placenta
membranes, metritis, pyometra, enteritis, hepatitis, nephritis, septicemia,
endotoxemia, laminitis, frostbite and obstructive bowel problems.

8. The method of Claim 5 wherein the obstructive bowel problems are
selected from the group consisting of colic, displaced abomasum, and cecal torsion.

10 9. The method of Claim 5 or 6 wherein the inflammatory disease is
mastitis and the animal is a cow.

10. The method of Claims 5-9 further comprising a pharmaceutically
acceptable carrier.

52
51

11. The use of the compounds of Claims 5-9 in the manufacture of a medicament for the therapeutic and/or prophylactic treatment of the diseases of Claims 7-12.

5 12. The use of the compounds of Claims 5-9 in the preparation of an inhibitor of one or more p38 MAP kinase inhibitors for the enhancement of milk production or reduction of milk loss or discard in an animal.

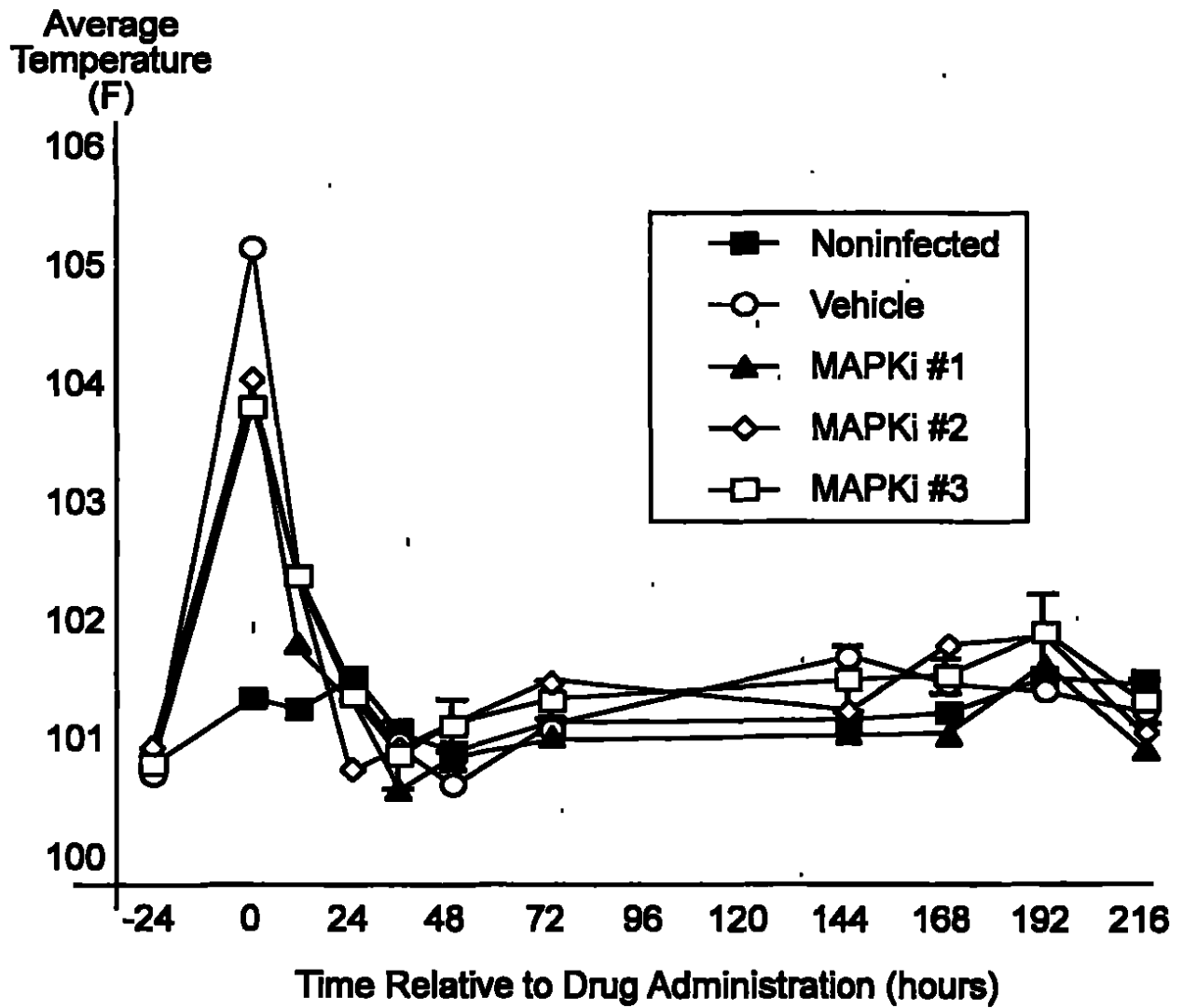
10 13 The use of the compounds of Claims 5-9 in the preparation of an inhibitor of a COX-2 enzyme, TNF, IL-1 or the inhibiting of apoptotic cell death for treating or preventing the reduction of milk loss in an animal suffering from an acute inflammatory disease.

15 14. A process for the manufacture of a medicament for use in the treatment of inflammatory disease characterized by the use of the compounds of claims 5-9.

20 15. The use of the compounds of Claims 5-9 in the manufacture an inhibitor of a COX-2 enzyme, TNF, IL-1 or the inhibiting of apoptotic cell death, in a package together with instructions for its use in the treatment of of inflammatory disease or reduced milk production in animals.

53

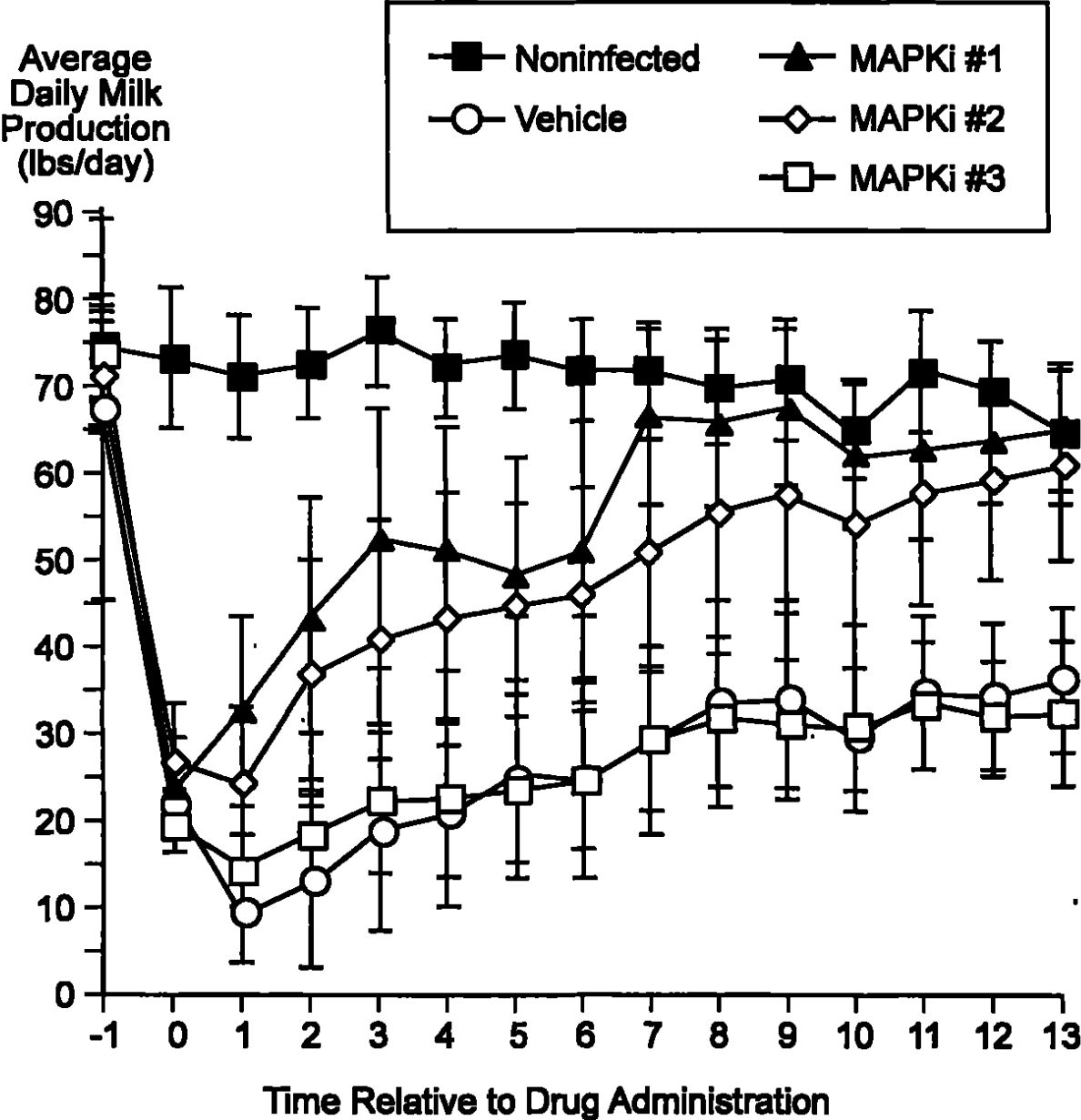
1/10

FIG. 1

54
50

2/10

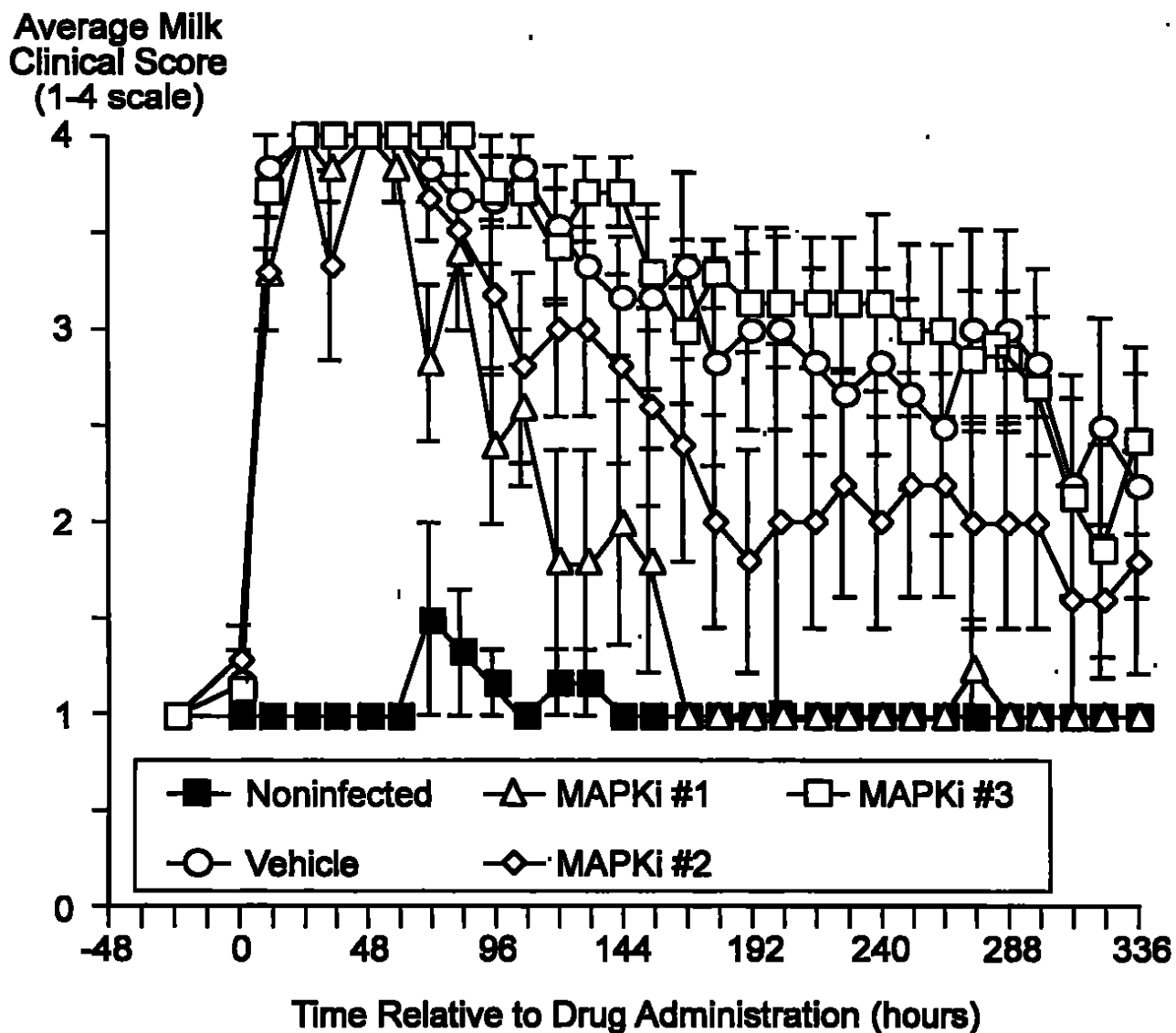
FIG. 2



55
54

3/10

FIG. 3

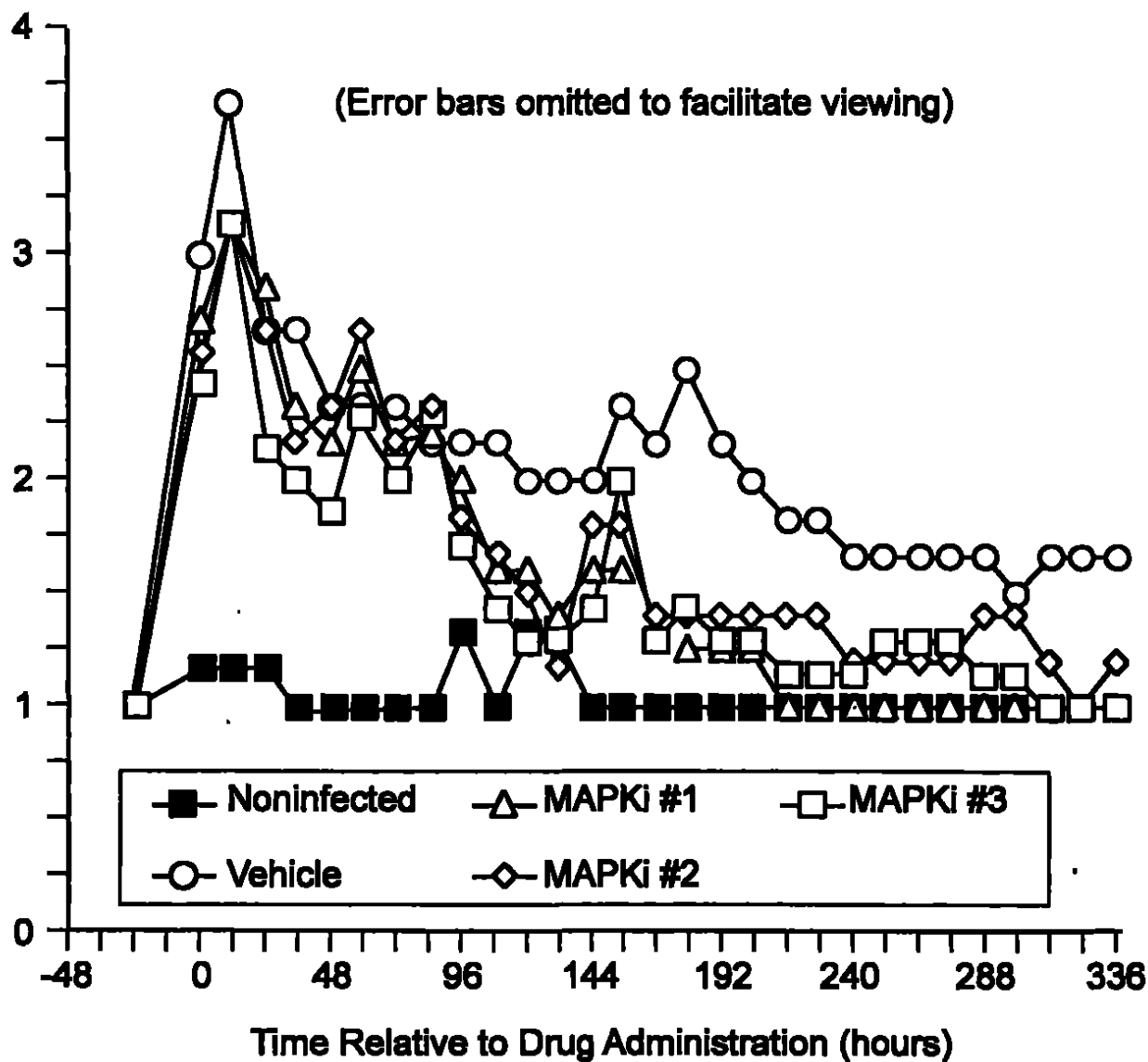


46
55

4/10

FIG. 4

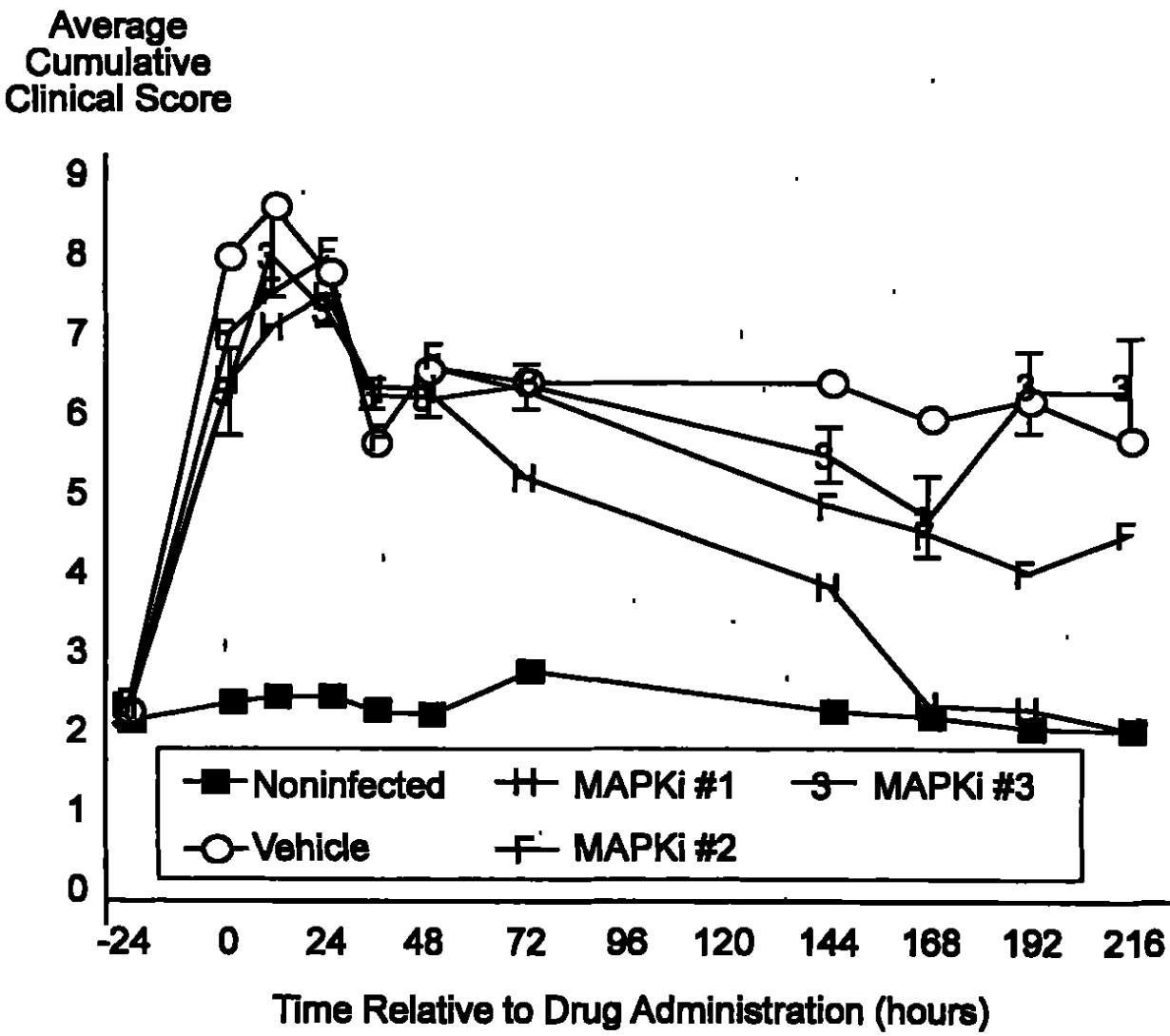
Average Gland
Clinical Score
(1-4 scale)



