- - - SuPERNrENDENCADLINDLJSfRAYCOMERCO

P ETITOF IIIIIIIIIIIUhIIIHI1IIiIIiIIIIIIIIIIIII

No. 07-117657- -00000-0000
Fectia: 2007-11-07 1608:13 Dep. 2020 NUECREA
Tw. 11 PATENTEIYU, Eve 378 FASENACON
c thi’uiv CurwrVio Act. 411 FRESEN7ACON Foicts: 290

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL 1)SOLICITUDDE:

Lai Paterite de invención 0 Patente de Modelo de Utilidad

LnJ CapituloI.DCapitulolI.
2) TNombre: 1NTERMUNE, INC. DENTIFICA1ON/
SOLICITANTE

(71) Dirección: 3280 Bayshore C.C. NIT:
Boulevard, Brisbane, California

94005 USA C.E. 0 OTJ 0

Nacionalidad o domicilio: California,

Estados Unidos /Cual
NUMEEb__________
Lugar de constitución: California,
Estados Unidos

TelØfono: Fax:
E. Mail:

3) Nomb re: DILIA IATh RdbUEZ UDENTWICACION

REPRESENTANTE D’ALEMAN Me C.C. LLU NIT: 0 APODERADO
Direcciôn: Carrera 11 N°. 86-53 Pso 6

Bogota D.C. C.E. 0 OTRO 0

TelØfono: 6181088 Fax: 6350824

E. Mail: info(darkemodet.comco NUMERO: 41.654.882

20824 CSJ
4)
INVENTOR (ES) Nombre: 1. BLATT, Lawrence, M.; 2. SEIWERT,Scout, D.; 3.
BEIGELMAN, Leonid; 4. RADHAKRISHNAN, Ramachandran
(72) Dirección: 1. 10 Shoreview, San Francisco, California 94121
USA; 2. 828 Rockaway Beach Avenue, Pacifica, California
94044 USA; 3. 991 E. Grant P1., San Mateo, California 94402
USA; 4. 40623 Palatino Street, Fremont, California 94539 USA
Nacionalidad o Domicilio: Todos los anteriores,
Estadounidenses

5) PCT (86)
Solicitud Internacional No. PCT/US2006/017988 Fecha: Mayo 9, 2006

Publicaciôn Internacional No. W02006/122154 A2 Fecha: Nov 16, 2006 6fltuIo(54)DERIVAD0SDEPlRlDONAPARA MODULAR ELSlSTEME PROTEINA CINASA ACTIVADA PORESTRES

7) Clasificación Internacional: A61 31/44, A61 31/4412, A61 31/4704 A 61P 9100 A61 11/00 A6IP 13/12 A6IP 29/00 A61 43/00

33) Pais de Origen (32)Fecha (31)NUrnero de 8) PRIORIDADSolicitud
EstadosUidos Mayo 10, 2005 60/679,471
SI Lai NO tadosUndosj’1ov. 1. 2005 601732,230
Corn probante de pao N. 07-90,166 de Nov. 2, 2007

Instrucciones Pars el diligenciamiento del eo \ier reversoe esta 1Ij

’ION[
AL!

10) ANEXOS

El Comprobante de pago de la tasa de presentaciOn de la solicitud
O Comprobante de pago par reivindicaciOn de prioridad
El Documento que acredita la existencia y representaciOn legal cuando el solicitante sea persona
Juridica

El Poderes, si fuera el caso
0 Documento de cesión del inventor al solicitante a a su causante
El Declaraciones

El Copia de la solicitud Internacional. (Resumen, descripciOn, reivindicaciOn, Dibujos).
El TraducciOn de la solicitud internacional al castellano (Resumen, descripciOn, reivindicaciOn,
Dibujos)
El Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA
El De ser el caso, copia del contrato de acceso
El De ser el caso, documento que acredite la licencia a autorizaciOn de usa de conocimientos
tradicionales de las comunidades indigenas
El De ser el caso, certificado de depOsito del material biologico
El Arte final l2xl2y6x6cm
El De ser el caso, informaciÆn sabreotras solicitudes de patente a titulos obtenidos en el
extranjero par el mismo titular a su causante, relacionados parcial o totalmente con la invenciOn de esta solicitud.
El Otros:
I Reporte internacional de bisqueda
2. Opinion escrita
3. Solicitud I1131304
4. Mod ificaciOn cambia de agente

11) FIGURA CARACTERISTICA:

- .4 -,------ ---. ...-

21)1 41W 1)20 & 1)) 12 P31) ii011 L

CO1WilwAd

12) Solicitud concesión de la patente,

NOMBRE: DILIA RODFIGUEZ DALEMAN

FIRMA__________ C.C.41.654.88deo99ta..TP 20824 CSJ

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario. Ver reverso de esta pagina

p-1025

SUPERINTENDLNCA DL INDUS MIA Y COMERCID

II1IIIIIIHII1 111111111
No. 07-117657- -00000-0000

chR: 2007-11-0716,081311
I ra L i PATENTEWH Eve, ThEASENACONA 411 PRESENTACION Folios: 299