57
56

5/10

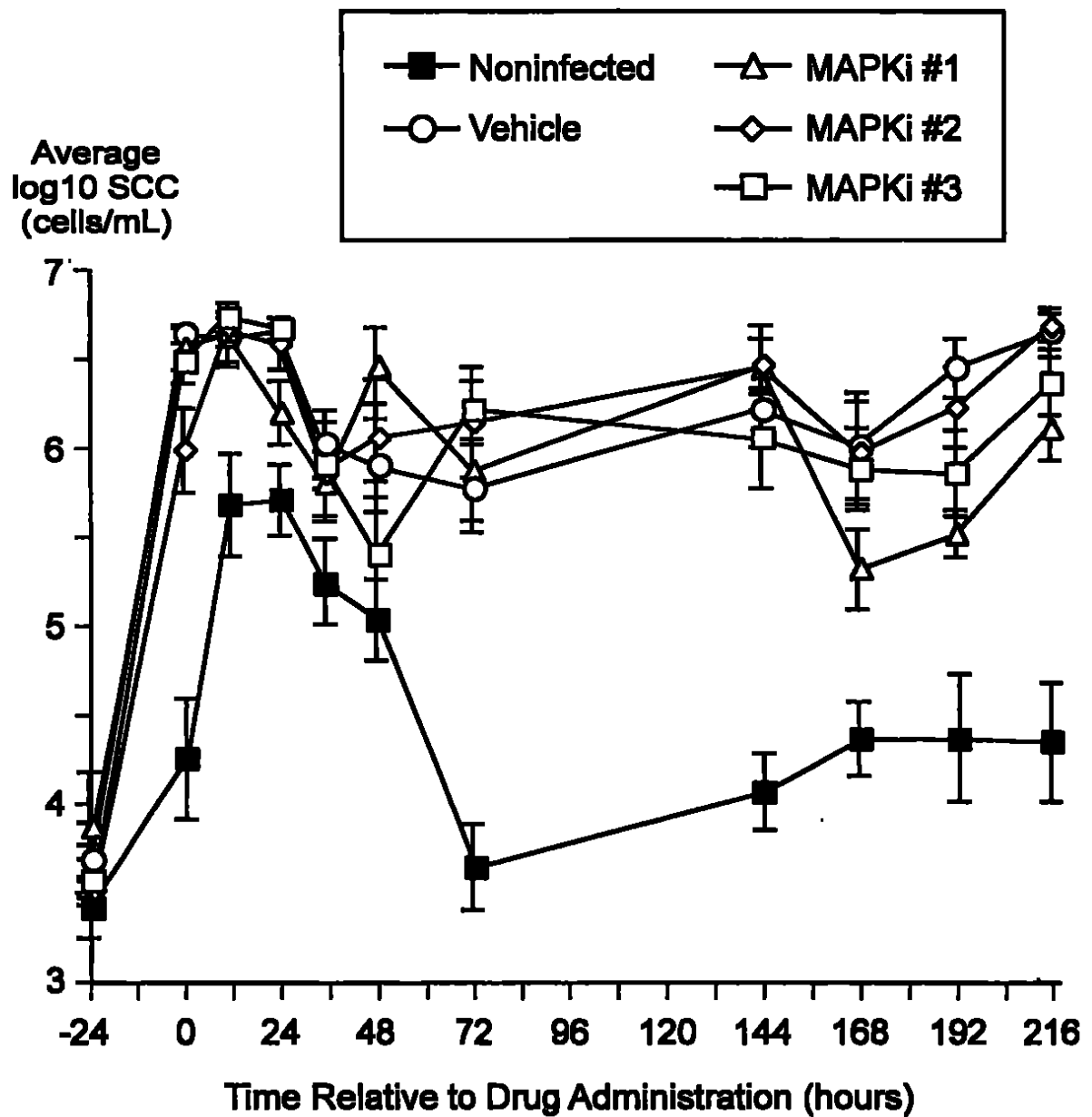
FIG. 5



58
3/3

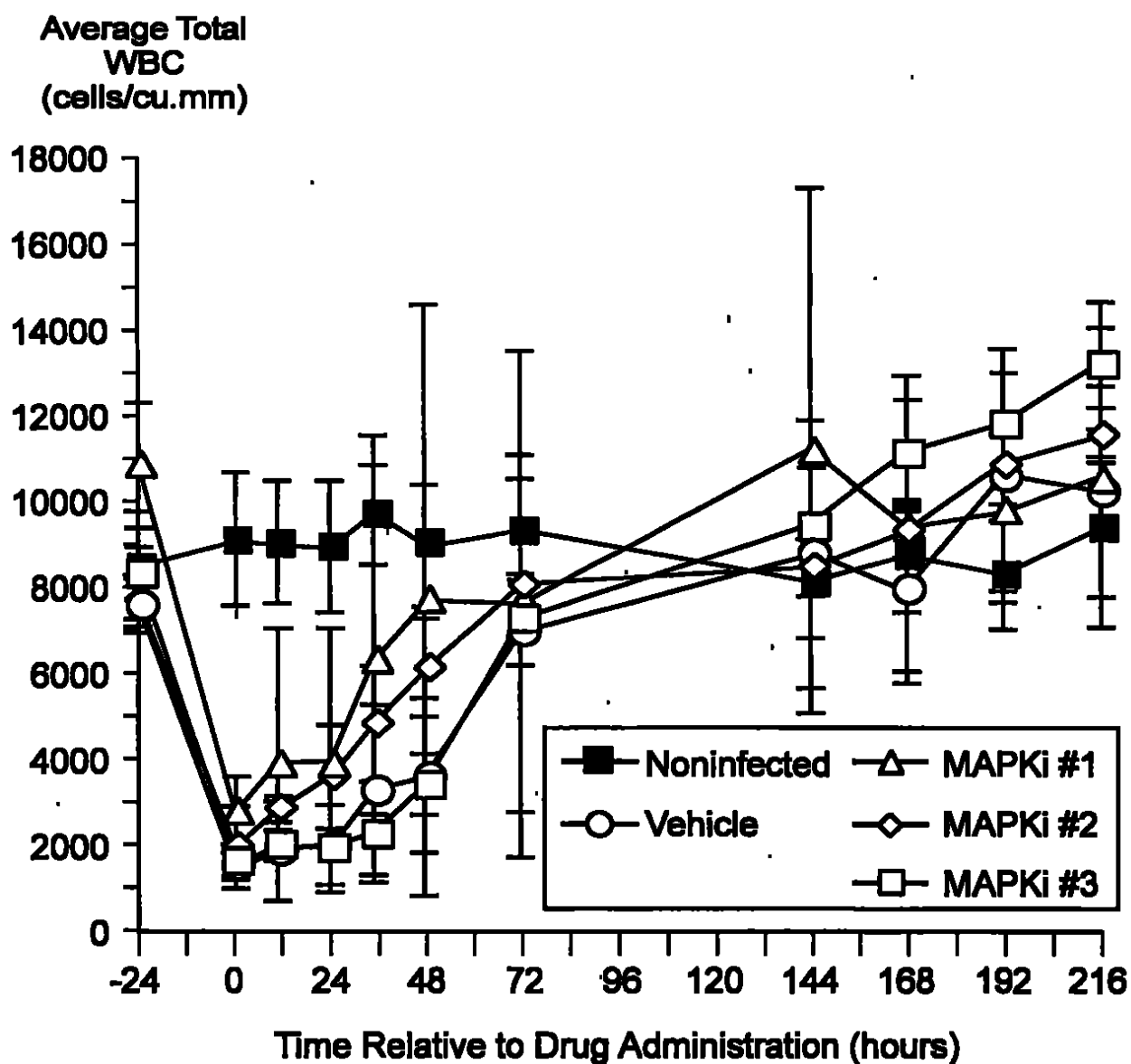
6/10

FIG. 6



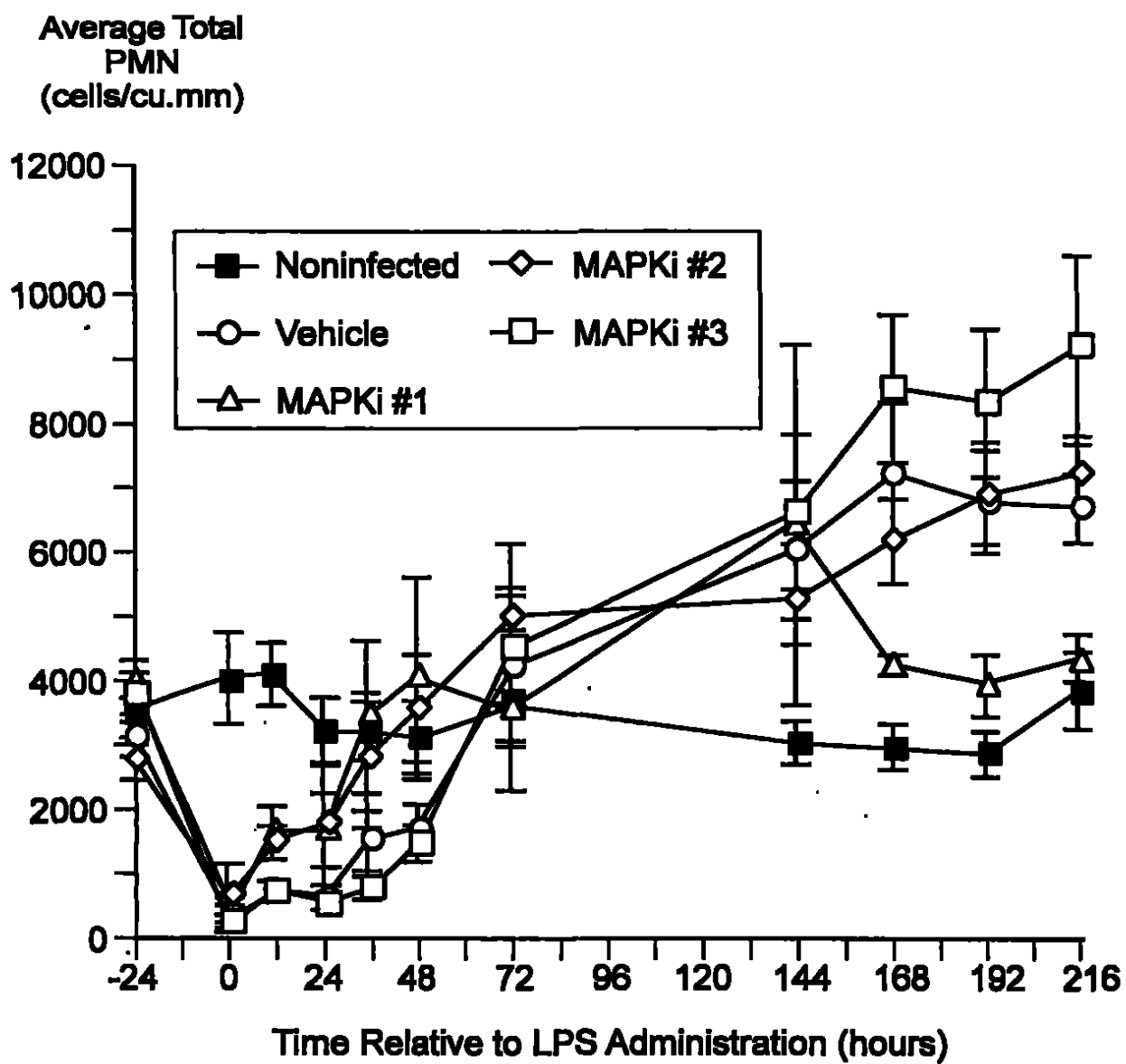
59
58

7/10

FIG. 7

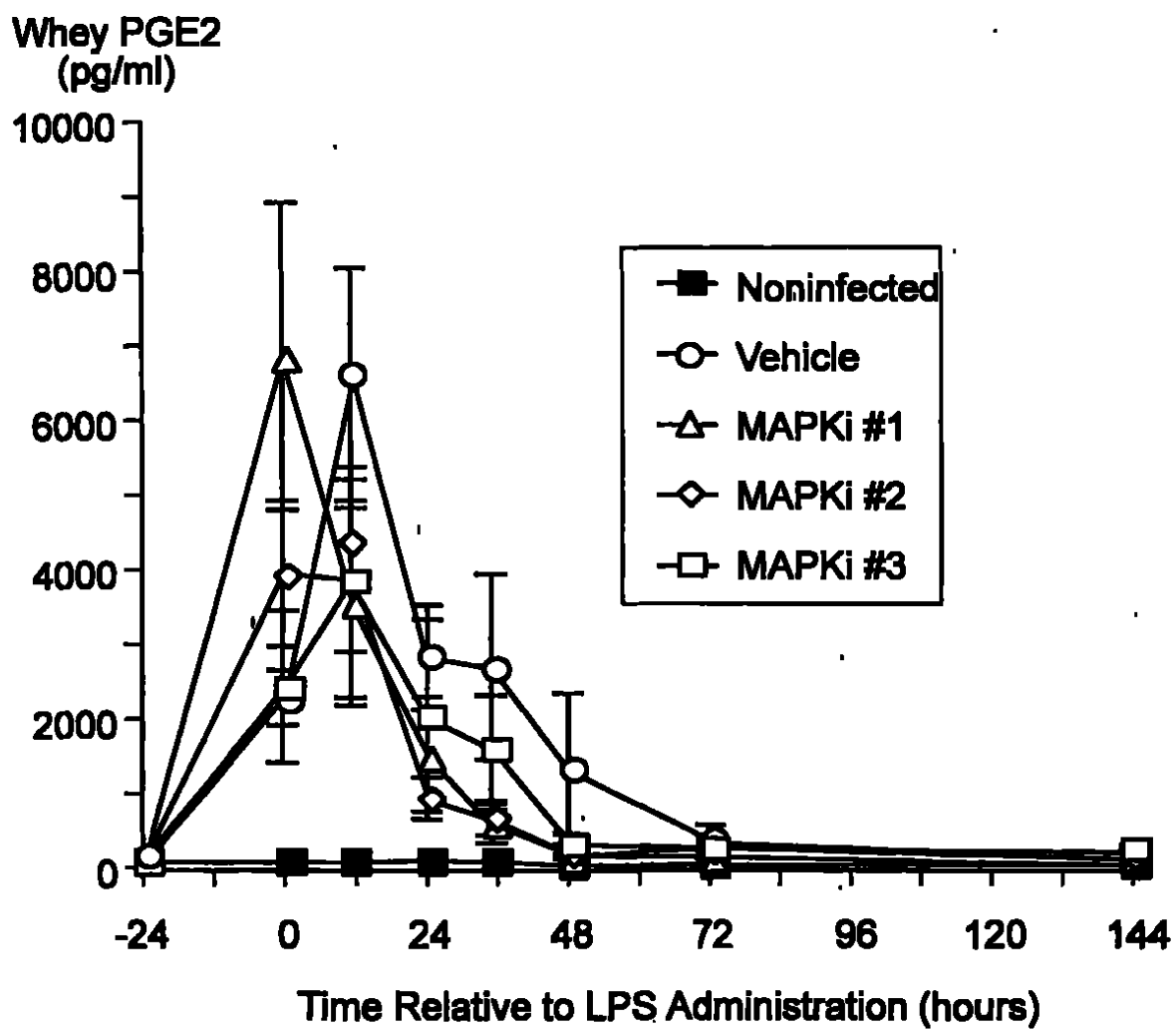
60
SA

8/10

FIG. 8

61
62

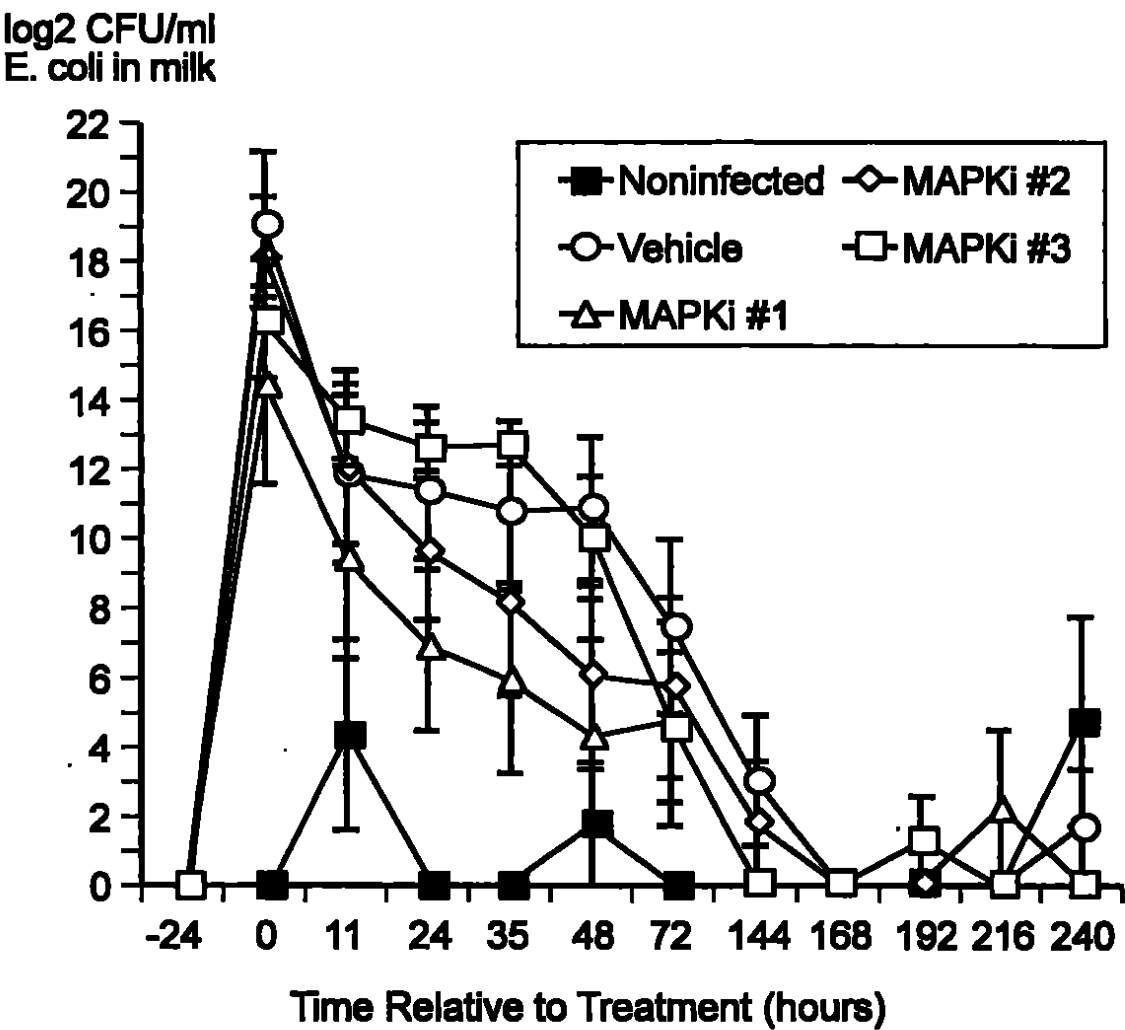
9/10

FIG. 9

62
6f

10/10

FIG. 10



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. nat. Application No.
PCT/IB2004/0040356327
61

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K31/497 A61K31/506 A61K31/4184 A61K31/4192 A61K31/4196
A61P43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96/21452 A (SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION; ADAMS, JERRY, LEROY; GALLAGHER, TIMOTH) 18 July 1996 (1996-07-18) cited in the application claim 44 and 46	1,3-7, 10,11, 14,15
Y	page 37, line 20 - page 38, line 33; page 41, line 17-27	2,8,9, 12,13
X	WO 02/072576 A (PFIZER PRODUCTS INC; DOMBROSKI, MARK, ANTHONY; LETAVIC, MICHAEL, ANTHO) 19 September 2002 (2002-09-19) cited in the application claim 1 and 14	1,3-7, 10,11, 14,15
Y	page 2, line 8 - page 3, line 5	2,8,9, 12,13
	-/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

3 March 2005

Date of mailing of the international search report

10/03/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.O. Box 5518 Patentplan 2
NL - 8280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Borst, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No.
 PCT/IB2004/00 4035

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2003/078432 A1 (LETAVIC MICHAEL A ET AL) 24 April 2003 (2003-04-24) cited in the application claims 1, 55-57; example 1	1,3-7, 10,11, 14,15
Y	'0005!-'0006!	2,8,9, 12,13
X	WO 02/072579 A (PFIZER PRODUCTS INC; DOMBROSKI, MARK, ANTHONY; DUPLANTIER, ALLEN, JACO) 19 September 2002 (2002-09-19) cited in the application claims 1 and 15; example 1	1,3-7, 10,11, 14,15
Y	page 2, line 7 - page 3, line 4;	2,8,9, 12,13
Y	BAEKER R ET AL: "Lipocalin-type prostaglandin D synthase in milk: a new biomarker for bovine mastitis" PROSTAGLANDINS, BUTTERWORTH, STONEHAM, MA, US, vol. 67, no. 1, January 2002 (2002-01), pages 75-88, XP004330580 ISSN: 0090-6980 page 82-86, paragraph entitled "4. Discussion"	2,8,9, 12,13
A	TRAKRANRUNGSIE N ET AL: "Expression of iNOS and COX-2 proteins during endotoxin-induced mastitis in guinea pigs" FASEB JOURNAL, vol. 11, no. 3, 1997, page A315, XP009044767 & ANNUAL MEETING OF THE PROFESSIONAL RESEARCH SCIENTISTS ON EXPERIMENTAL BIOLOGY 97; NEW ORLEANS, LOUISIANA, USA; APRIL 6-9, 1997 ISSN: 0892-6638 the whole document	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

national application No.
PCT/IB2004/004035

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 1-10: Rule 39.1(iv) PCT - Diagnostic method practised on the human or animal body
Claim 15: Rule 39.1(v) PCT - Presentation of information
The search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependant claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

In — — — — —
 International Application No
 PCT/IB2004/004035

60
 10

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9621452	A	18-07-1996	US 5593992 A	14-01-1997
			AT 254613 T	15-12-2003
			AU 705207 B2	20-05-1999
			AU 4657296 A	31-07-1996
			BG 63769 B1	29-12-2002
			BG 101727 A	31-03-1998
			BR 9606904 A	21-10-1997
			CA 2209938 A1	18-07-1996
			CN 1177299 A ,C	25-03-1998
			CZ 9702158 A3	15-04-1998
			DE 69630777 D1	24-12-2003
			DE 69630777 T2	29-07-2004
			DK 809499 T3	29-03-2004
			EP 1264827 A1	11-12-2002
			EP 0809499 A1	03-12-1997
			ES 2210348 T3	01-07-2004
			FI 972901 A	08-09-1997
			HK 1003623 A1	29-10-2004
			HU 9702409 A2	28-05-1999
			ID 23599 A	10-10-1996
			ID 23597 A	10-10-1996
			ID 23273 A	10-10-1996
			IL 116455 A	24-07-2001
			IL 134322 A	13-09-2001
			IL 134323 A	25-11-2001
			IL 134324 A	26-08-2001
			IN 184957 A1	07-10-2000
			IN 188338 A1	07-09-2002
			IN 188339 A1	07-09-2002
			JP 3330952 B2	07-10-2002
			JP 10512555 T	02-12-1998
			JP 2002105047 A	10-04-2002
			MA 23770 A1	01-10-1996
			NO 973167 A	08-09-1997
			NO 20016225 A	08-09-1997
			NO 20016226 A	08-09-1997
			NZ 301204 A	28-05-1999
			OA 10738 A	11-12-2002
			PL 322249 A1	19-01-1998
			PT 809499 T	30-04-2004
			RU 2196139 C2	10-01-2003
			SI 809499 T1	30-04-2004
			SK 90297 A3	14-01-1998
			TW 523511 B	11-03-2003
			WO 9621452 A1	18-07-1996
			US 6150557 A	21-11-2000
			US 5670527 A	23-09-1997
WO 02072576	A	19-09-2002	BR 0207957 A	25-02-2004
			CA 2440211 A1	19-09-2002
			EP 1370557 A1	17-12-2003
			WO 02072576 A1	19-09-2002
			JP 2004526727 T	02-09-2004
			MX PA03008142 A	12-12-2003
			US 2003092749 A1	15-05-2003
US 2003078432	A1	24-04-2003	BR 0201087 A	27-05-2003
			CA 2379903 A1	04-10-2002

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int. Patent Application No.
PCT/IB2004/004035

67
10

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2003078432 A1		EP 1247810 A1	09-10-2002
		JP 2002308872 A	23-10-2002
WO 02072579 A	19-09-2002	BG 108133 A	30-09-2004
		BR 0207990 A	27-04-2004
		CA 2440222 A1	19-09-2002
		CZ 20032185 A3	16-06-2004
		EE 200300437 A	16-02-2004
		EP 1370559 A1	17-12-2003
		HU 0303415 A2	28-01-2004
		WO 02072579 A1	19-09-2002
		JP 2004522799 T	29-07-2004
		MX PA03008144 A	12-12-2003
		NO 20033969 A	13-10-2003
		SK 10272003 A3	07-07-2004
		US 2003096838 A1	22-05-2003
		ZA 200304983 A	29-06-2004

68
81

METODOS PARA TRATAR LA INFLAMACION AGUDA EN ANIMALES CON
INHIBIDORES DE p38 MAP QUINASA

Campo de la Invención

La presente invención se refiere al uso de inhibidores de p38 MAP quinasa para el tratamiento de animales que tienen inflamación aguda y enfermedades así provocadas. En particular, la presente invención proporciona métodos para tratar animales que tienen enfermedades inflamatorias agudas, incluyendo mastitis, administrando al menos un inhibidor de p38 MAP quinasa. La presente invención también proporciona métodos para mejorar la producción de leche y reducir el descarte de leche en animales que padecen enfermedades inflamatorias agudas, administrando al menos un inhibidor de p38 MAP quinasa.

Antecedentes de la Invención

Las respuestas inflamatorias agudas en mamíferos a menudo dañan tejido, dando por resultado la pérdida de función del órgano o tejido e impactos negativos coconmitantes en la salud general, producción y realización.

Las quinasas de proteína activada por mitógeno (MAP) son enzimas clave implicadas en la transducción de señales y la amplificación de respuestas celulares a estímulos. El grupo p38 de MAP quinasas es un grupo de MAP quinasas asociado con el comienzo y progresión de la inflamación. El grupo p38 tiene al menos tres homólogos conocidos de la p38 MAP quinasa original (Ono et al. (2000) Cellular Signalling 12:1-13.). Los sucesos inflamatorios tempranos incluyen liberación de citoquina, activación y rápida acumulación de neutrófilos con posterior reclutamiento de células mononucleares. La p38 MAP quinasa juega un papel central en la regulación de un amplio intervalo de respuestas inflamatorias en muchas células diferentes. Recientes estudios han mostrado que un inhibidor de p38 MAP quinasa [(S)-5-[2-(1-feniletilamino)pirimidin-4-il)-1-metil-4-(3-trifluorometilfenil)-2-(4-piperidinil)imidazol] redujo el reclutamiento neutrófilo inicial al pulmón en un modelo de murina de inflamación pulmonar suave inducida por lipopolisacárido (LPS) (Nick et al. (2000) J. Immunol. 164:2151-2159.) La p38 MAP quinasa se activa mediante fosforilación dual después de la estimulación por un amplio rango de estímulos extracelulares que incluyen estrés físico-químico, tratamiento con lipopolisacáridos (LPS) o *E. coli*, transducción de señal a partir de receptores Toll-like, además, receptores TNF y IL-1. Los productos de la fosforilación de p38 median la producción de citoquinas inflamatorias que incluyen TNF, IL-1, IL-6, iNOS y ciclooxigenasa-2.

7RA 3363

69
88

La mastitis es un mal de las vacas de lactancia diaria y es uno de las enfermedades más costosas para la agricultura animal, con pérdidas económicas que exceden los 2 billones de dólares anualmente solo en los Estados Unidos. (Bloaser, T. (1979) J. Dairy Sci. 62:119-127). La mastitis está provocada por infección intramamaria con muchos patógenos bacterianos, que incluyen estafilococos, estreptococos y coliformes. Las pérdidas económicas atribuibles a la mastitis incluyen reducción de producción de leche y calidad, aumento de los costes veterinarios y muerte de vacas. La reducción de producción de leche se atribuye ampliamente a cambios patofisiológicos asociados con la respuesta inflamatoria a la infección bacteriana. Shuster, D. y Kehrl, M.E. (1995) Am. J. Vet. Res. 56(3):212-320, incorporado en este documento mediante referencia; Shuster et al. (1991) J. Dairy Sci. 74:1527-1538; Shuster et al. (1991) J. Dairy Sci. 74:3407-3411; Shuster et al. (1991) J. Dairy Sci. 74:3763-3774. La mastitis provocada por la bacteria caracterizada anteriormente puede manifestarse como una enfermedad o bien clínica o subclínica. Cullor et al. (1990) Disorders of the mammary gland in large animal medicine., B.P. Smith, The C.V. Mosby Company, St. Louis. Mo. 63146, Págs. 1047-1067. La enfermedad clínica varía de los cuartos afectados ligeramente con cambios en la leche, a través de cuartos infectados de forma grave con pérdida eventual de ese cuarto, a vacas enfermas sistémicamente que a menudo mueren. La mastitis subclínica es prevalente en muchos rebaños. Los cuartos afectados se infectan con la bacteria patógena descrita anteriormente, aunque las señales clínicas están ausentes. El nivel de células somáticas aumenta en la leche, cuyo cambio puede detectarse por medios convencionales. La mastitis subclínica está acompañada por disminución de producción de leche y calidad de la leche.

Aquí se describen inhibidores de la actividad quinasa de p38 útil en un método para tratar los procesos inflamatorios agudos, caracterizados por el aumento de la actividad p38 MAP quinasa que da por resultado animales que tienen aumento de producción de leche con pérdida o descarte reducido.

Resumen de la Invención

La presente invención proporciona un método para tratar una enfermedad inflamatoria o mejorar la recuperación de una enfermedad inflamatoria aguda en un animal que lo necesita, que comprende administrar a dicho animal una cantidad eficaz de al menos un inhibidor de p38 MAP quinasa.

Otro aspecto de la presente invención es un método para la mejora de la producción de leche o reducción de la pérdida de leche en un animal que sufre una

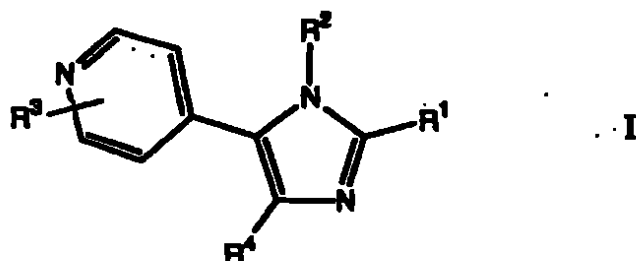
enfermedad inflamatoria aguda que comprende la administración a dicho mamífero de una cantidad eficaz de al menos un inhibidor de p38 MAP quinasa.

Un tercer aspecto de la presente invención se dirige a un método para inhibir la síntesis y actividad de la enzima COX-2, TNF o IL-1 en un animal que comprende la administración de una cantidad eficaz de al menos un inhibidor de p38 MAP quinasa.

En otro aspecto, la presente invención se dirige a un método para inhibir la muerte de la célula apoptótica en un animal que comprende la administración de una cantidad eficaz de al menos un inhibidor de p38 MAP quinasa.

En una realización preferida, el inhibidor de p38 MAP quinasa se selecciona de

(i) el compuesto de Fórmula I,



en el que R¹ es H;

R² es un cicloalquilo, arilo, heteroarilo heterocíclico sustituido y no sustituido: en el que el heterociclo es un anillo de 5-, 6- o 7- miembros, saturado, parcialmente saturado o insaturado, que contiene de uno a tres heteroátomos seleccionados independientemente del grupo que consiste en nitrógeno, oxígeno y azufre; e incluye cualquier grupo biciclo en el que cualquiera de los anillos heterocíclicos anteriores está condensado con un anillo de benceno u otro heterociclo; y el nitrógeno puede estar en el estado oxidado dando la forma N-óxido; y sustituido opcionalmente con R_y;

R_y es para cada suceso de manera independiente -halo, -OH, -alquilo (C₁-C₆), -alquenilo (C₂-C₆), -alquinilo (C₂-C₆), -Oalquilo (C₁-C₆), -Oalquenilo (C₂-C₆), -Oalquinilo (C₂-C₆), -alquilo (C₅-C₆)-NR¹³R¹⁴, -C(O)-NR¹³R¹⁴, -SO₂R¹³, -SOR¹³, -SR¹³, -NR¹³-SO₂R¹⁴, -NR¹³-C(O)-R¹⁴, -NR¹³-OR¹⁴, -SO₂-NR¹³R¹⁴, -CN, -CF₃, -C(O)alquilo (C₁-C₆), =O, -SO₂-fenilo, o C(O)-Ar o het-Ar;

R³ es independientemente -H, -halo, -OH, -alquilo (C₁-C₁₀), OCH₃, NH₂, NHR, en el que R es arilo, heteroarilo o alquilo; y

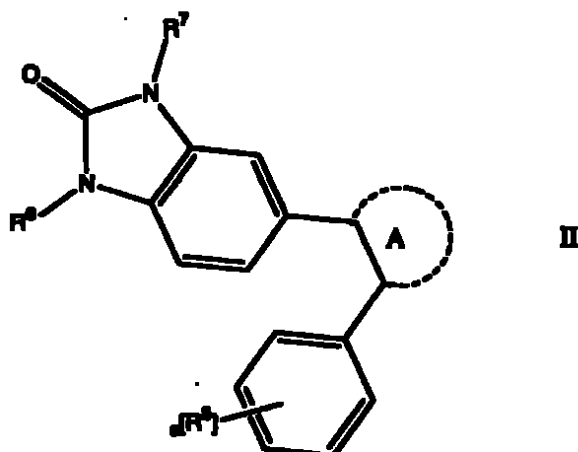
R⁴ es un arilo y heteroarilo sustituido y no sustituido;

R¹³ y R¹⁴ son cada uno de forma independiente para cada suceso -H; -alquilo (C₁-C₆), en el que 1 o 2 átomos de carbono, diferentes a los átomos de carbono de conexión, pueden sustituirse opcionalmente con 1 o 2 heteroátomos seleccionados

independientemente de S, O y N, y en el que cada átomo de carbono está sustituido opcionalmente con 1, 2 o 3 halo;-alquenilo (C_2-C_6), sustituido opcionalmente con 1, 2 o 3 halo; o -alquinilo (C_2-C_6) en el que un átomo de carbono, distinto del átomo de carbono de conexión y los átomos de etinilo, pueden sustituirse opcionalmente con un átomo de oxígeno y en el que cada átomo de carbono está sustituido opcionalmente con 1, 2 o 3 halo;

o R^{13} y R^{14} se toman juntos con N al que están unidos para formar un heterociclo;

(ii) el compuesto de Fórmula II,



10

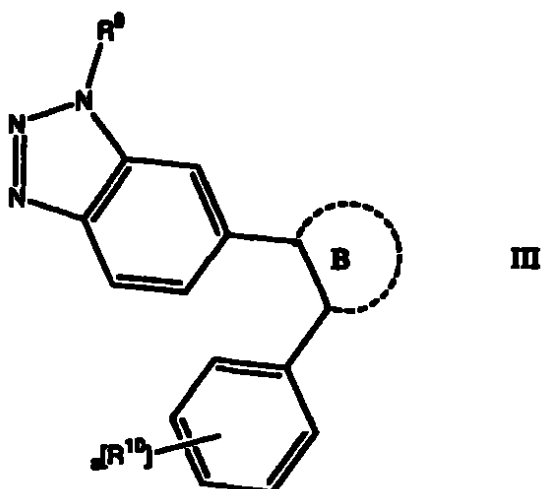
en el que "A" es un pirrolilo, imidazolilo, pirazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo o isotiazolilo, sustituido o no sustituido;

R^6 y R^7 son independientemente H o (ciclo)alquilo, fenilo, heteroarilo o heterociclo sustituido o no sustituido;

15 R^8 es independientemente halo, (perhalo)alquilo, (perhalo)cicloalquilo, alquenilo, alquinilo, heterocidil(oxi), fenilo, OH, (perhalo)alcoxi, fenoxi, alquiltio, alquil(amino)sulfonilo, alquilsulfamoilo, carbamoilo, acilo o carboxi; y

s es 0-5;

(iii) el compuesto de Fórmula III



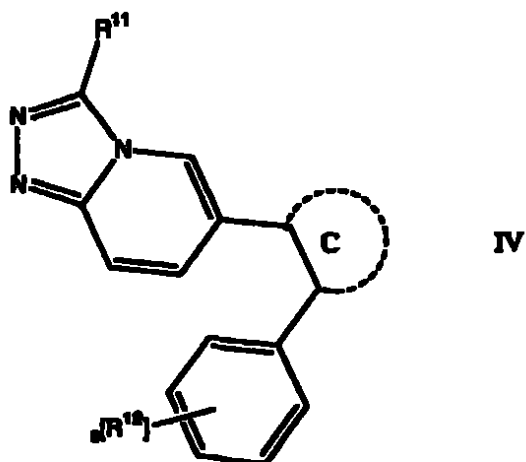
en el que "B" es un grupo hetero sustituido o no sustituido, tal como pirrolilo, imidazolilo, pirazolilo, oxazolilo;

R^9 es H, alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo o heteroarilo;

5 R^{10} es H, alquilo, fenilo, F, Cl o CN; y

s es 0-5; o

(iv) el compuesto de Fórmula IV,



10 en el que "C" es un pirrolilo, imidazolilo, pirazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo o isotiazolilo, sustituido o no sustituido;

R^{11} es H, alquenilo, alquinilo, o (ciclo)alquilo, fenilo, heteroarilo sustituido o no sustituido, o heterociclilo o amino;

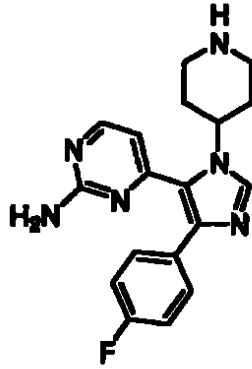
15 R^{12} es halo, (ciclo)alquil(oxi), (perhalo)alquilo, alquenilo, alquinilo, fenilo, heteroaril(oxi), heterocicilil(oxi), OH, (perhalo)alcoxi, fenoxi, alquitio, alquilsulfonilo, alquilaminosulfonilo, NO_2 , amino sustituido o no sustituido o carbamoilo; y

s es 0-5.

En una realización preferida, el inhibidor de p38 MAP quinasa es

73
72

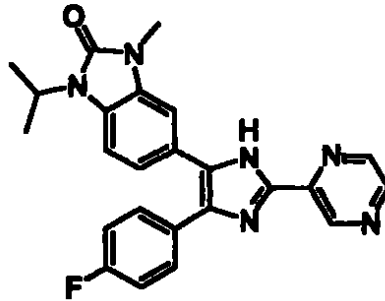
(i) un compuesto MAPKi #1



MAPKi #1

;

(ii) un compuesto MAPKi #2

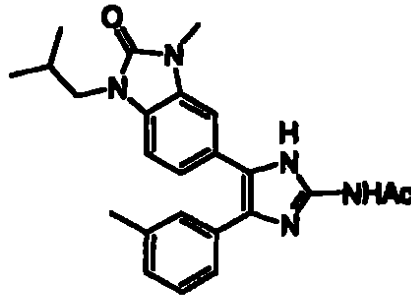


MAPKi #2

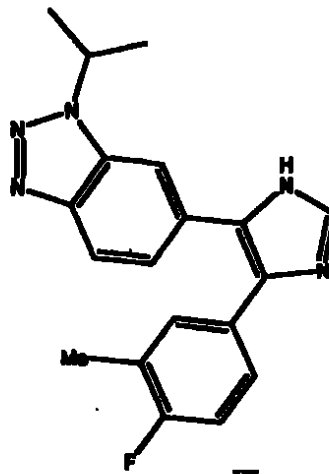
; and

5

(iii) un compuesto MAPKi #3

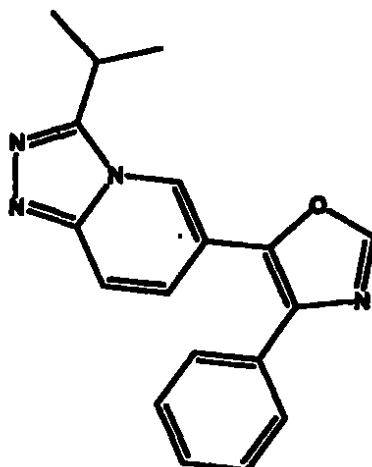
MAPKi
#3

(iv) un compuesto de Fórmula IIIa



IIIa ; or

(v) un compuesto de Fórmula IVa

74
23

IVa

En una realización preferida, la enfermedad inflamatoria se selecciona del grupo que consiste en mastitis, enfermedad respiratoria, membranas de placenta sustituidas, metritis, piometra, enteritis, hepatitis, nefritis, septicemia, endotoxemia, laminitis, congelación y problemas de intestinos obstructivos.

Los problemas de intestino obstructivo preferidos se seleccionan del grupo que consiste en cólico, abomasums desplazados y torsión cecal.

En una realización preferida, la enfermedad inflamatoria es mastitis y el animal es una vaca.

En una realización adicional, se prefiere un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La terminología "A," "B," "C," "het" o "heterociclo" se refiere a un grupo hetero sustituido opcionalmente que contiene uno o dos heteroátomos seleccionados de nitrógeno, azufre y oxígeno, tal como pirrolilo, imidazolilo, pirazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo o isotiazolilo.

La terminología "alquilo," además de los restos alquilo de otros grupos a los que se hace referencia en la presente memoria (por ejemplo, alcoxi), pueden ser lineales o ramificados (tales como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, butilo secundario, butilo terciario) y también pueden ser cíclicos (por ejemplo, ciclopropilo o ciclobutilo).

La terminología "halógeno" incluye flúor, cloro, bromo o yodo o fluoruro, cloruro, bromuro o yoduro.

La terminología "arilo" se refiere a radicales aromáticos tales como fenilo, naftilo, tetrahidronaftilo, indanilo y similares, sustituidos opcionalmente por 1-3 sustituyentes adecuados tales como flúor, cloro, trifluorometilo, alcoxi (C₁-C₆), ariloxi (C₆-C₁₀), trifluorometoxi, difluorometoxi o alquilo (C₁-C₆).

La terminología "heteroarilo" se refiere a un grupo heterocíclico aromático,

normalmente con un heteroátomo seleccionado de O, S y N en el anillo.

La terminología "heterocíclico" como se usa en esta memoria se refiere a un grupo cíclico que contiene 1-9 átomos de carbono y 1-4 heteroátomos seleccionados de N, O, S y NR. Ejemplos de dichos anillos incluyen, *inter alia*, acetidinilo, terahidrofuranilo, imidazolidinilo, pirrolidinilo, piperidinilo.

Ejemplos adicionales de las terminologías anteriores se describen más completamente en las referencias citadas en este documento, que además describen los compuestos utilizados en la invención reivindicada.

La terminología "tratamiento o tratar" respecto a un proceso inflamatorio agudo como se usa en este documento, significa inhibir, reducir, evitar o mejorar los síntomas asociados con las respuestas inflamatorias mediadas por p38 MAP quinasa, que incluye la inhibición del Factor de Necrosis Tumoral (TNF), Interleuquina-1 (IL-1) y ciclooxigenasa-2 (COX-2), y aliviar los síntomas de los procesos o enfermedades inflamatorias provocados por la amplificación de citoquinas inflamatorias que incluyen TNF, IL-1 y COX-2. El tratamiento se considera terapéutico si hay una recuperación mejorada de los síntomas de la inflamación aguda.

Una "recuperación mejorada" como se contempla por la presente invención, se determina convencionalmente a partir de una comparación del proceso de los animales infectados tratados con animales infectados no medicados. Una recuperación mejorada se valora por cualquiera de lo siguiente: una vuelta aproximada al nivel de cumplimiento fisiológico antecedente del tejido inflamado, tal como función respiratoria, velocidad de crecimiento, cumplimiento reproductivo, locomoción, síntesis y secreción de leche. Los ejemplos incluirían una reducción en el descarte de leche, aumento en el rendimiento de leche, disminución de la inflamación, disminución de los niveles de *E. coli* en la leche o niveles disminuidos en los niveles de PGE₂ en suero, por ejemplo. El método de la presente invención es, por ejemplo, eficaz en la mejora de la recuperación a partir de respuestas inflamatorias agudas en animales.

La terminología "proceso inflamatorio agudo" como se usa en este documento, significa un mal o enfermedad de un animal que incluye aunque no está limitada a mastitis, enfermedades respiratorias, membranas de placenta retenidas, metritis, piometra, enteritis, hepatitis, nefritis, septicemia, laminitis, congelación y problemas intestinales obstructivos que incluyen, cólico, abomasums desplazados, torsión cecal y endotoxemia.

La terminología "animal" como se usa en este documento se refiere a todos los mamíferos, incluyendo aunque no limitado a équidos, animales de compañía y ganado.

5 La terminología "ganado" como se usa en este documento, se refiere a animales bovinos que incluyen aunque no están limitados a bueyes, toros, vacas y terneros. Preferiblemente, el método de la presente invención se aplica a un animal que es un mamífero lactante no humano; lo más preferiblemente, una vaca.

10 La terminología "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de al menos un inhibidor de p38 MAP quinasa suficiente para aumentar la producción de leche, disminuir el descarte de leche, disminuir el nivel de *E. coli*, o disminuir los niveles de PGE₂ en suero en animales a los que se administra el inhibidor de p38 MAP quinasa. Una cantidad eficaz de inhibidor de p38 MAP quinasa significa, por ejemplo, que el inhibidor mejore la recuperación de un animal que padece un proceso o enfermedad inflamatoria aguda.

15 La terminología "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un vehículo que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica del ingrediente activo, es inerte químicamente y no es tóxico para el sujeto al cual se le administra.

Breve Descripción de los Dibujos.

20 La Figura 1 representa la temperatura corporal promedio de vacas a las que se ha administrado solución salina o 30 cfu de *E. coli* en un solo cuarto seguido 13 horas más tarde de la administración de MAPKi #1, MAPKi #2, MAPKi #3 o vehículo.

La Figura 2 representa la producción diaria promedio de leche de vacas a las que se ha administrado solución salina o 30 cfu de *E. coli* en un solo cuarto seguido 13 horas más tarde de la administración de MAPKi #1, MAPKi #2, MAPKi #3 o vehículo.

25 La Figura 3 representa los valores clínicos promedio de la leche de vacas a las que se ha administrado solución salina o 30 cfu de *E. coli* en un solo cuarto seguido 13 horas más tarde de la administración de MAPKi #1, MAPKi #2 MAPKi #3 o vehículo.

30 La Figura 4 representa los valores clínicos promedio de la glándula de vacas a las que se ha administrado solución salina o 30 cfu de *E. coli* en un solo cuarto seguido 13 horas más tarde de la administración de MAPKi #1, MAPKi #2, MAPKi #3 o vehículo.

35 La Figura 5 representa los valores clínicos acumulativos promedio de vacas a las que se ha administrado solución salina o 30 cfu de *E. coli* en un solo cuarto seguido 13 horas más tarde de la administración de MAPKi #1, MAPKi #2, MAPKi #3 o vehículo.

La Figura 6 representa el log10 promedio de los valores de células somáticas de la leche (SCC) de vacas a las que se ha administrado solución salina o 30 cfu de *E. coli* en un solo cuarto seguido 13 horas más tarde de la administración de MAPKi #1, MAPKi #2, MAPKi #3 o vehículo.

5 La Figura 7 representa el WBC total promedio (sangre periférica) de vacas a las que se ha administrado solución salina o 30 cfu de *E. coli* en un solo cuarto seguido 13 horas más tarde de la administración de MAPKi #1, MAPKi #2, MAPKi #3 o vehículo.

10 La Figura 8 representa el PMN total promedio (sangre periférica) de vacas a las que se ha administrado solución salina o 30 cfu de *E. coli* en un solo cuarto seguido 13 horas más tarde de la administración de MAPKi #1, MAPKi #2, MAPKi #3 o vehículo.

15 La Figura 9 representa la concentración promedio de PGE₂ en suero de vacas a las que se ha administrado solución salina o 30 cfu de *E. coli* en un solo cuarto seguido 13 horas más tarde de la administración de MAPKi #1, MAPKi #2, MAPKi #3 o vehículo.

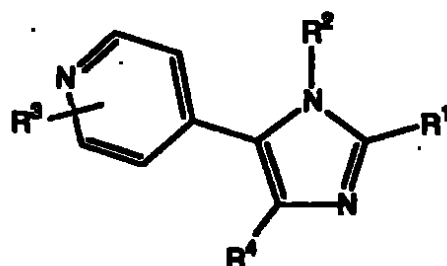
20 La Figura 10 representa los números de bacteria (*E. Coli*) (en ml) de vacas a las que se ha administrado solución salina o 30 cfu de *E. coli* en un solo cuarto seguido 13 horas más tarde de la administración de MAPKi #1, MAPKi #2, MAPKi #3 o vehículo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

25 La presente invención proporciona métodos para tratar animales que tienen enfermedades inflamatorias agudas, que incluyen mastitis, administrando al menos un inhibidor de p38 MAP quinasa. La presente invención también proporciona métodos para mejorar la producción de leche y reducir el descarte de leche en animales que padecen enfermedades inflamatorias agudas, administrando al menos un inhibidor de p38 MAP quinasa.

30 Los compuestos inhibidores de p38 MAP quinasa utilizados para la presente invención pueden sintetizarse mediante rutas sintéticas que incluyen procedimientos análogos a aquellos bien conocidos en las técnicas químicas, particularmente a la luz de la descripción contenida en este documento o a través de las referencias citadas.

35 El compuesto de Fórmula I también es un inhibidor de p38 MAP quinasa, y es útil en el tratamiento de inflamación, osteoartritis, artritis reumatoide, cáncer, reperusión o isquemia en el infarto o ataque al corazón, enfermedades autoinmunes y otros trastornos.



I

Los compuestos de Fórmula I, un promedicamento de dicho compuesto o isómero, o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho compuesto, isómero o promedicamento; en la que R^1 es -H;

- 5 R^2 es un cicloalquilo, arilo, heteroarilo heterocíclico sustituido y no sustituido: en el que el heterociclo es un anillo de 5-, 6- o 7- miembros saturado, parcialmente saturado o insaturado, que contiene de uno a tres heteroátomos seleccionados independientemente del grupo que consiste en nitrógeno, oxígeno y azufre; e incluye cualquier grupo bicíclico en el que cualquiera de los anillos heterocíclicos anteriores está condensado con un anillo de benceno u otro heterociclo; y el nitrógeno puede estar en el estado oxidado dando la forma N-óxido; y sustituido opcionalmente con R_y ;

- 10 R_y es para cada suceso de manera independiente -halo, -OH, -alquilo (C_1-C_6), -alquenilo (C_2-C_6), -alquinilo (C_2-C_6), -Oalquilo (C_1-C_6), -Oalquenilo (C_2-C_6), -Oalquinilo (C_2-C_6), -alquilo (C_0-C_6)- $NR^{13}R^{14}$, -C(O)- $NR^{13}R^{14}$, - SO_2R^{13} , - SOR^{13} , - SR^{13} , - NR^{13} - SO_2R^{14} , - R^{13} -C(O)- R^{14} , - NR^{13} -OR¹⁴, SO_2 - $NR^{13}R^{14}$, -CN, -CF₃, -C(O)alquilo (C_1-C_6), =O, - SO_2 -fenilo o C(O)-Ar o het-Ar;

R^3 es independientemente -H, -halo, -OH, -alquilo (C_1-C_{10}), OCH₃, NH₂, NHR, en el que R es arilo, heteroarilo o alquilo; y

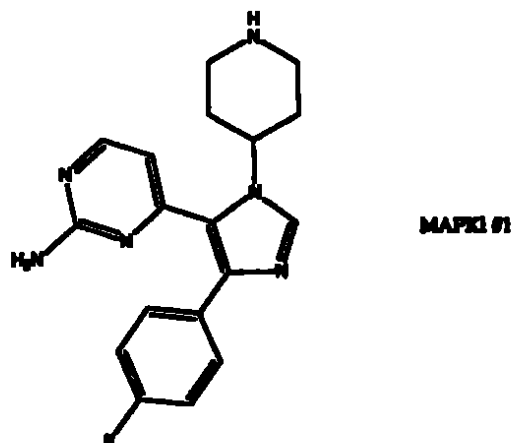
R^4 es arilo y heteroarilo sustituido y no sustituido;

- 20 R^{13} y R^{14} son cada uno de forma independiente para cada suceso -H; -alquilo (C_1-C_6), en el que 1 o 2 átomos de carbono, diferentes a los átomos de carbono de conexión, pueden sustituirse opcionalmente con 1 o 2 heteroátomos seleccionados independientemente de S, O y N, y en el que cada átomo de carbono está sustituido opcionalmente con 1, 2 o 3 halo; -alquenilo (C_2-C_6), sustituido opcionalmente con 1, 2 o 3 halo; o -alquinilo (C_2-C_6) en el que un átomo de carbono, distinto del átomo de carbono de conexión y de los átomos de etinilo, pueden sustituirse opcionalmente con un átomo de oxígeno y en el que cada átomo de carbono está sustituido opcionalmente con 1, 2 o 3 halo;

- 25 o R^{13} y R^{14} se toman juntos con N al que están unidos para formar un heterociclo;

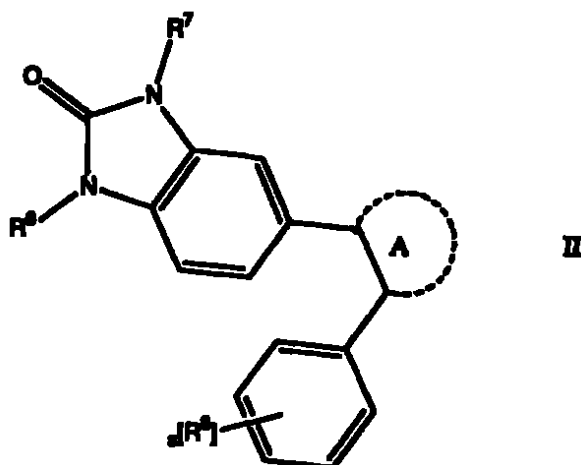
30

En particular, el compuesto, MAPKi #1, es una especie del género descrito en el compuesto de la Fórmula I. MAPKi #1 es el tema de los documentos W095/02591A1 y W096/21452A1 (incorporados en este documento por referencia en su totalidad) y puede prepararse como se describe más completamente en este documento.