F1i N) UENT, Hp

Iir,

tfl

- -

5:fl C!Jr- LCEN Y ML rE3

- ==

3

!A1
(12) INTERNATIONAL APPLICATION P1JIIIISFIEI) UNDER l’HE PATENT COOPERATION ’FRJUVIY (PCT)

(19) World intellectual Property Organization
International Bureau 1111111111111111111111111111111111111111111111111111111111111111111111111111111111111111111 IN

(43) International Publication Date PCT (10) International Publication Number

16 November 2006 (16.11.2006) WO 2006/122154 A2

(51) International Patent Classification:
461K 3l/.J (2006.01) 461P 11/00 (2006-0 1)
MIII.31/4412 (2006.01) A61P13/12 (2006.01)
461K 31/4704 (2006.01) 4611’ 29/00 (200601)
461P 9/00(2006.01) A61P 43/00 (2006.01)

(21) international Application Number:
PCTI 1. 152006/0 17988

(22) International Filing Date: 9 May 2006 (09.05.2006

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/679.471 10 May 2005 (10.05.200) US 601732,230 1 November 2005 (01.11.2005) US

(71) Applicant (fir all designated States except US): INTER-MUNE, INC. US/US]; 3280 Bayshore Boulevard, Bris-bane, California 944)05 (US).

(72) inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for (IS on(y): IILATT, Lawrence, M. [US/US]; It) Shoreview, San Francisco, California 94121 (US). SEIWERT, Scott, D. [US/US]; 828 Rock-away Beach Avenue, Pacifica, California 94044 (US). BEECELMAN. Leonid [US/US]; 991 IL Grant P1., San Mateo, California 94402 (US). RADHAKKISHNAN, Rainachandran (US/US I; 40623 Palatino Street, Fre-mont, California 94539 (US).

(74) Agent: MALLON, Joseph; 2040 Main Street, l4th Floor, Irvine, California 92614 (US).

(SI) Deal ’ ed ’tales (unless, tflherwise indicated, jdr every

/).b of no anal protpefirn available): AL, AG, AL AM,

’F. AU AZ, BG, BR,BW, BY, BZ,CA CII, UN, CO,., cj’tz,
0,Q81E, Gil. GM, HR, RU, ID, IL, IN, IS, 111, Ku,

MA,

KM,
MD.

KN,
MG,

KP, KR,
MK.

KZ,
MN,

LC,
MW,

LK.
MX,

LR,
MV.,

LS.
NA,

]T,
NO,

LII,

W,LV, NI,
NO, NV., OM, P0, P11, P1., PT, RI). RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TI, TM, TN, ’FR, IT, TZ, UA, 00, US, LIZ, VU, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated Sbiters (unless olhenvixe indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (13W, tiE, (3M, KU, US. MW, MV., NA, SD, SI., SZ, TV., 00, ZM, ZW), Eurasian (AM. AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TI, TM), European (Al’, BE, HG, (TI, C’s’, CV., UP., DK, Eli, ES, F!, FR, GB, GR, 1113, lii, is, rr, LU, LU. IN, MC, NI.. PL, PT, RO, SI!. SI, SK, TRy ()AI’I (BE, 131, CF CG, CI, CM, GA, GN, CIQ, (3W, ML, MR, NP,, SN, TI), TO).

Published:

without international scare/i report and to he republished upon receipt qt’ that report

For two -letter coder and other abbreviations, refrr to the "Guid-ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-ning ofeach regular issue ofthe PUT Gazette

(54) Title: M’ETl-TOD C)1 MOl)UI,ATINCI STRESS-AC;1IVA1I!D PROTEIN KINASI3 SYSTEM

L
1.41 \
124 \

"-0-- Pit I
 --’--- 5 OH
 , 5COOH
’Jr’ 5 glucuronkfe
 -.-- 30l1
-.--- 4011

--at-- Analog (dinwthyl ether)

.-..----’--’-----------’---------------

- -0.2
0 200 400 600 800 1000 1200 1400 1600 1800 2000

- Compound (pM)

(57) Abstract: Disclosed are methods of modulating a stress activated protein kiriase (SAPK) system with an active compound, wherein the active compound exhibits low potency for inhibition ofat least one p38 MAPK and wherein the contacting is conducted
at a SAPK-rrsodulaling concentration that is at a low percentage ittliilsitoiy coricentratiort for inhibition of the at least one P- MAPK
by the compound. Also disclosed are derivatives of pirienidonc These derivatives can modulate a stress uctivaled protein kirtase (SAPK) system.