5

El compuesto de Fórmula II, 5-(fenilheteroaril)-1,3-dihidro-2-benzimidazolonas, también es un inhibidor de p38 MAP quinasa, y es útil en el tratamiento de inflamación, osteoartritis, artritis reumatoide, cáncer, reperfusión o isquemia en el infarto o ataque al corazón, enfermedades autoinmunes y otros trastornos.



10

El compuesto de Fórmula II, en el que "A" es pirrolilo, imidazolilo, pirazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo o isotiazolilo sustituido o no sustituido; R⁶ y R⁷ son independientemente H o (ciclo)alquilo, fenilo, heteroarilo o heterociclilo sustituido o no sustituido; R⁸ es independientemente halo, (perhalo)alquilo, (perhalo)cicloalquilo, alquenilo, alquinilo, heterociclil(oxi), fenilo, OH, (perhalo)alcoxi, fenoxi, alquiltio, alquil(amino)sulfonilo, alquilsulfamoilo, carbamoilo, acilo o carboxi; y s es 0-5, es el tema del documento WO 2002/072576 (incorporado en este documento por referencia

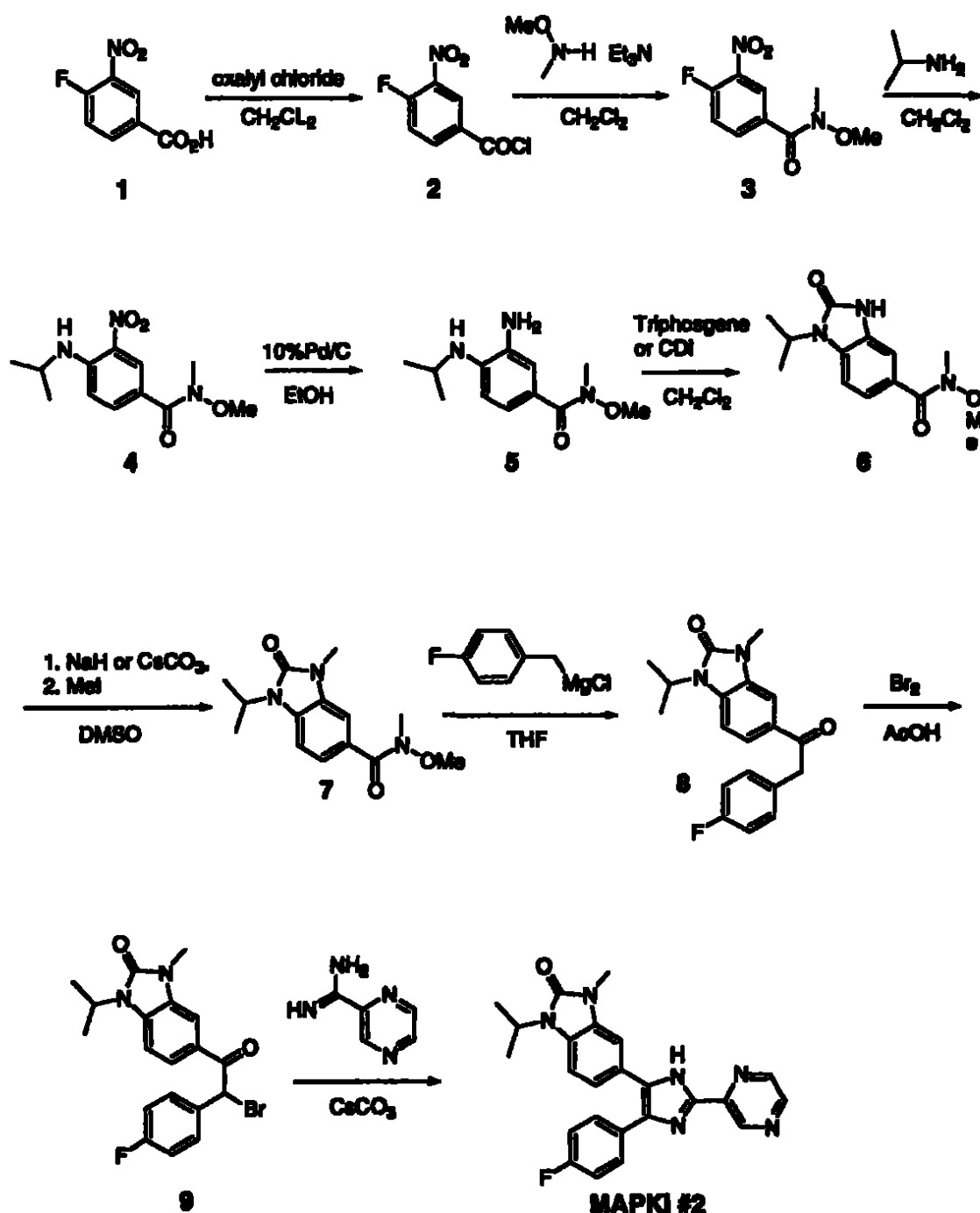
15



a su totalidad) y la preparación del compuesto de Fórmula II se describe en este documento.

5 Los compuestos de Fórmula II, en los que "A," R^6 , R^7 , R^8 y se definen anteriormente, pueden prepararse, como se describe más completamente en el documento WO 2002/072576 (Nota: las variables "A, R^6 , R^7 , R^8 " pueden identificarse con diferentes designaciones en el documento WO 2002/072576). En particular, el compuesto, MAPKi #2, puede prepararse como se propone posteriormente en el Esquema I.

8/60

ESQUEMA I

El compuesto, MAPKi #2, se preparó como se propone anteriormente en el Esquema I. 4-Fluoro-N-metoxi-N-metil-3-nitro-benzamida (3) se preparó tomando 5 ácido 4-Fluoro-3-nitrobenzónico (1) (100 g, 0,54 moles) en cloruro de metileno seco (1L) y se añadieron 1,5 ml de DMF. A esta disolución se le añadió cloruro de oxalilo (61 ml, 0,702 moles). Después de 1,5 horas, se eliminó el disolvente *al vacío* y se puso el cloruro de ácido en bruto (2) (aceite amarillo) en cloruro de metileno (50 mL) y se añadió lentamente a una mezcla en agitación de trietilamina (150,5 mL, 1,08 moles) e

82/16

hidrocloruro de amina Wainreb (68,5 g, 0,702 moles) en cloruro de metileno (950 mmol) a 0°C. La reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante toda la noche. La mezcla de reacción se lavó con fosfato de dihidrógeno sódico saturado seguido por agua. La fase orgánica se secó en sulfato sódico anhidro y se concentró *al vacío* a un aceite naranja-amarillo. El aceite en bruto se trituró con pentano para dar 110,28 g (90%) de un polvo amarillo a color crudo (3).

A una disolución de 4-fluoro-N-metoxi-N-metil-3-nitro-benzamida (3) (20 gm, 87,6 mmoles) en cloruro de metileno (250 mL) se añadió isopropilamina (11,4 g, 192,8 mmoles) en varias partes. La reacción se agitó durante una noche a temperatura ambiente; determinándose que la reacción estaba completa por ¹HNMR a la mañana siguiente. La mezcla de reacción se lavó con agua (2 X 100 mL) y la fase orgánica se secó en sulfato sódico anhidro y se concentró *al vacío* para dar 24,95 g (97%) de un sólido amarillo (4).

A una disolución/suspensión de 4-isopropilamino-N-metoxi-N-metil-3-nitro-benzamida (4) (24,95 g, 93 mmoles) en etanol (500 mL) se añadió Pd en carbono al 10% (aproximadamente 1 g). La suspensión negra resultante se hidrogenó en un agitador Parr durante 5 horas, después de lo que el TLC (acetato de etilo) mostró el consumo completo del material de partida. (Además, el color de la disolución de etanol pasó de amarillo brillante a claro, indicando el consumo completo del material de partida.) El catalizador se eliminó por filtración a través de celite, y el disolvente se eliminó *al vacío* para dar 21,95 gm (>98%) de la anilina sustituida (5) como un aceite viscoso púrpura oscuro que se usó sin purificación adicional.

A una disolución de 3-amino-4-isopropilamino-N-metoxi-N-metil-benzamida (5) (21,95 gm, 92 mmoles) en cloruro de metileno (300 mL) se añadió trifosgeno (27 g, 92 mmoles) en pequeñas partes (**PRECAUCION: EVOLUCIÓN GASEOSA**). Después de que la adición del trifosgeno se completó, la reacción se agitó toda la noche a temperatura ambiente, después de cuyo tiempo el ¹HNMR y TLC mostraron una reacción completa. La fase orgánica se lavó tres veces con disolución saturada de bicarbonato sódico, la fase orgánica se secó en sulfato sódico anhidro y se concentró *al vacío* para dar 24,2 g (cuantitativo) de una espuma roja (6) que se usó sin purificación adicional.

Puede lograrse una ciclación alterna para evitar el uso de trifosgeno usando carbonil-diimidazol. A una disolución agitada de 3-amino-4-terc-butilamino-N-metoxi-N-metil-benzamida (22,5 g, 89,5 mmoles) en cloruro de metileno seco (250 mL) se añadió carbonil-diimidazol (16,0 g, 98,5 mmoles) en pequeñas partes (evolución al

83/26

calor). Después de agitar durante 4 horas, el $^1\text{HNMR}$ de una alícuota de la reacción mostró que no había material de partida. Se añadió bicarbonato sódico saturado a la mezcla de reacción y la fase orgánica se separó, lavó con disolución de bicarbonato saturado y salmuera, después se secó sobre sulfato sódico anhidro. La concentración *al vacío* dio 25,68 g de una espuma oscura (6, aunque con amina alterna). que se usó sin purificación adicional.

A una suspensión de hidruro sódico (720 mg de una dispersión al 60% en aceite mineral, 18 mmoles) en DMSO seco (25 mL), se añadió metoxi-metilamida (6) de ácido 1-isopropil-2-oxo-2,3-dihidro-1H benzoimidazol-5-carboxílico (4,2 g, 16 mmoles) en pequeñas partes (PRECAUCIÓN:EVOLUCIÓN GASEOSA). La mezcla resultante se agitó durante 30 minutos durante cuyo tiempo la disolución se volvió marrón. Después se añadió una disolución de yoduro de metilo (1,5 mL, 24 mmoles) en DMSO (10 mL) en gotas y la disolución resultante se agitó hasta que el TLC (acetato de etilo) mostró la reacción completa. La reacción se interrumpió con agua (15 veces de exceso de volumen) y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (3 x 200 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con agua y salmuera. La fase orgánica se secó en sulfato sódico anhidro y se concentró *al vacío* para dar 4,8 g (98%) de aceite marrón (7).

Puede conseguirse una alquilación alterna usando carbonato de cesio. A una disolución agitada de éster metílico de ácido 4-amino-3-etoxicarbonilamino-benzóico (23,6 g, 99 mmoles) en DMF (330 mL, concentración final de 0,3 M) se añadió carbonato de cesio (114 g, 350 moles, 3,5 eq.). La suspensión verde resultante se calentó a 70°C toda la noche, después de cuyo tiempo el $^1\text{HNMR}$ de una alícuota de la mezcla de reacción mostró una ciclación completa (a medida que la reacción continua, el color cambia de verde a marrón). La reacción se enfrió entonces a temperatura ambiente y se añadió yoduro de etilo (22,7 g, 218 mmoles). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora después de cuyo tiempo el $^1\text{HNMR}$ de una alícuota mostró la reacción completa. La mezcla de reacción se diluyó entonces con agua (15 volúmenes) y la fase acuosa resultante se extrajo con acetato de etilo (3 X 150 mL). Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron con HCl 1N y agua. La fase orgánica se secó en sulfato sódico anhidro y se concentró *al vacío* para dar 19,4 g de un sólido naranja (7, aunque con amina alterna) que se usó sin purificación adicional.

A una disolución agitada de metoxi-metil-amida de ácido 1-isopropil-3-metil-2-oxo-2,3-dihidro-1H-benzoimidazol-5-carboxílico (7) (17 g, 61 mmoles) en DME seco (700 mL), se añadió cloruro de p-fluorobencilmagnesio (Rieke Metals, 0,25 M en Et_2O ,

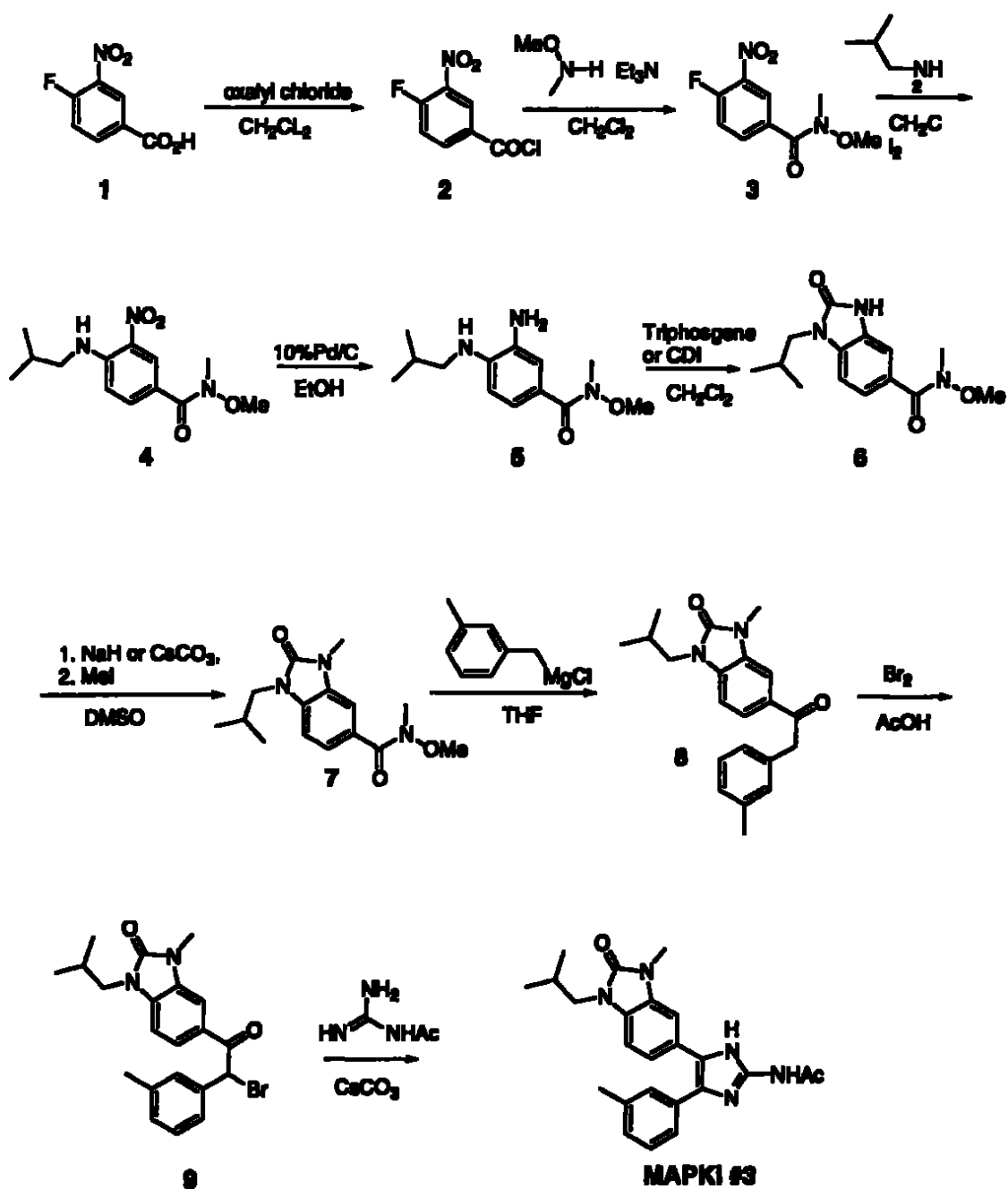
44

400 mL, 100 mmoles). La mezcla de reacción se dejó agitar toda la noche, después de cuyo tiempo el ¹HNMR de una alícuota de la reacción indicó que no permanecía material de partida. El reactivo de Grignard en exceso en la mezcla de reacción se apagó con fosfato de dihidrógeno sódico acuoso saturado, y el DME se eliminó *al vacío*. La fase acuosa restante se extrajo con acetato de etilo (3 X 200 mL) y los extractos combinados se secaron en sulfato sódico anhidro y el disolvente se concentró *al vacío*. La cromatografía (Flash 75, gradiente de elución: 25% de acetato de etilo-hexanos a 50% de acetato de etilo-hexanos) dio 15 g de un sólido blanco (8).

A una disolución agitada de 1-isopropil-3-metil-5-p-fluorofenilacetil-1,3-dihidrobenzoimidazol-2-ona (8) (10,0 g, 31 mmoles) en ácido acético (60 mL), se añadió bromo (1,63 mL, 31,6 mmoles) en una parte. La reacción se dejó agitar toda la noche (c.a. 4 horas) después de cuyo tiempo se encontró que estaba completa por ¹HNMR. La reacción se concentró *al vacío* y el residuo se tomó en acetato de etilo (150 mL) y se lavó dos veces con disolución de bicarbonato sódico saturado. La fase orgánica se secó con sulfato sódico anhidro y se concentró *al vacío* para dar 12,1 g de un sólido marrón (9) que se usó sin purificación.

Una mezcla agitada de 5-(bromo-p-fluorofenil-acetil)-1-isopropil-3-metil-1,3-dihidrobenzoimidazol-2-ona (8) (0,5 g, 1,23 mmoles), cloruro de pirazin-2-carboxamidina (0,395 g, 2,49 mmoles), carbonato de cesio (1,22 g, 3,74 mmoles) y DMF (4,0 mL), se calentó a 60° C. Después de 1 hora, la reacción se determinó que estaba completa por LCMS. La reacción se enfrió a temperatura ambiente y se diluyó con agua (40 ml). Después de agitar durante 1 hora, la suspensión en bruto se filtró y los sólidos se purificaron por cromatografía de centelleo (dietiléter seguido por acetato de etilo para dar 40 mg del compuesto del título (MAPKI #2) como un sólido marrón claro.

El compuesto, MAPKi #3, se preparó como se describe anteriormente en el Esquema I y debajo en el Esquema II, excepto que en la Etapa 3, se utiliza t-butilamina en vez de isopropilamina, para preparar el compuesto de Fórmula 4.

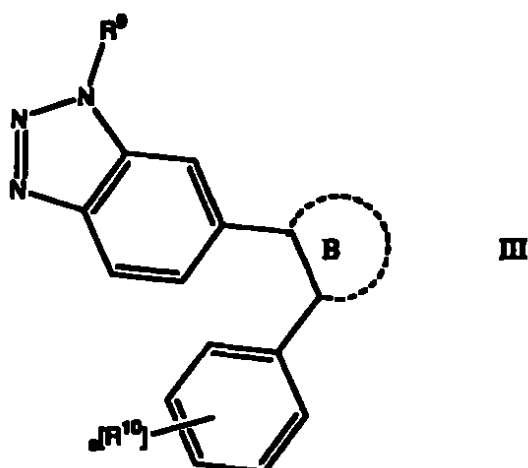
45
84**ESQUEMA II**

El compuesto de Fórmula III es un potente inhibidor de MAP quinasas, preferiblemente p38 quinasa, y es útil en el tratamiento de inflamación, osteoartritis, artritis reumatoide, cáncer, perfusión o isquemia en el infarto o ataque al corazón, enfermedades autoinmunes y otros trastornos.

El compuesto de Fórmula III, en el que "B" es un grupo hetero sustituido o no sustituido, tal como pirrolilo, imidazolilo, pirazolilo, oxazolilo; R⁹ es H, alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo o heteroarilo; R¹⁰ es H, alquilo, fenilo, F, Cl o CN; y

s es 0-5, es el tema del documento U.S. 2003-078432 (incorporado en este documento por referencia en su totalidad. Notar que las variables R^9 y R^{10} se definen como variables diferentes en el documento US 2003-078432), y la preparación del compuesto de Fórmula III se describe en este documento.

- 5 El compuesto de Fórmula III, en el que "B" es un grupo hetero sustituido o no sustituido, tal como pirrolilo, imidazolilo, pirazolilo, oxazolilo; R^9 es H, alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo o heteroarilo; R^{10} es H, alquilo, fenilo, F, Cl o CN; y s es 0-5, es el tema del documento U.S. 2003-078432 (incorporado en este documento por referencia en su totalidad.

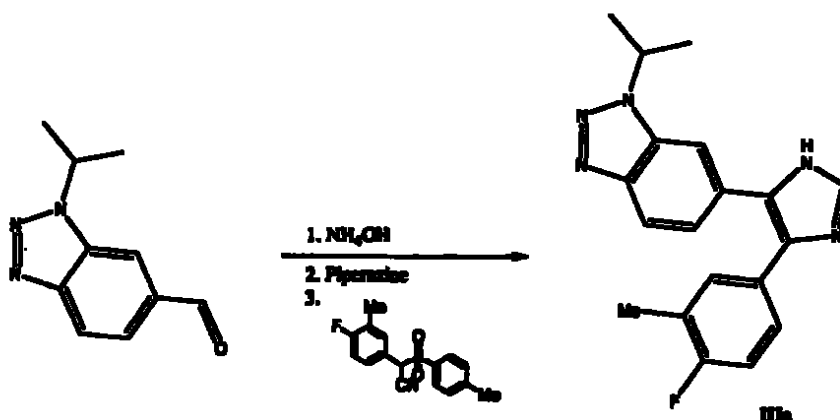


10

Por propósitos ilustrativos generales, el Esquema de reacción III representado debajo proporciona una ruta potencial para sintetizar el compuesto de Fórmula IIIa. Para una descripción más detallada de las etapas individuales de reacción, véase la referencia descrita anteriormente.

15

ESQUEMA III

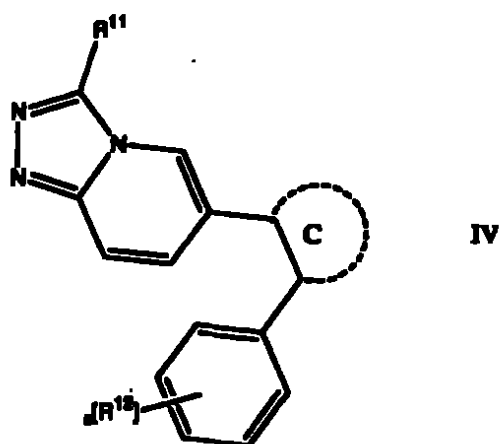


En particular, el compuesto de Fórmula III, en el que "B," R^9 , R^{10} y s se definen anteriormente, pueden prepararse como se propone en el Esquema III y como se describe más completamente en el documento U.S. 2003-078432 (Nota: la

87
86

designación de "B," R^9 , R^{10} es diferente y se describe con diferentes variables en el documento U.S. 2003-078432), tratando una disolución en THF de 3-isopropil-3H-benzotriazol-5-carbaldehído con NH_4OH concentrado, seguido de la adición de piperazina y el compuesto de isocianida para proporcionar el compuesto de Fórmula IIIa.

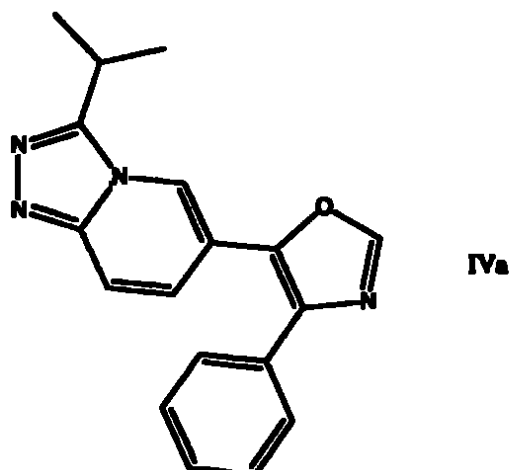
Los compuestos de Fórmula IV, 6-(fenilheterociclil)-[1,2,4]triazolo[4,3-a]piridinas, son útiles en el tratamiento de inflamación, osteoartritis, artritis reumatoide, cáncer, reperfusión o isquemia en el infarto o ataque al corazón, enfermedades autoinmunes y otros trastornos. El compuesto de Fórmula IV es el tema del documento WO 2002072579 (incorporado en este documento por referencia en su totalidad), y la preparación del compuesto de Fórmula 11 se describe en este documento.



Los compuestos de Fórmula IV, en los que "C" es pirrolilo, imidazolilo, pirazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo o isotiazolilo sustituido o no sustituido; R^{11} es H, alquenilo, alquinilo, o (ciclo)alquilo sustituido o no sustituido, fenilo, heteroarilo o heterociclilo o amino; R^{12} es halo, (ciclo)alquil(oxi), (perhalo)alquilo, alquenilo, alquinilo, fenilo, heteroaril(oxi), heterociclil(oxi), OH, (perhalo)alcoxi, fenoxi, alquiltio, alquilsulfonilo, alquilaminosulfonilo, NO_2 , amino o carbamoilo sustituido o no sustituido; y s es 0-5; o sus sales farmacéuticamente aceptables, son útiles en el tratamiento de la inflamación aguda en animales.

Los compuestos de Fórmula IV, en los que "C," R^{11} , R^{12} y s se definen anteriormente, pueden prepararse como se describe más completamente en el documento WO 2002072579 (Nota: la designación de "C," R^{11} , R^{12} se definen con diferentes variables en el documento WO 2002072579). Por ejemplo, el compuesto de Fórmula IVa se preparó condensando ácido 6-cloronicotínico con N,O-dimetilhidroxilamina.bul.HCl (96%). El tratamiento de la amida con $(i\text{-Bu})_2\text{AlH}$ proporcionó el aldehído (24%), que se acopló después con (fenil)(p-

tolilsulfonil)metilisocianida para dar 2-cloro-5-(4-feniloxazol-5-il)piridina (71%). La conversión a la hidracina (100%), seguido por el acoplamiento con cloruro de isobutirilo y ciclación usando POCl_3 (32%), produjo el compuesto de Fórmula IVa.



5 De acuerdo con la presente invención, un sujeto animal que sufre una enfermedad inflamatoria aguda, tal como, por ejemplo, mastitis, se le administra una cantidad eficaz de al menos un inhibidor de la p38 MAP quinasa y dentro de aproximadamente una a dos semanas, el animal produce más de dos veces la leche que un animal infectado, no medicado. En una realización preferida el animal es una

10 vaca lactante.

Los animales lactantes que sufren infecciones provocadas por *E. coli*, por ejemplo, a menudo producen leche que contiene elevados niveles de *E. coli* y cuya leche no es adecuada para el consumo de mamíferos, incluso después del procesado. La presente invención proporciona además la reducción de descarte de leche en un

15 animal que sufre una enfermedad inflamatoria aguda con la administración de al menos un inhibidor de p38 MAP quinasa. La reducción de descarte de leche es de final rápido, dándose dentro de aproximadamente una semana. La presente invención proporciona además métodos para la reducción de los números de *E. coli* en las muestras de leche de animales tratados con inhibidores de p38 MAP quinasa.

20 El inhibidor de p38 MAP quinasa de la presente invención puede usarse en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria en un animal, que se exacerba o provoca por la excesiva o no regulada producción de citoquina en las células animales, incluyendo aunque no limitándose a monocitos y/o macrófagos. Los inhibidores preferidos de p38 MAP quinasa incluyen MAPKi #1, MAPKi #2 y MAPKi #3.

25 Los inhibidores de p38 MAP quinasa de la presente invención son así capaces de inhibir la producción y actividad de citoquinas asociadas con el proceso inflamatorio tal como IL-1, IL-6 y TNF, y son por lo tanto, de uso en terapia. IL-1, IL-6 y TNF

afectan a una amplia variedad de células y tejidos de estas citoquinas, además de a otras citoquinas derivadas de leucocitos, que son importantes mediadores inflamatorios de una amplia variedad de estados de enfermedad y procesos. Los inhibidores de p38 MAP quinasa de la presente invención también inhiben proteínas pro-inflamatorias, tales como COX-2, referida también por muchos otros nombres tal como prostaglandin-endoperóxido-sintasa-2 (PGHS-2). La regulación de COX-2, que es responsable de la producción de mediadores lipídicos pro-inflamatorios, también afecta a una amplia variedad de células y tejidos. La regulación de citoquinas inflamatorias y proteínas inflamatorias es así crítico para mejorar una amplia variedad de enfermedades y procesos que incluyen, aunque no están limitados a mastitis.

Por consiguiente, en otro aspecto, la presente invención proporciona un método para tratar un animal mediante la inhibición de la síntesis de la enzima COX-2, que comprende la administración de una cantidad eficaz de al menos un inhibidor de p38 MAP quinasa.

La presente invención también proporciona un método para tratar la inflamación aguda mediada por citoquinas, que comprende administrar una cantidad eficaz de un inhibidor de p38 MAP quinasa y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización, la presente invención proporciona un método para inhibir TNF. En otra realización, la presente invención proporciona un método para inhibir IL-1. En aún otra realización, la presente invención proporciona un método para inhibir la muerte celular apoptótica mediada a través de la ruta de p38 MAP quinasa.

En particular, los inhibidores de p38 MAP quinasa se emplean en el tratamiento de una enfermedad o proceso en un animal que se exagera o provoca por la excesiva o no regulada producción de IL-1 o TNF en las células animales, incluyendo aunque no limitándose a monocitos y/o macrófagos.

Hay muchos procesos o enfermedades en que la producción excesiva o no regulada de citoquina está implicada en exacerbar y/o provocar la enfermedad. Esto incluye estados de enfermedad inflamatoria aguda en animales tal como mastitis, enfermedad respiratoria, membranas de placenta retenidas, metritis, piometra, enteritis, hepatitis, nefritis, septicemia, laminitis, congelación, cólico, abomasums desplazado, endotoxemia y torsión cecal.

Los inhibidores de p38 MAP quinasa se administran en una cantidad suficiente para inhibir los efectos y producción de citoquina, en particular la producción de IL-1, IL-6 o TNF, tal que la producción de citoquina esté regulada a la baja a niveles normales, o en algún caso a normales por debajo de lo normal, para así mejorar o

10
89

evitar el estado de enfermedad. La medida del nivel de citoquina se consigue por los expertos usando medios convencionales.

5 Como se usa en este documento, el término "citoquina" se refiere a cualquier polipéptido secretado que afecta a las funciones de células, y es una molécula que modula las interacciones entre células en la respuesta inflamatoria. Una citoquina incluye, aunque no está limitada a, monoquinas y linfoquinas, sin reparar en que células las producen. Ejemplos de citoquinas incluyen, aunque no están limitadas a, interleuquina-1, (IL-1), Factor de Necrosis Tumoral-alfa (TNF- α) y Factor de Necrosis Tumoral beta (TNF- β).

10 Para emplear un inhibidor de p38 MAP quinasa en terapia, dicho inhibidor se formulará normalmente en una composición farmacéutica de acuerdo con la práctica farmacéutica patrón. Esta invención, por lo tanto, se refiere además a una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz, no tóxica, de al menos un inhibidor de p38 MAP quinasa y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

15 Los inhibidores de p38 MAP quinasa y las composiciones farmacéuticas que los incorporan pueden administrarse convenientemente a un animal por cualquiera de las rutas usadas convenientemente para la administración de medicamentos, por ejemplo, de forma oral, tópica, parenteral o por inhalación. Los inhibidores de p38 MAP quinasa pueden administrarse en formas de dosificación convencionales preparadas combinando un inhibidor de p38 MAP quinasa con vehículos farmacéuticos patrón según procedimientos convencionales. El inhibidor de p38 MAP quinasa puede administrarse también en dosificaciones convencionales en combinación con un segundo compuesto terapéuticamente activo conocido, o pueden administrarse dos o más inhibidores de p38 MAP quinasa de una vez para coger ventaja de las propiedades sinérgicas de los inhibidores de p38 MAP quinasa y proporcionar la inhibición mejorada de la inflamación y enfermedades que las provocan.

25 Los procedimientos para administrar dosificaciones convencionales de inhibidores de p38 MAP quinasa pueden implicar mezcla, granulado y compresión o disolución de los ingredientes como sea apropiado para la preparación deseada. Se apreciará que la forma y carácter del carácter o diluyente farmacéuticamente aceptable está dictado por la cantidad de ingrediente activo con que se va a combinar, la ruta de administración y otras variables bien conocidas. El(los) vehículo(s) debe(n) ser "aceptable(s)" en el sentido de ser compatibles con los otros ingredientes de la formulación y no deben ser perjudiciales para el animal receptor.

El vehículo farmacéutico empleado puede ser, por ejemplo, o bien un sólido o un líquido. Ejemplos de vehículos sólidos son lactosa, sacarosa, talco, gelatina, agar, pectina, goma arábica, estearato de magnesio, ácido esteárico y similares. Los ejemplos de vehículos líquidos son jarabe, aceite de cacahuete, aceite de oliva, agua y similares. De manera similar, el vehículo o diluyente puede incluir material de liberación sostenida bien conocido en la técnica, tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo solo o con una cera.

El término "administración sistémica" se refiere a administración intravenosa, subcutánea e intramuscular. Se prefiere la administración sistémica.

Los inhibidores de p38 MAP quinasa se administran preferiblemente de forma parenteral, que es mediante administración intravenosa, intramuscular, intramamaria o subcutánea. Se prefieren generalmente las formas subcutánea e intramuscular de administración parenteral. Las formas apropiadas de dosificación para dicha administración pueden prepararse mediante técnicas convencionales.

Para todos los métodos de uso descritos en este documento para los inhibidores de p38 MAP quinasa, el régimen de dosificación parenteral será preferiblemente de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal total, preferiblemente de aproximadamente 0,1 mg/kg a 5 mg/kg, más preferiblemente de aproximadamente 0,1 mg/kg a 1 mg/kg. Se reconocerá además por un experto en la técnica, que la cantidad óptima y sus espaciado de dosificaciones individuales de los inhibidores de p38 MAP quinasa se determinarán por la naturaleza y extensión de la enfermedad a tratar, la forma, la ruta y sitio de administración, y el paciente particular a tratar, y que dichas condiciones óptimas pueden determinarse por técnicas convencionales. También se apreciará por un experto en la técnica que el curso óptimo del tratamiento, es decir, el número de dosis de un inhibidor de p38 MAP quinasa dado por día para un número definido de días, puede averiguarse por los expertos en la técnica usando pruebas de determinación del curso convencional de tratamiento.

EJEMPLO

Treinta y tres vacas Holstein lactantes se asignaron al azar a 5 grupos de tratamiento delimitados por la producción de leche y los días con leche. Se recogieron muestras de leche y sangre y datos de temperatura en el ordeño de la mañana del día -1. Se seleccionó un cuarto normal de cada vaca en base a niveles clínicos y los resultados de la Prueba de Mastitis de California (CMT) realizada en el ordeño de la mañana del día -1. Después del ordeño de la tarde del día 41, se infundieron los

92
H

cuartos seleccionados con aproximadamente 30 cfu de *E. coli* (MacDonald 487). Se recogieron muestras de leche y sangre y datos de temperatura antes del tratamiento en el ordeño de la mañana del día 0. Las vacas se trataron después del ordeño de la mañana en el día 0 según el diseño de estudio. Después del tratamiento, se recogieron muestras de leche y sangre y los datos de temperatura a las horas 11, 24, 35, 48, 72, 144, 168, 192 y 216. Se calcularon valores clínicos de los cuartos infundidos y producción de leche en cada ordeño. Las muestras de leche se analizaron por cultivo (*E. coli*), SCC, TNF- α y PGE₂ y se determinaron los leucogramas de la sangre.

Tabla 1

Tratamiento	Dosis	Ruta	Número de Animales
1. Tratados con Vehículo-, no infectados*		IV	6
2. Tratados con vehículo, infectados		IV	6
3. Infectados, MAPKi #1	10 mg/kg	IV	7
4. Infectados, MAPKi #2	10 mg/kg	IV	7
5. Infectados, MAPKi #3	10 mg/kg	IV	7

*El vehículo en este estudio era N-metil-pirrolidona al 25% y dimetilsulfóxido al 25% en polietilenglicol de un peso nominal de 400 Daltons.

Análisis de datos

La valoración de la eficacia del artículo de prueba se determinó en base a la comparación del efecto del tratamiento en cada variable frente al grupo no medicado puesto a prueba. <Los datos se analizaron usando el procedimiento MEZCLADO de PC-SAS, versión 6.12. El modelo incluía tratamiento, tiempo y su interacción. La covarianza dentro de las vacas a través del tiempo se modeló usando el análisis del estado Repetido con una estructura de covarianza esférica para representar los tiempos de muestreo espaciados de forma desigual. Las pruebas de importancia (P $\leq$ 0,10) se basaron en el efecto del tratamiento principal comparado con el grupo no medicado puesto a prueba. El valor P de $\leq$ 0,10 se seleccionó en base al número de animales por grupo de tratamiento y la naturaleza conservadora del procedimiento SAS.

93
at

Respuesta al desafío de *E. coli*

El desafío de un solo cuarto de cada vaca con ~ 30 cfu de *E. coli* (cepa MacDonald 487) dio por resultado una mastitis severa dentro de las 13-24 horas. En todos, 27 de 27 cuartos desafiados desarrollaron mastitis clínica. Los datos de
5 temperatura rectal pico y el nivel de la colonia bacteriana después del desafío sugiere que la mastitis resultante era más severa que la observada en estudios anteriores.

Efectos del tratamiento en la respuesta en fase aguda a la Temperatura Corporal por mastitis inducida por *E. coli*

No se observaron diferencias significativas en la temperatura corporal después
10 de tratar a las vacas con cualquier compuesto inhibidor de p38 MAP quinasa y las vacas infectadas no medicadas (Figura 1).

Producción de Leche

Las vacas tratadas con MAPKi #1 demostraron una pérdida de producción de leche asociada con mastitis significativamente menor después del tratamiento en
15 comparación con las vacas infectadas tratadas con vehículo ($P=0,1$, Figura 2). En base a los valores medios de producción de leche diaria de la Figura 2, una vaca tratada con MAPKi #1 produjo más de dos veces más de leche que una vaca infectada, no medicada, durante los 13 días después del tratamiento (847 libras frente a 365 libras). Las vacas tratadas con MAPKi #2 también produjeron más leche que las
20 vacas de control (689 libras frente a 365 libras). Las vacas tratadas con MAPKi #3 produjeron la misma cantidad de leche que las vacas de control infectadas, no medicadas, durante el mismo periodo de tiempo (366 libras frente a 365 libras).

Valores clínicos

Las vacas tratadas con MAPKi #1 y MAPKi #2 tuvieron valores clínicos de
25 leche significativamente mejorados que las de control no medicadas (Figura 3, $P<0,001$, $P=0,006$, respectivamente). Las vacas tratadas con MAPKi #3 tuvieron valores clínicos de leche similares a las de control infectadas, no medicadas.

Se observaron valores clínicos glandulares mejorados significativamente para las vacas tratadas con cualquiera de los tres compuestos inhibidores de p38 MAP quinasa (Figura 4, $P=0,0004$, $P=0,004$, $P<0,001$, respectivamente para MAPKi #1, MAPKi #2, MAPKi #3). Las vacas tratadas con MAPKi #1 y MAPKi #2 demostraron una mejora significativa tanto en el valor de leche como glandular. Los valores clínicos acumulativos también fueron significativamente menores para vacas tratadas con
30 MAPKi #1 y MAPKi #2 en comparación a las de control (Figura 5, $P=0,0001$ y $0,07$, respectivamente).
35

Valor Celular Somático de la Leche (SCC)

Los SCC de la leche se aumentaron a las 13 horas después del desafío para las vacas en todos los grupos de tratamiento (Figura 6). Algunas muestras de leche que se coagularon enormemente no se analizaron por SCC, en cambio se les asignaron el valor máximo legible por el instrumento de 10.000.000 células/ml por propósitos de análisis de datos ($\log_{10} = 7$). Algunas muestras de leche normal tuvieron menor SCC que el límite de detección del instrumento (2000 células/ml) y se les asignaron un valor de 1000 en vez de 0 para propósitos de análisis de datos. El tratamiento de vacas con los compuestos p38 MAPKi no mejoraron significativamente los valores SCC en comparación con las vacas de control infectadas, no medicadas, en este estudio. Las vacas tratadas con MAPKi #1 y MAPKi #3 mostraron una tendencia hacia menores valores de SCC, particularmente después de los 6 días posteriores al tratamiento ($P=0,13$, $0,18$, respectivamente).

Leucogramas

Los valores de células sanguíneas blancas totales y de neutrófilos totales permanecieron relativamente inalterados a lo largo del estudio para las vacas no infectadas, no medicadas (Figuras 7 y 8). Las vacas infectadas, no medicadas, demostraron la respuesta bifásica típica para WBC y PMN. Ambas cayeron dramáticamente después del desafío (0-72 horas) y los números de WBC volvieron a niveles cercanos al pre-desafío y los números de PMN alcanzaron más del doble de los niveles del pre-desafío después del estudio (144-216 horas). Los números totales de WBC y PMN para vacas tratadas con MAPKi #1 o MAPKi #2 volvieron a niveles de pre-desafío significativamente más rápido que para los controles o vacas tratadas con MAPKi #3 cuando los datos se analizaron durante 0-72 horas ($P=0,004$, $0,06$, respectivamente). Estos datos sugieren que poco después del tratamiento con MAPKi #1 o MAPKi #2, se admitieron menos PMN en la glándula mamaria procedentes de la sangre periférica. Se sabe que los neutrófilos contribuyen a la patología del tejido en la glándula mamaria cuando se lisan y liberan su contenido en el entorno circundante. Pocos neutrófilos admitidos en la glándula dan por resultado menos patología del tejido. Menos patología de tejido da por resultado una reducción en la pérdida de producción de leche y una vuelta más rápida a la leche y glándulas normales.

PGE₂ en suero

Después del tratamiento, en el momento 0, las vacas tratadas con MAPKi #1, MAPKi #2 o MAPKi #3 demostraron todas una significativa reducción en los niveles medios de PGE₂ en suero comparado con las vacas control infectadas, no medicadas

95
94

(Figura 9, $P=0,0038$, $0,0741$, $0,0934$, respectivamente). Los niveles de PGE_2 en suero se elevaron 13 horas después del desafío de *E. coli* (tiempo 0) y antes del tratamiento. Después del tratamiento, las vacas tratadas con MAPKi #1 mostraron una disminución en los niveles de PGE_2 en suero a las 11 horas, el PGE_2 en suero de las vacas tratadas con MAPKi #2 permanecieron en el mismo nivel y las vacas tratadas con MAPKi #3 tuvieron niveles de PGE_2 en suero que continuaron subiendo. Las vacas de los tres grupos de tratamiento demostraron disminución en los niveles de PGE_2 en suero 24 horas después del tratamiento y todas habían vuelto cerca de la línea básica a las 48 horas.

10

Niveles de la Colonia de *E. coli* en la Leche

Los números de *E. coli* en las muestras de leche se ilustran en la Figura 10. En el momento del tratamiento (hora 0), los números medios de la colonia de *E. coli* en la leche oscilaban de 14,5-19,1 log₂ cfu/ml para grupos desafiados. Después de tratamiento (horas 11-168), los números medios de la colonia de *E. coli* disminuyeron significativamente para las vacas tratadas con MAPKi #1 en comparación con los controles infectados, no medicados ($P=0,007$). Las vacas tratadas con MAPKi #2 mostraron además una disminución en los números de *E. coli* en la leche en comparación con los controles, aunque la diferencia no fue significativa ($P=0,15$). Las vacas tratadas con MAPKi #3 no mostraron una disminución en los números de *E. coli* en la leche en comparación con los controles. No se cree que estos compuestos sean directamente de naturaleza antibacteriana, aunque la enzima p38 MAPK en sí misma está implicada en un número de procesos celulares, algunos de los cuales pueden influir en el crecimiento y/o supervivencia de las bacterias en la leche y la glándula mamaria. Los péptidos antibacterianos naturales producidos por los neutrófilos bovinos (defensinas), pueden bloquearse o inhibirse por la enzima p38 MAPK. La inhibición de la enzima por estos compuestos puede permitir la liberación natural de estos péptidos y mejorar la muerte bacteriana por los neutrófilos. Otra posible explicación es que el sistema enzimático p38 MAPK contribuye a activar la apoptosis de neutrófilos, inhibiendo la p38 MAPK, la apoptosis de los neutrófilos puede retrasarse y prolongar la capacidad de los neutrófilos de luchar contra la infección.

El desafío de las vacas con *E. coli* dio por resultado un 100% de incidencia de mastitis clínica. Se observó una mejora significativa en la respuesta en fase aguda (menor pérdida de producción de leche, valores clínicos de leche, valores clínicos de la glándula, valores clínicos acumulativos, niveles totales de leucocitos, niveles de PGE_2 en suero y *E. coli* en leche mejorados) para las vacas tratadas con MAPKi #1 en

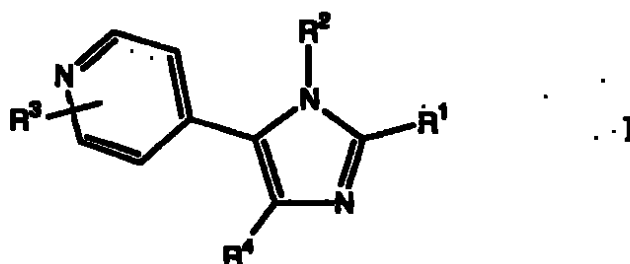
35

ASab

- comparación con los controles infectados, no medicados. Se observaron reducciones significativas en los valores clínicos de leche, glándula y acumulativos y niveles reducidos de *E. coli* en la leche para vacas tratadas con MAPKi #2 en comparación con las vacas de control. Las vacas tratadas con MAPKi #3 mostraron valores
- 5 reducidos significativamente de PGE_2 en suero y valores clínicos de la glándula mejorados, aunque no la tendencia a la producción de leche o valores de leche mejorados en comparación a los controles infectados.

REIVINDICACIONES

1. Un método para tratar una enfermedad inflamatoria o mejorar la recuperación a partir de una enfermedad inflamatoria aguda en un animal que lo necesita, que comprende administrar a dicho animal una cantidad eficaz de uno o más inhibidores de p38 MAP quinasa.
2. Un método para la mejora de la producción de leche o reducción de la pérdida de leche en un animal que sufre una enfermedad inflamatoria aguda que comprende la administración a dicho mamífero de una cantidad eficaz de uno o más inhibidores de p38 MAP quinasa.
3. Un método para inhibir la síntesis y actividad de la enzima COX-2, TNF o IL-1 en un animal que comprende la administración de una cantidad eficaz de uno o más inhibidores de p38 MAP quinasa.
4. Un método para inhibir la muerte celular apoptótica en un animal que comprende la administración de una cantidad eficaz de uno o más inhibidores de p38 MAP quinasa.
5. El método según las reivindicaciones 1, 2, 3 o 4, en el que el inhibidor de p38 MAP quinasa se selecciona de
 - (i) el compuesto de Fórmula I,



en el que R¹ es H;

R² es un heterocíclico sustituido y no sustituido, cicloalquilo, arilo, heteroarilo: en el que el heterocíclico es un anillo de 5-, 6- o 7- miembros saturado, parcialmente saturado o insaturado, que contiene de uno a tres heteroátomos seleccionados independientemente del grupo que consiste en nitrógeno, oxígeno y azufre; e incluye cualquier grupo biciclo en el que cualquiera de los anillos heterocíclicos anteriores está condensado con un anillo de benceno u otro heterociclo; y el nitrógeno puede estar en el estado oxidado dando la forma N-óxido; y sustituido opcionalmente con R_y;

R_y es para cada suceso de manera independiente -halo, -OH, -alquilo (C₁-C₆), -alquenilo (C₂-C₆), -alquinilo (C₂-C₆), -Oalquilo (C₁-C₆), -Oalquenilo (C₂-

C_6), -Oalquinilo (C_2-C_6), -alquilo (C_0-C_6)- $NR^{13}R^{14}$, -C(O)- $NR^{13}R^{14}$, - SO_2R^{13} , - SOR^{13} , - SR^{13} , - $NR^{13}-SO_2R^{14}$, - $NR^{13}-C(O)-R^{14}$, - $NR^{13}-OR^{14}$, - $SO_2-NR^{13}R^{14}$, -CN, - CF_3 , -C(O)alquilo (C_1-C_6), =O, - SO_2 -fenilo o C(O)-Ar o het-Ar;

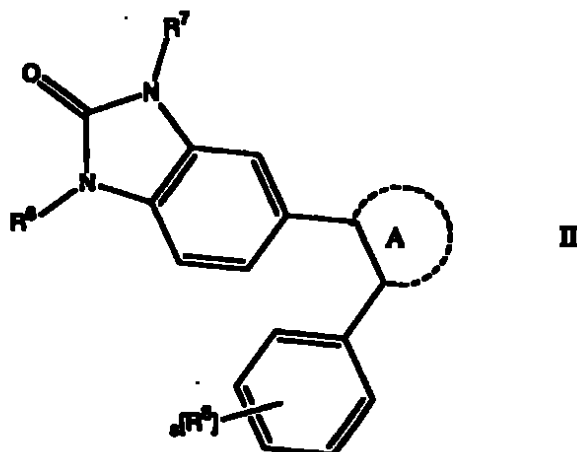
R^3 es independientemente -H, -halo, -OH, -alquilo (C_1-C_{10}), OCH_3 , NH_2 , NHR, en el que R es arilo, heteroarilo o alquilo; y

R^4 es un arilo y heteroarilo sustituido y no sustituido;

R^{13} y R^{14} son cada uno de forma independiente para cada suceso -H; -alquilo (C_1-C_6), en el que 1 o 2 átomos de carbono, diferentes al átomo de carbono de conexión, pueden sustituirse opcionalmente con 1 o 2 heteroátomos seleccionados independientemente de S, O y N, y en el que cada átomo de carbono está sustituido opcionalmente con 1, 2 o 3 halo; -alquenilo (C_2-C_6), sustituido opcionalmente con 1, 2 o 3 halo; o -alquinilo (C_2-C_6) en el que 1 átomo de carbono, distinto del átomo de carbono de conexión y los átomos de etinilo, puede sustituirse opcionalmente con 1 átomo de oxígeno y en el que cada átomo de carbono está sustituido opcionalmente con 1, 2 o 3 halo;

o R^{13} y R^{14} se toman juntos con N al que están unidos para formar un heterocido;

(ii) el compuesto de Fórmula II,



en el que "A" es un pirrolilo, imidazolilo, pirazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo o isotiazolilo, sustituido o no sustituido;

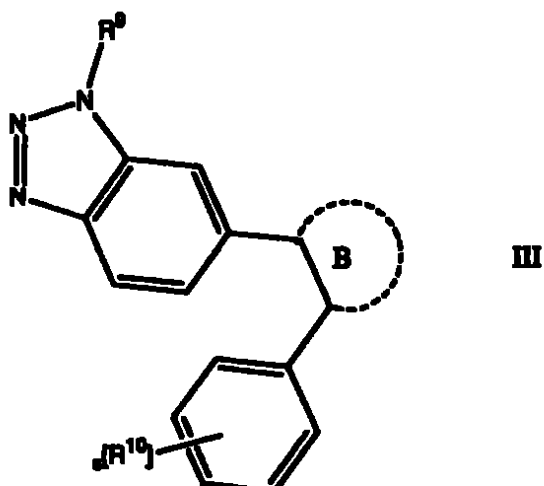
R^6 y R^7 son independientemente H o (ciclo)alquilo, fenilo, heteroarilo o heterocido sustituido o no sustituido;

R^8 es independientemente halo, (perhalo)alquilo, (perhalo)cicloalquilo, alquenilo, alquinilo, heterocicil(oxi), fenilo, OH, (perhalo)alcoxi, fenoxi, alquiltio, alquil(amino)sulfonilo, alquilsulfamoilo, carbamoilo, acilo o carboxi; y

98-99

s es 0-5;

(iii) el compuesto de Fórmula III



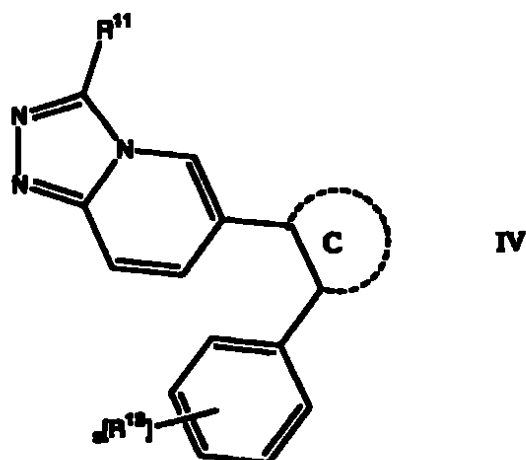
5

en el que "B" es un grupo hetero sustituido o no sustituido, pirrolilo, imidazolilo, pirazolilo u oxazolilo;

R^9 es H, alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo o heteroarilo; R^{10} es H, alquilo, fenilo, F, Cl o CN; y

s es 0-5; o

(iv) el compuesto de Fórmula IV,



10

en el que "C" es pirrolilo, imidazolilo, pirazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo o isotiazolilo, sustituido o no sustituido;

R^{11} es H, alquenoilo, alquínilo, o (ciclo)alquilo sustituido o no sustituido, fenilo, heteroarilo o heterociclilo o amino;

15

R^{12} es halo, (ciclo)alquil(oxi), (perhalo)alquilo, alquenoilo, alquínilo, fenilo, heteroaril(oxi), heterocicil(oxi), OH, (perhalo)alcoxi, fenoxi, alquiltio,

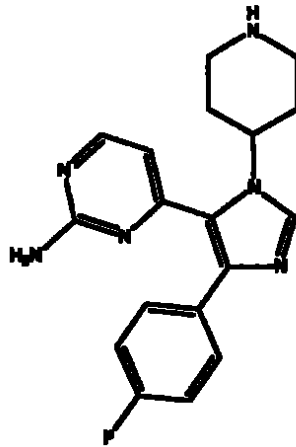
29 100

alquilsulfonilo, alquilaminosulfonilo, NO₂, amino o carbamoilo sustituido o no sustituido; y

s es 0-5;

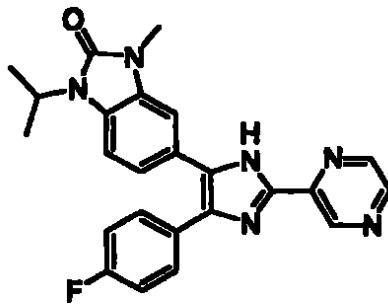
6. El método según la reivindicación 5, en el que el inhibidor de p38 MAP
5 quinasa es

(i) un compuesto MAPKi #1



MAPKi #1

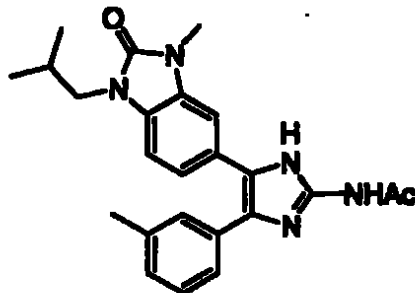
(ii) un compuesto MAPKi #2



MAPKi #2

10

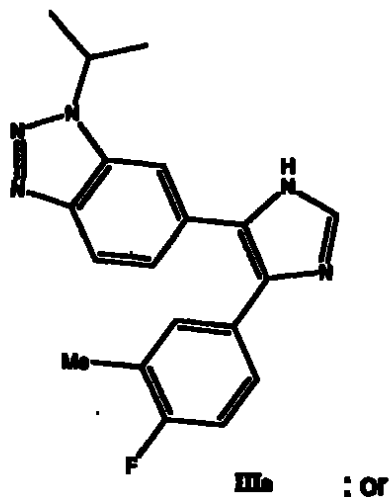
(iii) un compuesto MAPKi #3



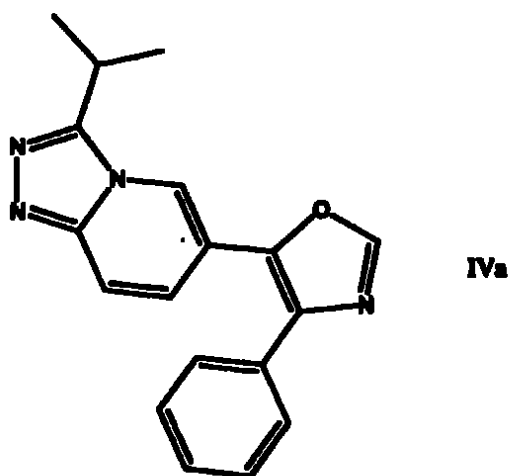
MAPKi
#3

(iv) un compuesto de Fórmula IIIa

100101



(v) un compuesto de Fórmula IVa



- 5 7. El método según la reivindicación 5, en el que la enfermedad inflamatoria se selecciona del grupo que consiste en mastitis, enfermedad respiratoria, membranas de placenta sustituidas, metritis, piometra, enteritis, hepatitis, nefritis, septicemia, endotoxemia, laminitis, congelación y problemas de intestinos obstructivos.
- 10 8. El método según la reivindicación 5, en el que los problemas de intestinos obstructivos se seleccionan del grupo que consiste en cólico, abomasums desplazados y torsión cecal.
9. El método según la reivindicación 5 o 8, en el que la enfermedad inflamatoria es mastitis y el animal es una vaca.
- 15 10. El método según las reivindicaciones 5-9, que comprenden además un vehículo farmacéuticamente aceptable.
11. El uso de los compuestos de las reivindicaciones 5-9, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de las enfermedades de las reivindicaciones 7-12.

10/102

12. El uso de los compuestos de las reivindicaciones 5-9 en la preparación de un inhibidor de uno o más inhibidores de p38 MAP quinasa para la mejora de la producción de leche o reducción de pérdida o descarte de leche en un animal.
- 5 13. El uso de los compuestos de las reivindicaciones 5-9 en la preparación de un inhibidor de una enzima COX-2, TNF, IL-1 o la inhibición de la muerte celular apoptótica, para tratar o evitar la reducción de pérdida de leche en un animal que sufre una enfermedad inflamatoria aguda.
- 10 14. Un procedimiento para la fabricación de un medicamento para usar en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria caracterizada por el uso de los compuestos de las reivindicaciones 5-9.
- 15 15. El uso de los compuestos de las reivindicaciones 5-9 en la preparación de un inhibidor de una enzima COX-2, TNF, IL-1, o la inhibición de la muerte celular apoptótica, en un envase junto con instrucciones para su uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria o producción reducida de leche en animales.

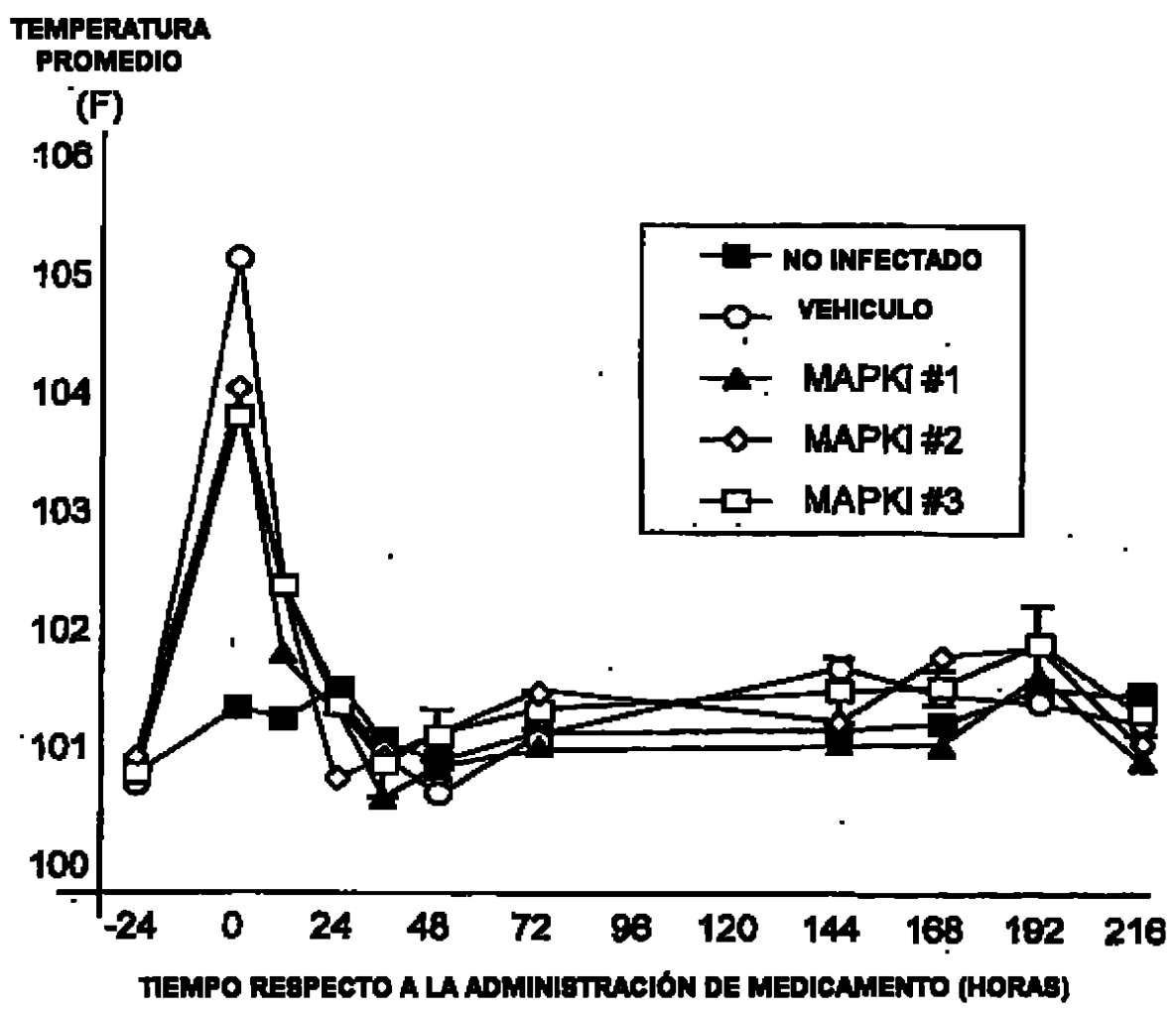
102/103

Resumen de la Invención**METODOS PARA TRATAR LA INFLAMACION AGUDA EN ANIMALES CON
INHIBIDORES DE p38 MAP QUINASA**

5 La presente invención proporciona métodos para tratar animales que tienen enfermedades inflamatorias agudas, que incluyen mastitis, administrando al menos un inhibidor de p38 MAP quinasa. La presente invención también proporciona métodos para mejorar la producción de leche y reducir el descarte de leche en animales que padecen enfermedades inflamatorias agudas administrando al menos un inhibidor de p38 MAP quinasa.

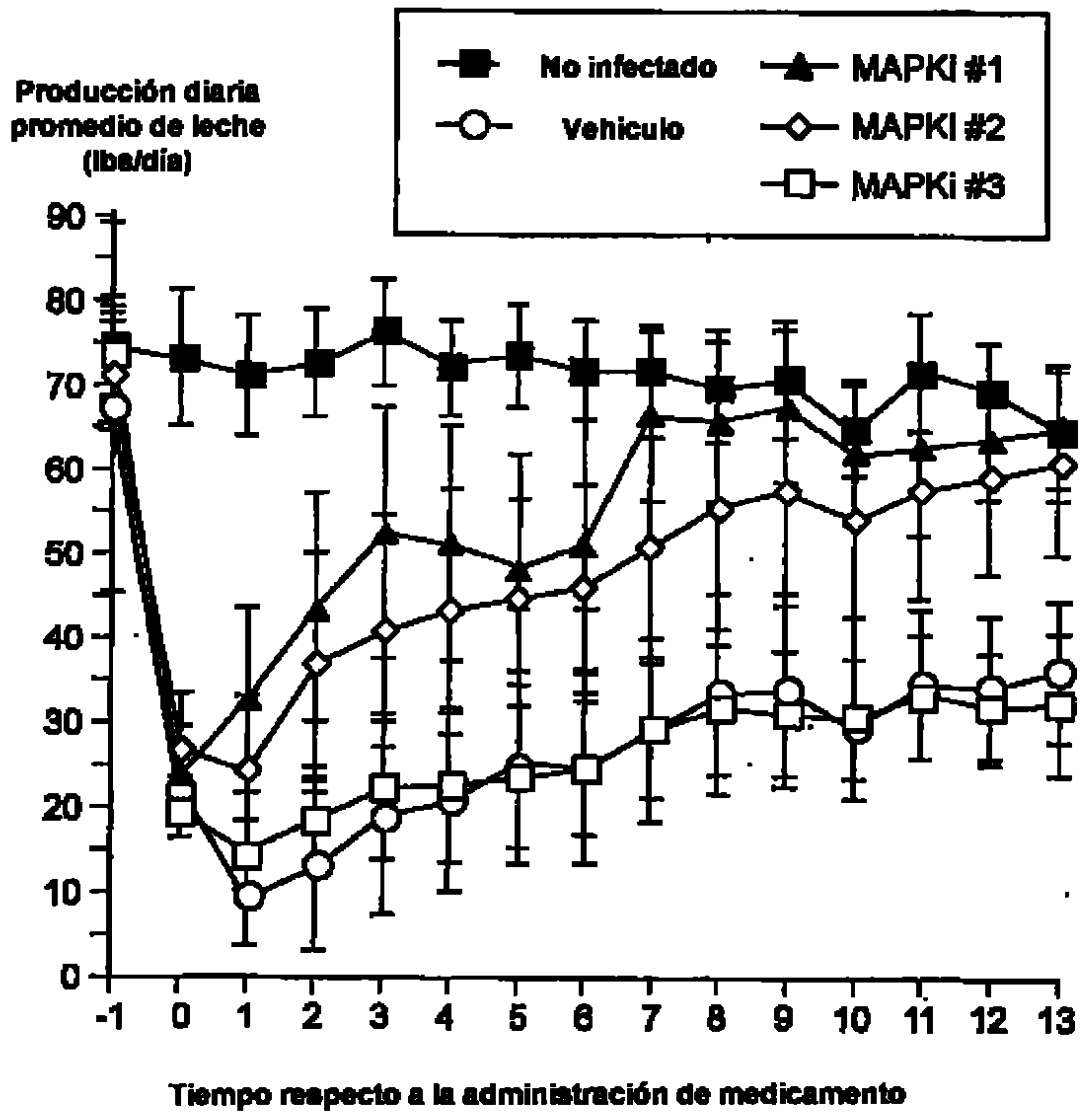
10/9/04

FIG. 1



18/10/05

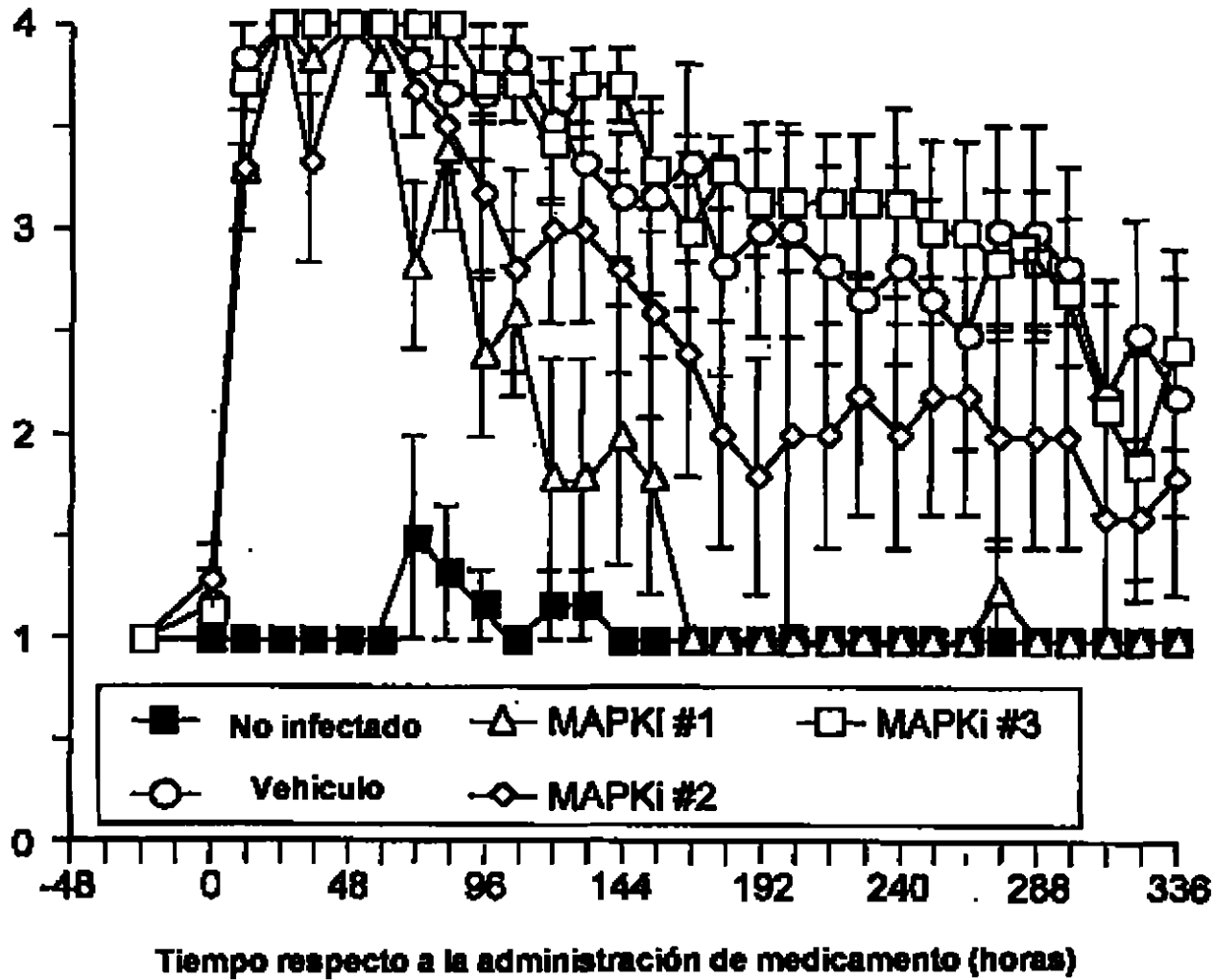
FIG 2



105106

FIG. 3

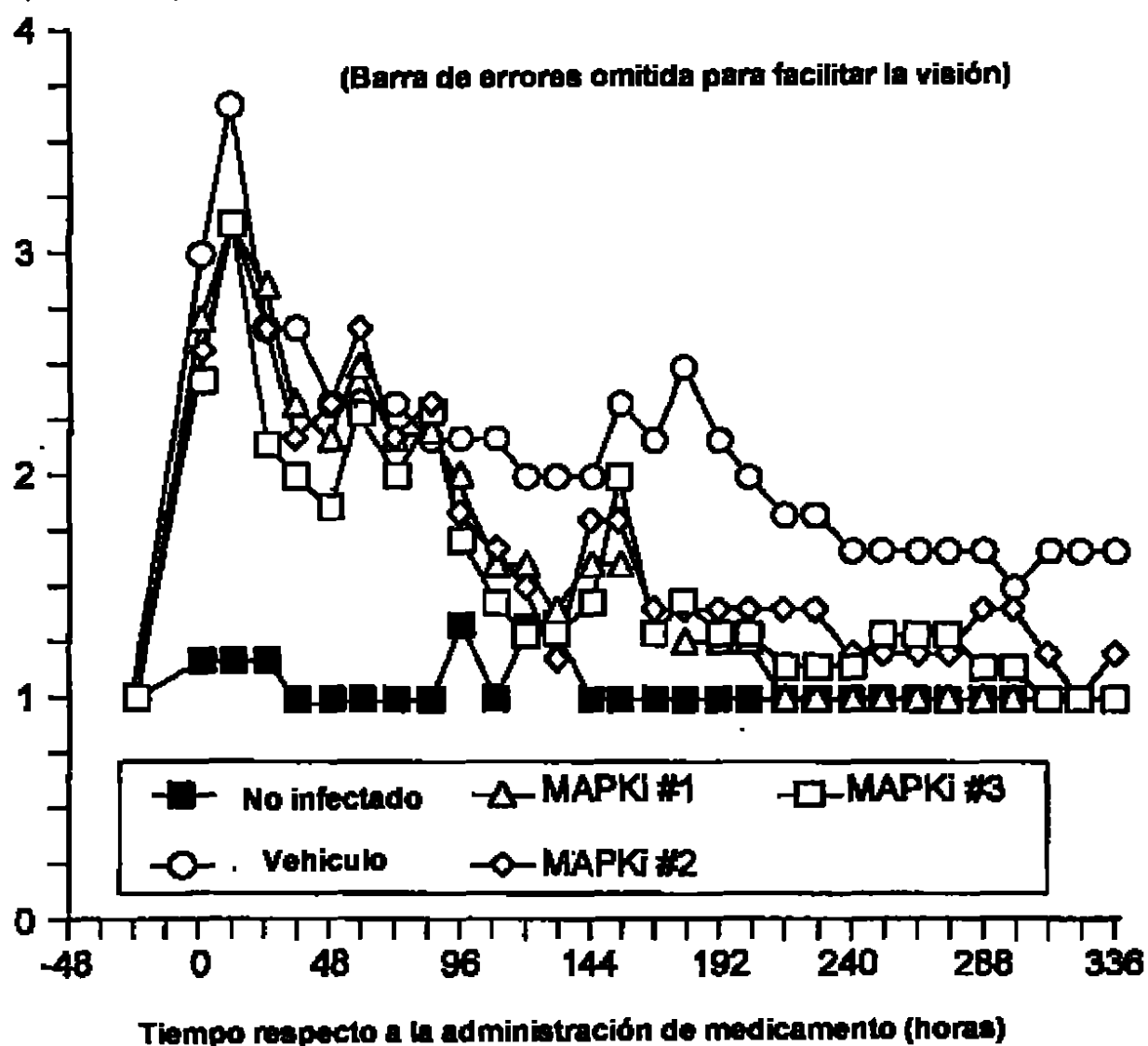
Valor clínico
promedio de
la leche
(escala 1-4)



10/6/07

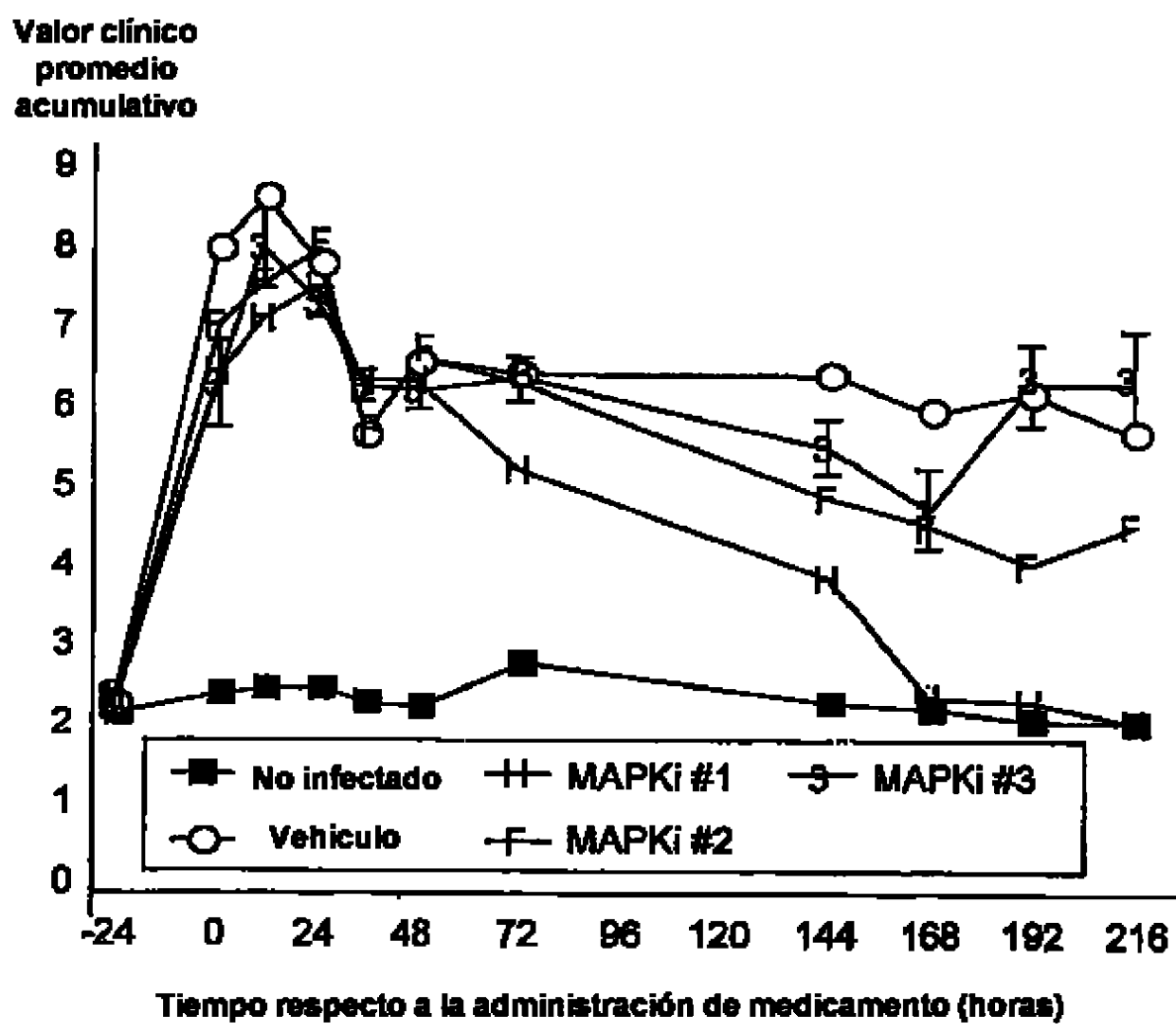
FIG. 4

Valor clínico
promedio de
la glándula
(escala 1-4)



102/108

FIG. 5



108 109

FIG. 6

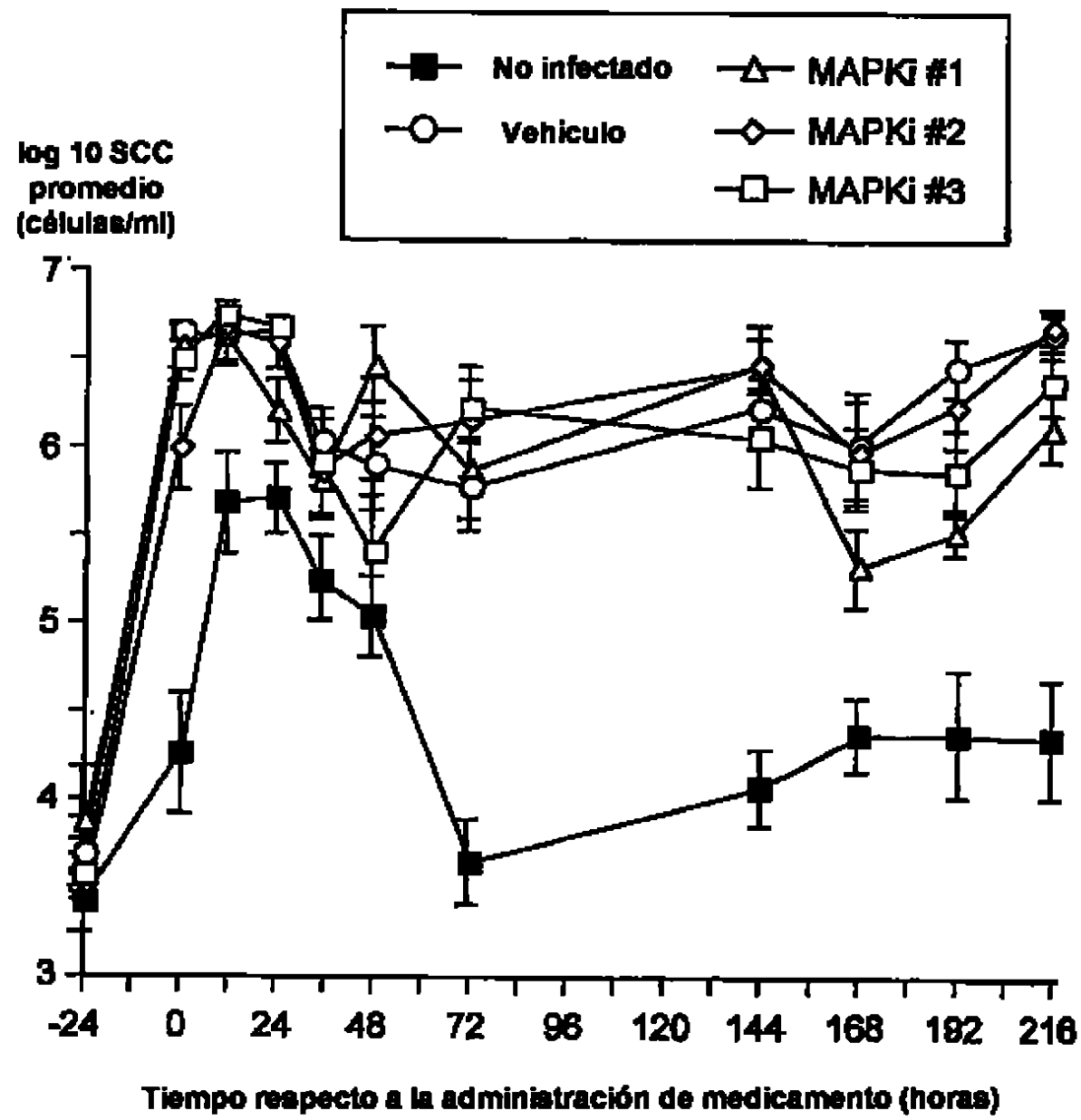
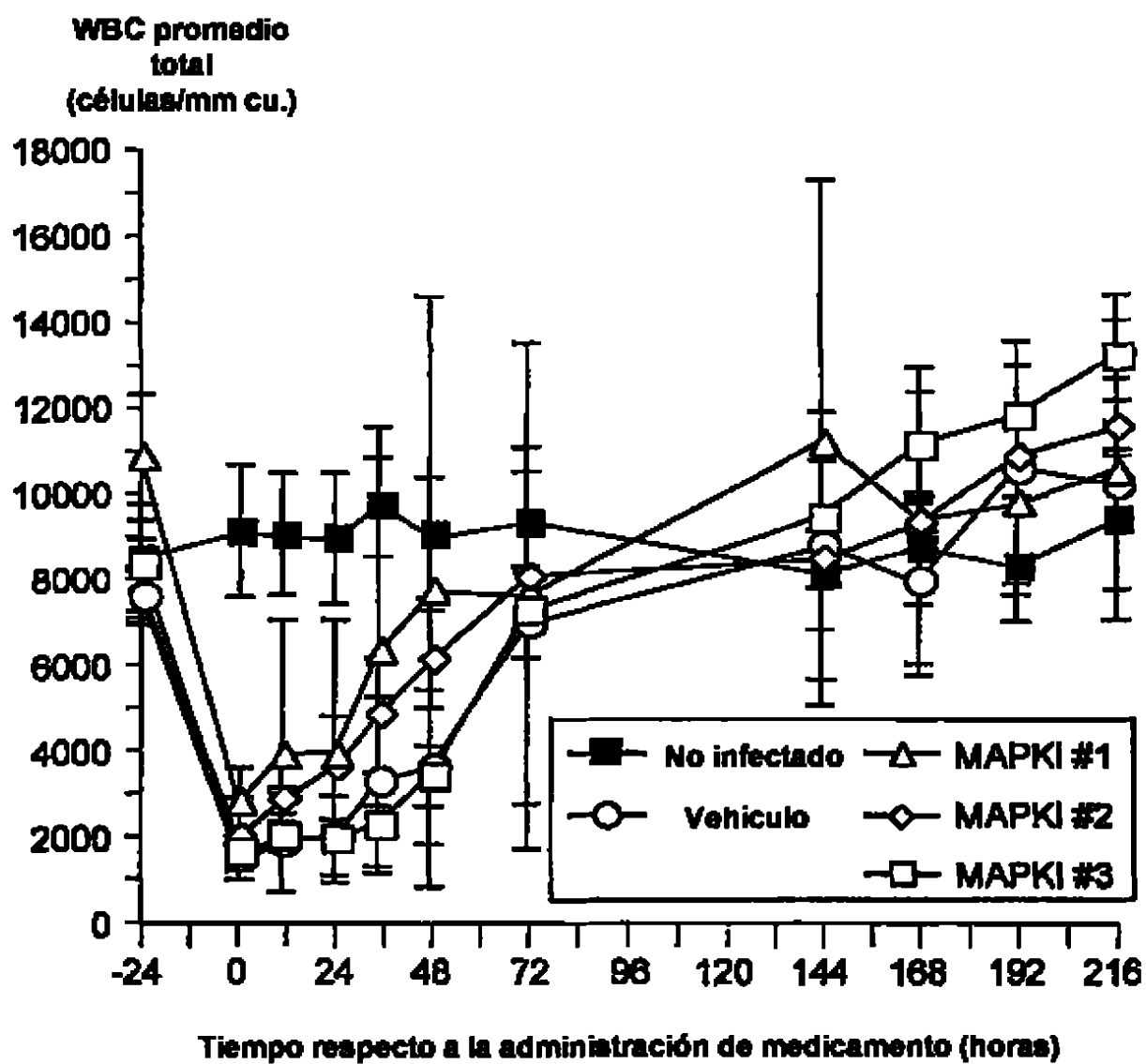
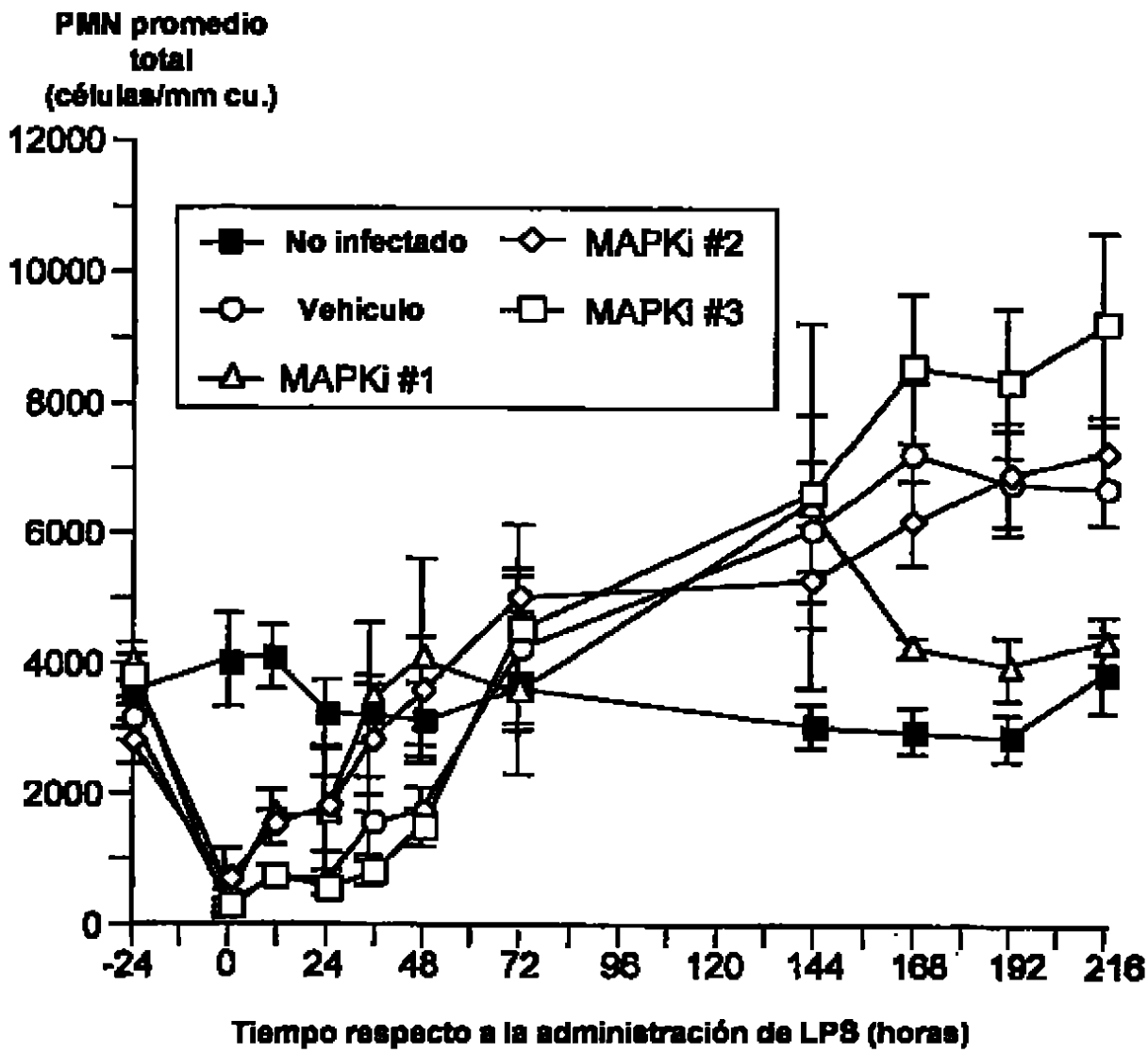


FIG. 7



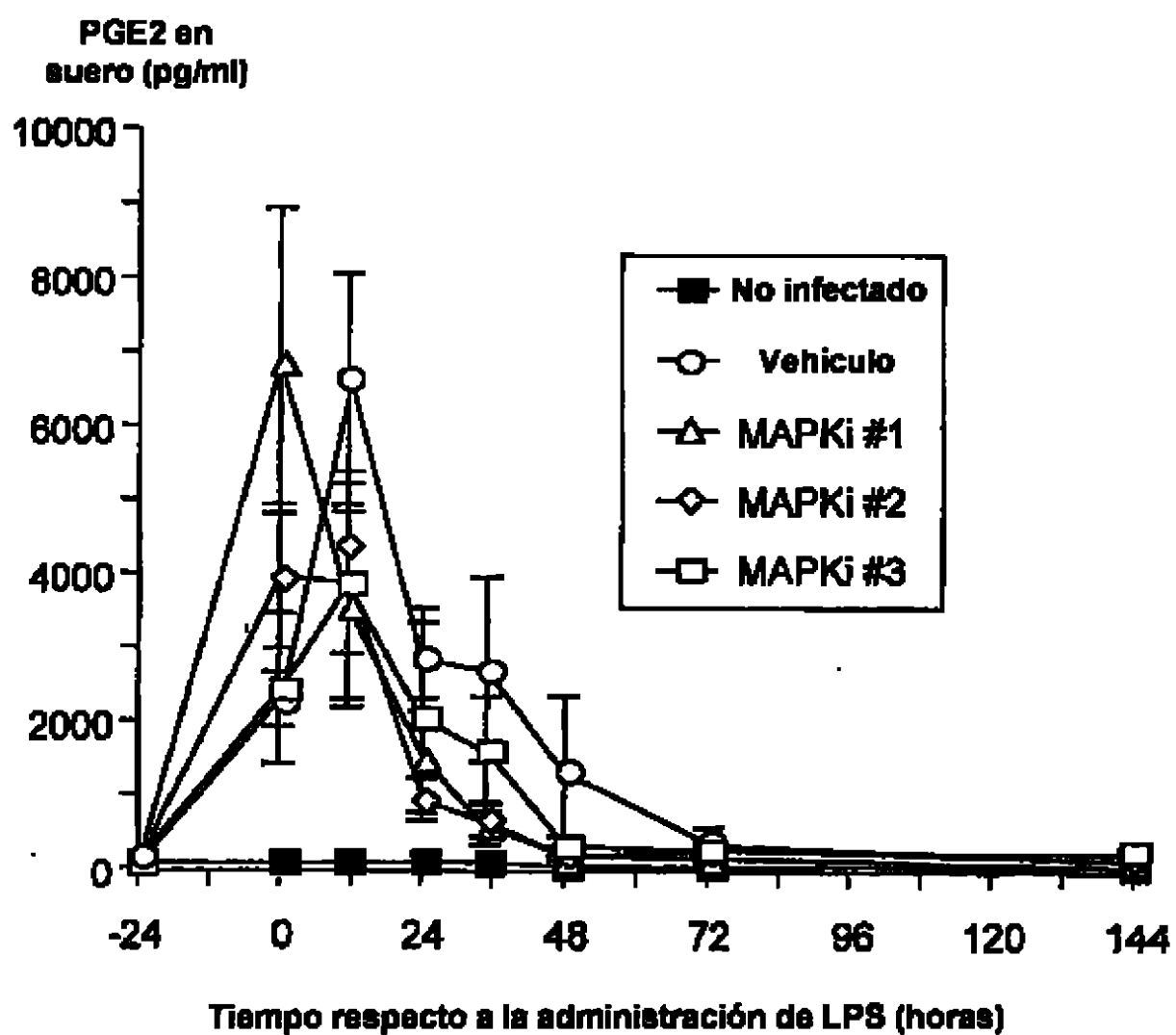
110 III

FIG. 8



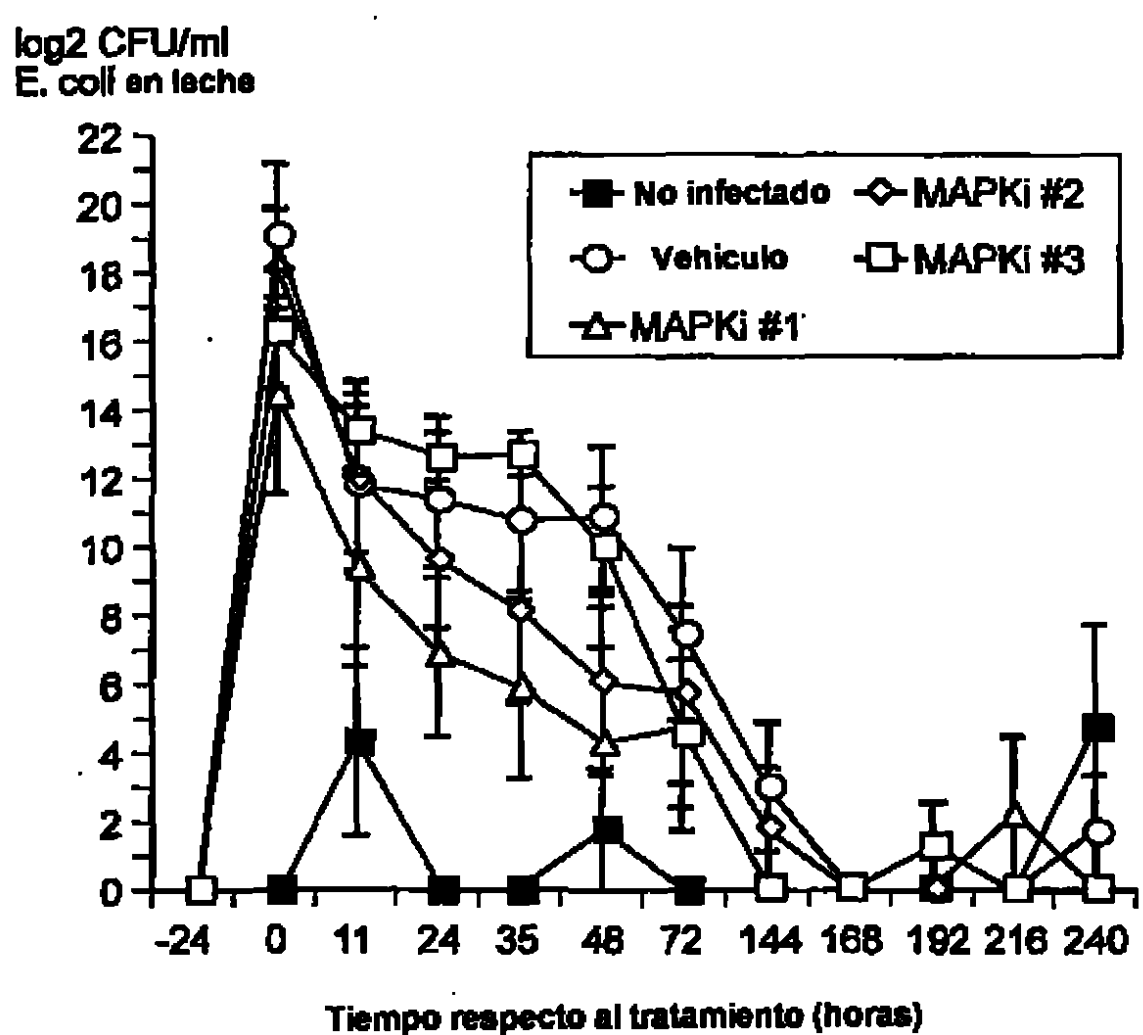
11/2

FIG. 9



112/113

FIG. 10



113114

TRATADO DE COOPERACIÓN DE PATENTES
PCT
NOTIFICACIÓN DE TRANSMISIÓN DEL REPORTE DE EXAMEN
PRELIMINAR INTERNACIONAL
(PCT Regla 71.1)
De: AUTORIDAD DE REVISIÓN PRELIMINAR INTERNACIONAL

Para:
FULLER, Grover, F. Jr.
Pfizer Inc.
201 Tabor Road
Morris Plains, NJ 07950
Estados Unidos de América.

Sello de Recibido 14 de noviembre de 2005, MOPS IP GLBL SRVS.

Fecha de expedición: 10.11.2005
Referencia del expediente del solicitante o mandatario: PC23014A
Solicitud Internacional No.: PCT/IB2004/004035
Fecha de presentación internacional: 06.12.2004
Fecha de prioridad: 18.12.2003
Solicitante: PFIZER PRODUCTS INC et. al.

1. Se notifica al solicitante que la Administración Encargada del Examen Preliminar Internacional ha emitido el informe de examen preliminar internacional para la solicitud internacional y se lo transmite adjunto, acompañado, si procede, de sus anexos.
2. Se transmite una copia del presente informe y, si procede, de sus anexos, a la Oficina Internacional para comunicación a todas las Oficinas elegidas.
3. Si alguna Oficina elegida lo exige, la Oficina Internacional realizará una traducción en inglés del informe (con exclusión de sus anexos) y la transmitirá a las Oficinas interesadas.

4. RECORDATORIO

Para iniciar la fase nacional ante cada Oficina elegida, el solicitante debe cumplir ciertos actos (presentación de la traducción y pago de las tasas nacionales) en el plazo de 30 meses desde la fecha de prioridad (o más tarde por lo que respecta a ciertas oficinas) (Artículo 39.(1)) (véase también el recordatorio enviado por la Oficina Internacional en el formulario PCT/IB/301).

Cuando deba entregarse una traducción de la solicitud internacional o una oficina elegida, se incluirá la traducción de cualquier anexo de

115.
114

informe de Examen Preliminar Internacional. Corresponde al solicitante preparar la traducción en cuestión y entregarla directamente a cada Oficina elegida interesada

Para más amplios detalles en lo relativo a los plazos aplicables y las exigencias de las oficinas elegidas, véase el Volumen II de la guía del solicitante PCT.

Se llama la atención del solicitante sobre el Artículo 33(5) que prevé que los criterios de novedad, actividad inventiva y de aplicación industrial definidos en el Artículo 33(2) a (4) sólo servirán a los efectos del examen preliminar internacional, y que "todo Estado contratante puede aplicar criterios adicionales o diferentes al objeto de decidir, en ese Estado, si la invención es patentable o no" (véase también el Artículo 27(5)). Tales criterios adicionales pueden afectar, por ejemplo, a las excepciones de patentabilidad, requisitos específicos relativos a la divulgación, la claridad de las reivindicaciones.

Nombre y dirección postal de la Administración encargada del Examen Preliminar Internacional:

Oficina de Patentes Europea

D-80298 – Munich

Tel: +49-89 2399 - 0, Tx: 523656 epmu d

Fax: +49-89 2399 – 4465.

Funcionario Autorizado: Senkel, H

Tel: + 49 89 2399-8071

116
116

TRATADO DE COOPERACIÓN DE PATENTES
PCT
INFORME PRELIMINAR INTERNACIONAL SOBRE PATENTABILIDAD
(Capítulo II del Tratado de Cooperación en materia de Patentes)
(PCT Artículo 36 y Regla 70)

Referencia del expediente del solicitante o mandatario: PC23014A
Solicitud Internacional No.: PCT/IB2004/004035
Fecha de presentación internacional: 06.12.2004
Fecha de prioridad: 18.12.2003
Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o la vez clasificación nacional e IPC: A61K 31/497, A61K 31/506, A61K 31/4184, A61K 31/4192, A61K 31/4196, A61P 43/00.
Solicitante: PFIZER PRODUCTS INC. et. al.

1. El presente informe preliminar internacional sobre patentabilidad, se establece por esta Administración encargada del examen preliminar internacional según el Artículo 35 y se transmite al solicitante conforme el Artículo 36.

2. Este INFORME consta de un total de 7 hojas, incluida la presente hoja de portada.

3. Este informe también contiene ANEXOS, que comprenden.

a. ☐ (remitido al solicitante y a la oficina internacional) un total de hojas, descritas a continuación:

☐ hojas de la descripción, las reivindicaciones y/o los dibujos que han sido modificadas y que sirven de base al presente informe, y/o de hojas que contienen rectificaciones autorizadas por esta Administración (véase la Regla 70.16 y la Instrucción Administrativa 607 del PCT).

☐ hojas que reemplazan a otras hojas anteriores, pero que esta Administración considera que contienen modificaciones que se extienden más allá de la divulgación de la invención tal como fue originalmente presentada, según se indica en el punto 4 del Reglamento I y en el Recuadro Suplementario.

b. ☐ (remitido únicamente a la Oficina Internacional) un total de (indicar tipo y soporte(s) electrónico(s)) , que contienen una lista de secuencias y/o tabla(s) relativa(s), solo en formato legible por ordenador, como se indica en el Recuadro Suplementario relativo a Listas de Secuencias (ver Instrucción Administrativa 802).

4617

4. El presente informe contiene indicaciones relativas a los siguientes puntos:

- | | | |
|-------------------------------------|---------------|--|
| ☒ | Recuadro I | Base de este informe |
| ☐ | Recuadro II | Prioridad |
| ☒ | Recuadro III | Ninguna formulación de opinión sobre la novedad, la actividad inventiva y la aplicación industrial |
| ☐ | Recuadro IV | Falta de unidad de Invención |
| ☒ | Recuadro V | Declaración motivada según el Artículo 35(2) sobre la novedad, la actividad inventiva y la aplicación industrial, citas y explicaciones en apoyo de esta declaración |
| ☐ | Recuadro VI | Ciertos documentos citados |
| ☐ | Recuadro VII | Defectos en la Solicitud Internacional |
| ☐ | Recuadro VIII | Observaciones relativas a la solicitud internacional |

Fecha de radicación de la demanda: 17.01.2005
Fecha de elaboración de este reporte: 10.11.2005

Nombre y dirección postal de la Administración encargada del Examen Preliminar Internacional:
Oficina de Patentes Europea
D-80298 - Munich
Tel: +49-89 2399 - 0, Tx: 523656 epmu d
Fax: +49-89 2399 - 4465.

Funcionario Autorizado: Borst, M
Tel: + 49 89 2399-

118
7/17

Recuadro I. Base de este informe

1. Por lo que respecta al **idioma**, este informe se ha establecido sobre la base de la solicitud internacional en el idioma en el cual se depositó, salvo indicación en contra señalada a continuación.

- ☐ Este informe está basado en una traducción del idioma original al siguiente idioma , que es el de una traducción proporcionada a los fines de:
- ☐ búsqueda internacional (según Reglas 12.3 y 23.1 (b))
 - ☐ publicación de la solicitud internacional (según Regla 12.4)
 - ☐ examen preliminar internacional (según Reglas 55.2 y/o 55.3)

2. Por lo que respecta a los **elementos*** de la solicitud internacional, esta opinión se ha establecido sobre la base de *(las hojas de reemplazo que hayan sido enviadas a la Oficina receptora en respuesta a un requerimiento según el Artículo 14 se las denomina en este informe como "inicialmente presentadas" y no se anexan al informe)*:

Descripción, Páginas

1 - 29 tal como se presentaron inicialmente

Reivindicaciones, Números

1 - 15 tal como se presentaron inicialmente

Dibujos, hojas

1/10 - 10/10 tal como se presentaron inicialmente

☐ una lista de secuencias y/o tabla(s) relativa(s) – ver Recuadro Suplementario relativo a Listas de Secuencias

3. ☐ Las modificaciones ha ocasionado la cancelación de:

- ☐ la descripción, páginas
- ☐ las reivindicaciones, Nos.
- ☐ los dibujos, hojas/fig.
- ☐ la lista de secuencias (especificar):
- ☐ tabla(s) relativa(s) a la lista de secuencias (especificar):

4. ☐ El presente informe ha sido establecido como si no se hubiesen presentado (algunas de) las modificaciones anexadas a este informe y listadas abajo, ya que se ha considerado que iban

más allá de la divulgación de la invención tal como fue presentada, como se indica en el Recuadro Suplementario (Regla 70.2(c)).

- ☐ la descripción, páginas
- ☐ las reivindicaciones, Nos.
- ☐ los dibujos, hojas/fig.
- ☐ la lista de secuencias (especificar):
- ☐ tabla(s) relativa(s) a la lista de secuencias (especificar):

* Si se utiliza el punto 4, algunas o todas estas páginas pueden llevar el sello de "sustituida".

Recuadro No. III. Ninguna formulación de opinión sobre la novedad, la actividad inventiva y la aplicación industrial

1. Las preguntas con respecto a si el invento reivindicado parece ser novedoso, implica una actividad inventiva (no ser evidente), o ser susceptible de aplicación industrial, por lo que respecta.

- ☐ al conjunto de la solicitud internacional,
- ☒ a las reivindicaciones Nos. 1-10

debido a que:

- ☒ la solicitud internacional, o las reivindicaciones Nos. 1-10 (ningún examen relacionado a la aplicación industrial) en cuestión se refieren al objeto, respecto del cual no requiere examen preliminar internacional (especifique):

ver hoja separada

- ☐ a descripción, reivindicaciones, o los dibujos (indíquese cuales a continuación) o tales reivindicaciones Nos. en cuestión no son claras, de manera que no es posible formular una opinión significativa (especifique):
- ☐ las reivindicaciones, o las reivindicaciones Nos. en cuestión no son claras, de manera que no es posible formular una opinión significativa.
- ☒ no se ha emitido informe de búsqueda internacional para dichas reivindicaciones Nos.
- ☐ la lista de de secuencias nucleótidas y/o de aminoácidos no cumplen la norma estándar prevista en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas por que:

120
119

- La lista en papel ☐ no se presentó
☐ no cumple con la norma estándar

La lista en formato legible por ordenador

- ☐ no se presentó
☐ no cumple con la norma estándar
- ☐ las tablas relativas a las listas de secuencias de nucleótidos y/o de aminoácidos, si únicamente se han presentado en formato legible por ordenador, no cumplen con los requisitos técnicos previstos en el Anexo C-bis de las Instrucciones Administrativas.
- ☐ Ver recuadro suplementario para más detalles.

**Recuadro No. V Declaración razonada según el Artículo 35(2)
con respecto a la novedad, nivel inventivo o aplicación industrial:
anterioridades y explicaciones que soportan tal declaración**

1. Declaración

Novedad (N) Si: Reivindicaciones 2, 8, 9, 12, 13
 No: Reivindicaciones 1, 3-7, 10, 11, 14,
15

Nivel Inventivo (NI) Si: Reivindicaciones
 No: Reivindicaciones 1-15

Aplicación Industrial (AI) Si: Reivindicaciones 11-15
 No: Reivindicaciones

2. Citas y explicaciones (Regla 70.7)

ver hoja separada.

Ítem III

No formulación de opinión con respecto a la novedad, nivel inventivo y aplicación industrial

Materia excluida de la evaluación preliminar internacional (Regla 67.1(v) del PCT)

Las reivindicaciones 1- 10 se relaciona con un método para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia y, por consiguiente, se relaciona con materia considerada por esta Autoridad, cubierta por provisiones de la Regla 67.1(iv) del PCT. De manera que no se formulará ningún concepto en la sección V con respecto a la aplicación industrial de la materia encontrada en estas reivindicaciones (Artículo 34(a)(i) del PCT).

Ítem V

Declaración razonada bajo la Regla 66.2(a)(ii) con respecto a la novedad, nivel inventivo y aplicación industrial; citas y explicaciones soportando dicha declaración

D1: WO 96/21452 A (SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION; ADAMS, JERRY, LEROY; GALLAGHER, TIMOTH) 18 de julio de 1996
D2: WO 02/072576 A (PFIZER PRODUCTS INC; DOMBROSKI, MARK, ANTHONY; LETAVIC, MICHAEL, ANTHO) 19 de septiembre de 2002
D3: US 2003/078432 A1 (LETAVIC MICHAEL A ET AL) 24 de abril de 2003
D4: WO 02/072579 A (PFIZER PRODUCTS INC; DOMBROSKI, MARK, ANTHONY; DUPLANTIER, ALLEN, JACO) 19 de septiembre de 2002
D5: BAEKER R ET AL: "Lipocalin- type prostaglandin D synthase in milk: a new biomarker for bovine mastitis" PROSTAGLANDINS, BUTTERWORTH, STONEHAM, MA, US, vol. 67, no. 1, enero 2002, páginas 75- 88, XP004330580 ISSN: 0090- 6980
D6: TRAKRANRUNGSIE N ET AL: "Expression of iNOS and COX- 2 proteins during endotoxin- induced mastitis in guinea pigs" FASEB JOURNAL, vol. 11, no. 3, 1997, página A315, XP009044767 & ANNUAL MEETING OF THE PROFESSIONAL RESEARCH SCIENTISTS ON EXPERIMENTAL BIOLOGY 97; NEW ORLEANS, LOUISIANA, USA; abril 6- 9, 1997 ISSN: 0892- 6638

1. Novedad (Artículo 33(2) del PCT)

Nota

La reivindicación 15, cuando se relaciona con instrucciones de uso, está relacionada a la mera presentación de información. Esta característica no es susceptible de aplicación industrial y, por lo tanto, no puede considerarse como una característica técnica adecuada para delimitarlo del estado de la técnica anterior.

La materia de las presente reivindicaciones 1, 3- 7, 10, 11, 14, 15 no es novedosa a la luz de D1, D2, D3 y D4.

122
121

D1 (reivindicación 44 y 46; página 37, línea 20 – página 38, línea 33; página 41, línea 17- 27), D2 (reivindicación 1 y 14; página 2, línea 8 – página 3, línea 5), D3 (reivindicaciones 1, 55- 57; [0005]- [0006]; ejemplo 1), D4 (reivindicaciones 1 y 15; página 2, línea 7 – página 3, línea 4; ejemplo 1) divulgan MAPAI#1 y el uso del mismo para el tratamiento de enfermedades inflamatorias. El mecanismo que sustenta el efecto terapéutico está basado en la inhibición de la COX- 2, IL- 1, TNF, y la p38 MAP quinasa.

2. Nivel inventivo (Artículo 33(3) del PCT)

2.1. Puesto que la materia de las reivindicaciones 1, 3- 7, 10, 11, 14, y 15 no es novedosa, tampoco podría tener nivel inventivo.

2.2. La materia de las reivindicaciones dependientes 2, 8, 9, 12, y 13 de la presente solicitud no poseen nivel inventivo.

La solicitud presentada posee evidencia (figuras 1- 10) que demuestra que los inhibidores de la p38 MAP quinasa ejercen efectos benéficos sobre la mastitis bacteriana en la vaca.

(i) Las reivindicaciones 2, 9, 12, y 13 están relacionadas con el tratamiento de la mastitis y los problemas de la producción lechera asociados con la misma. El antecedente más cercano, D5 (páginas 82- 86, párrafo titulado "4. Discusión"), divulga que TNF, IL- 1, COX- 2, y MAPK están involucrados en el patomecanismo de la mastitis bacteriana.

El problema técnico objetivo a ser resuelto a la luz de D5 era proporcionar una terapia para la mastitis.

Se conoce a partir de D1- D4 que los inhibidores de la p38 MAP quinasa son efectivos en el tratamiento de enfermedades inflamatorias en general mediante la inhibición de IL- 1, TNF y la COX- 2. Por lo tanto, era obvio utilizar los compuestos de D1- D4 para el tratamiento de la mastitis. No se pueden derivar de la solicitud ningún efecto en particular adicional con relación a la selección de los compuestos según las fórmulas I- IV.

(ii) La reivindicación 8 presentada se relaciona a estados inflamatorios diferentes a la mastitis.

Por lo tanto, el hallazgo en donde se encuentra que los inhibidores de la p38 MAP quinasa son efectivos en la mastitis bacteriana ha sido generalizada para incluir más trastornos inflamatorios, tales como problemas de intestino obstruido, etc. En caso de que hubiera sido argumentado que no era obvio a la luz del efecto anti- inflamatorio conocido de los inhibidores de la p38 MAP quinasa (compare con D1- D4) para usar dichos compuestos en el tratamiento de tales enfermedades, podría aplicarse la misma argumentación a la pregunta si dicha generalización es sustentada por la solicitud presentada (Artículo 6 del PCT) y la conclusión sería negativa. Por consiguiente, la materia de la reivindicación 8 no es ni inventiva ni está sustentada.

PATENT COOPERATION TREATY

123
A29

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

PCT

To:

FULLER, Grover, F., Jr.
Pfizer Inc.
201 Tabor Road
Morris Plains, NJ 07950
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

NOV 14 2005

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY

(PCT Rule 71.1)

Date of mailing
(day/month/year)

10.11.2005

Applicant's or agent's file reference
PC23014A

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/IB2004/004035

International filing date (day/month/year)
06.12.2004

Priority date (day/month/year)
18.12.2003

Applicant
PFIZER PRODUCTS INC. et al.

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the international preliminary report on patentability and its annexes, if any, established on the international application.
2. A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.
3. Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.

4. REMINDER

The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)) (see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB/301).

Where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the International preliminary report on patentability. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The applicant's attention is drawn to Article 33(5), which provides that the criteria of novelty, inventive step and industrial applicability described in Article 33(2) to (4) merely serve the purposes of international preliminary examination and that "any Contracting State may apply additional or different criteria for the purposes of deciding whether, in that State, the claimed inventions is patentable or not" (see also Article 27(5)). Such additional criteria may relate, for example, to exemptions from patentability, requirements for enabling disclosure, clarity and support for the claims.

Name and mailing address of the International
preliminary examining authority:



European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2369 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2369 - 4465

Authorized Officer

Senkel, H

Tel. +49 89 2369-8071



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

12A
10/17

Applicant's or agent's file reference PC23014A	FOR FURTHER ACTION		See Form PCT/PEAA16
International application No. PCT/IB2004/004035	International filing date (day/month/year) 06.12.2004	Priority date (day/month/year) 18.12.2003	
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K31/497, A61K31/506, A61K31/4184, A61K31/4192, A61K31/4196, A61P43/00			
Applicant PFIZER PRODUCTS INC. et al.			
1. This report is the International preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of 7 sheets, including this cover sheet. 3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising: a. ☐ sent to the applicant and to the International Bureau a total of sheets, as follows: ☐ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis of this report and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority (see Rule 70.16 and Section 807 of the Administrative Instructions). ☐ sheets which supersede earlier sheets, but which this Authority considers contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, as indicated in Item 4 of Box No. I and the Supplemental Box. b. ☐ (sent to the International Bureau only) a total of (Indicate type and number of electronic carrier(s)) , containing a sequence listing and/or tables related thereto, in computer readable form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see Section 802 of the Administrative Instructions).			
4. This report contains indications relating to the following items: ☒ Box No. I Basis of the opinion ☐ Box No. II Priority ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability ☐ Box No. IV Lack of unity of invention ☒ Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement ☐ Box No. VI Certain documents cited ☐ Box No. VII Certain defects in the international application ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application			
Date of submission of the demand 17.01.2005		Date of completion of this report 10.11.2005	
Name and mailing address of the International preliminary examining authority:  European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2369 - 0 Tlx 523656 epmu d Fax: +49 89 2369 - 4465		Authorized Officer Borst, M Telephone No. +49 89 2369- 	

125
124

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/IB2004/004035

Box No. I Basis of the report

1. With regard to the language, this report is based on the International application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.

☐ This report is based on translations from the original language into the following language, which is the language of a translation furnished for the purposes of:

- ☐ international search (under Rules 12.3 and 23.1(b))
- ☐ publication of the international application (under Rule 12.4)
- ☐ international preliminary examination (under Rules 55.2 and/or 55.3)

2. With regard to the elements* of the international application, this report is based on *(replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report)*:

Description, Pages

1-29 as originally filed

Claims, Numbers

1-15 as originally filed

Drawings, Sheets

1/10-10/10 as originally filed

☐ a sequence listing and/or any related table(s) - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing

3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages
- ☐ the claims, Nos.
- ☐ the drawings, sheets/figs
- ☐ the sequence listing *(specify)*:
- ☐ any table(s) related to sequence listing *(specify)*:

4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

- ☐ the description, pages
- ☐ the claims, Nos.
- ☐ the drawings, sheets/figs
- ☐ the sequence listing *(specify)*:
- ☐ any table(s) related to sequence listing *(specify)*:

* If item 4 applies, some or all of these sheets may be marked "superseded."

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

126 195
International application No.
PCT/IB2004/004035

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non-obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire International application,

☒ claims Nos. 1-10

because:

☒ the said International application, or the said claims Nos. 1-10 (no examination as to industrial applicability) relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (specify):

see separate sheet

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

☒ no international search report has been established for the said claims Nos. -

☐ the nucleotide and/or amino acid sequence listing does not comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions in that:

the written form

☐ has not been furnished

☐ does not comply with the standard

the computer readable form

☐ has not been furnished

☐ does not comply with the standard

☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in computer readable form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.

☐ See separate sheet for further details

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

12756
A66
International application No.
PCT/B2004/004035

Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	2, 8, 9, 12, 13
	No: Claims	1, 3-7, 10, 11, 14, 15
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	1-15
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	11-15
	No: Claims	

2. Citations and explanations (Rule 70.7):

see separate sheet

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/IB2004/004035

Re Item III

Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

**Subject-matter excluded from international preliminary examination
(Rule 67.1 (v) PCT)**

Claims 1-10 are directed to a method for the treatment of the human or animal body by therapy and, thus, relates to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated under Section V with respect to industrial applicability of the subject-matter of these claims (Article 34(4)(a)(i) PCT).

Re Item V

Reasoned statement under Rule 66.2(a)(ii) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

- D1: WO 96/21452 A (SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION; ADAMS, JERRY, LEROY; GALLAGHER, TIMOTH) 18 July 1996 (1996-07-18)
- D2: WO 02/072576 A (PFIZER PRODUCTS INC; DOMBROSKI, MARK, ANTHONY; LETAVIC, MICHAEL, ANTHO) 19 September 2002 (2002-09-19)
- D3: US 2003/078432 A1 (LETAVIC MICHAEL A ET AL) 24 April 2003 (2003-04-24)
- D4: WO 02/072579 A (PFIZER PRODUCTS INC; DOMBROSKI, MARK, ANTHONY; DUPLANTIER, ALLEN, JACO) 19 September 2002 (2002-09-19)
- D5: BAEKER R ET AL: "Lipocalin-type prostaglandin D synthase in milk: a new biomarker for bovine mastitis" PROSTAGLANDINS, BUTTERWORTH, STONEHAM, MA, US, vol. 67, no. 1, January 2002 (2002-01), pages 75-88, XP004330580 ISSN: 0090-6980
- D6: TRAKRANRUNGSIE N ET AL: "Expression of INOS and COX-2 proteins during endotoxin-induced mastitis in guinea pigs" FASEB JOURNAL, vol. 11, no. 3, 1997, page A315, XP008044767 & ANNUAL MEETING OF THE PROFESSIONAL RESEARCH SCIENTISTS IN EXPERIMENTAL BIOLOGY 97; NEW ORLEANS, LOUISIANA, USA; APRIL 6-9, 1997 ISSN: 0892-6638

1. Novelty (Article 33(2) PCT)

Note

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/IB2004/004035

Claim 15 when it relates to instructions for use is directed to the mere presentation of information. This feature is not susceptible of industrial application and, therefore, cannot be considered as a technical feature suitable for delimitation from the prior art (Rule 67.1 (iv) PCT).

The subject-matter of present claims 1, 3-7, 10, 11, 14, 15 is not new in the light of D1, D2, D3, D4.

D1 (claim 44 and 46; page 37, line 20 - page 38, line 33; page 41, line 17-27), D2 (claim 1 and 14; page 2, line 8 - page 3, line 5), D3 (claims 1, 55-57; [0005]-[0006]; example 1), D4 (claims 1 and 15; page 2, line 7 - page 3, line 4; example 1) disclose MAPKi#1 and the use thereof for the treatment of inflammatory diseases. The mechanism underlying the therapeutic effect is based on inhibition of COX-2, IL-1, TNF and p38 MAP kinase.

2. Inventive step (Article 33(3) PCT)

2.1. Being not new, the subject-matter of present claims 1, 3-7, 10, 11, 14, 15 cannot be considered as inventive either.

2.2. The subject-matter of independent claims 2, 8, 9, 12, 13 of the present application does not involve an inventive step.

The application on file provides evidence (figures 1-10) showing that p38 MAP kinase inhibitors exert beneficial effects in bacterial mastitis in the cow.

(i) Claims 2, 9, 12, 13 are directed to the treatment of mastitis and problems of milk production associated therewith.

The closest prior art D5 (page 82-86, paragraph entitled "4. Discussion") discloses that TNF, IL-1, COX-2 and MAPK are involved in the pathomechanism of bacterial mastitis.

The objective technical problem to be solved in the light of D5 was to provide a therapy for mastitis.

It was known from D1-D4 that p38 MAP kinase inhibitors are effective in the treatment of inflammatory diseases in general by inhibition of IL-1, TNF and COX-2. Thus, it was obvious to use the compounds of D1-D4 for the treatment of mastitis. No further particular effect related to the selection of the compounds according to formula I-IV, can be derived from the application.

(ii) Claim 8 on file is directed to inflammatory states different from mastitis.

130
Hed

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/IB2004/004035

Thus, the finding that p38 MAP kinase inhibitors are effective in bacterial mastitis has been generalised to further inflammatory diseases, such as obstructive bowel problems etc. In case it was argued that it was not obvious in the light of the known antiinflammatory effect of p38 MAP kinase inhibitors (cf. D1-D4) to use said compounds for the treatment of said diseases, the same argumentation would apply to the question of whether the said generalisation is supported by the application on file (Article 6 PCT) and the conclusion would be negative. Thus, the subject-matter of claim 8 is either not inventive or not supported.

132

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Folio 134

2020
Bogotá D.C.,

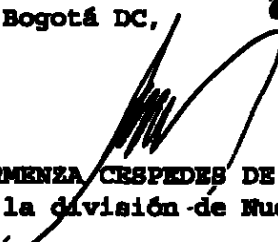
Doctor(a)
OLARTE GARCIA CARLOS REINALDO
Apoderado(a) y/o Representante de
PFIZER PRODUCTS INC

REFERENCIA	Radicación No.	6 56309
	Solicitud internacional	PCT/IB2004/004035
	Fecha inicio fase nacional	18/07/2006
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	416
	Oficio No.	1424
	Folios	1

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, el Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), el Reglamento y la Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial.

Cúmplase
Dado en Bogotá DC,

29 SET. 2006


ALIX CARMONA CRESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

adpall