4/

WO 2006/122154 PCTIU S2006101 7988

INTMU. 006VPC PATENT METHOD OF MODULATING STRESS-ACTIVATED PROTEIN KINASE
SYSTEM

Cross Reference to Related Appikations
[00011 This application claims the benefit of U.S. Provisional Patent
Application No. 60/679,471 filed on May 10, 2005, and U.S. Provisional Patent Application No. 60/732,230 filed on November 1, 2005, both of which are hereby expressly incorporated by reference in their entirety.
Field ofthe Invention

[00021 This invention relates to compounds and methods useful in treating
various inflammatory conditions and/or fibrotic conditions, including those associated with enhanced activity ofkinase p3 8.
Background ofthe Invention
[0003] A large number of chronic and acute conditions have been recognized
to be associated with perturbation of the inflammatory response. A large number of cytokines participate in this response, including IL-1, IL-6, IL-8 and TNFa. It appears that the activity of these cytokines in the regulation of inflammation may be associated with the activation of an enzyme of the cell signaling pathway, a member of the MAP kinase family generally known as p38 and also known as SAPK, CSBP and RK.
[00041 Several inhibitors of p38, such as NPC 31169, SB239063, SB203580,
FR-167653, and pirfenidone have been tested in vitro and/or in vivo and found to be effective for modulating inflammatory responses.
[00051 There continues to be a need for safe and effective drugs to treat
various inflammatory conditions and/or fibrotic conditions such as inflammatory pulmonary fibrosis and/or idiopathic pulmonary fibrosis.
Summary ofthe Invention
100061 One embodiment of the present invention is a method ofmodulating a
stress activated protein kinase (SAPK) system, including contacting a compound with a p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK), wherein the compound exhibits an EC50 in the range of about 1 iM to about 1000.tM for inhibition of at least one p38 MAPK; and wherein the contacting is conducted at a SAPK-modulating concentration that is less than an EC30 for inhibition ofthe at least one p38 MAPK by the compound.

WO 20061122154 PCT1US20061017988

[09071 Another embodiment ofthe present invention is a method oftreating or
preventing a disease state in a subject, including, identifying a subject at risk for or having a condition selected from an inflammatory condition and a fibrotic condition; administering a compound to the subject in an effective amount to treat or prevent the condition; wherein the compound exhibits an EC50 in the range of about I M to about 1000 jM for inhibition of at least one p38 MAPK; and wherein the effective amount produces a blood or serum or another bodily fluid concentration that is less than an EC30 for inhibition ofthe at least one p38 MAPK.
100081 Another embodiment of the present invention is a method of
identifying a pharmaceutically active compound, including: providing a library of compounds; assaying a plurality of compounds from the library for inhibition of at least one p38 MAPK; and selecting at least one compound from the plurality of compounds, wherein the selected compound exhibits an EC50 in the range of about 1 1iM to about 1000 iM for inhibition ofthe at least one p38 MAPK.
10009] Another embodiment of the present invention is a method of
identifying a pharmaceutically active compound, including: providing a library of compounds; assaying a plurality of compounds from the library for inhibition of TNFa secretion in a bodily fluid in vivo; and selecting at least one compound from the plurality of compounds, wherein the selected compound exhibits an EC50 in the range of about I M to about 1000 iM for inhibition ofTNFc secretion in a bodily fluid in vivo.
[0010] Another embodiment of the present invention is a method of
identifying a pharmaceutically active compound, including: providing a library of compounds; assaying a plurality of compounds from the library for inhibition of TNFc secretion by cultured cells in vitro; and selecting at least one compound from the plurality of compounds, wherein the selected compound exhibits an EC5o in the range of about 1 .tM to about 1000 ILM for inhibition ofTNFct secretion by cultured cell in vitro.
[00111 Another embodiment of the present invention is a method of
identifying a pharmaceutically active compound, including: providing a library of compounds; assaying a plurality of compounds from the library for inhibition of TNFcc secretion in a bodily fluid in vivo; and selecting at least one compound from the plurality of compounds, wherein the selected compound exhibits an EC50 in the range of about I .iM to about 1000 tM for inhibition of TNFo secretion by cultured cells in vitro.

6

WO 2006/122154 PCT/US2006/017988

[0012] Another embodiment of the present invention is a method of
identifying a pharmaceutically active compound, including: providing a library of compounds; assaying a plurality of compounds from the library for inhibition of TNFa secretion by cultured cells in vitro; and selecting at least one compound from the plurality of compounds, wherein the selected compound exhibits an EC50 in the range of about I rM to about 1000 iM for inhibition ofTNFct secretion in a bodily fluid in vivo.
[00131 Another embodiment of the present invention is a compound having
the formula of Subgenus III:

X3Ø

Subgenus 111;
[0014] Wherein X3 is selected from the group consisting of H, F, and OH; and
It2 is selected from the group consisting of H and CF3; and wherein the compound exhibits an EC50 in the range of about I.tM to about 1000 pM for inhibition of p38 MAPK; or a pharmaceutically acceptable salt, ester, solvate or prodrug ofthe compound.
[0015] Another embodiment of the present invention is a compound having
the formula ofGenus VI:

X3kØ
Z R4
Genus VI

[0016] Wherein Ar is pyridinyl or phenyl; Z is 0 or 5; X3 is H, F, Cl, OH, or
OCH3; R2 is methyl, C(’O)H, C(0)CH3, C(=O)Oglucosy1, fluoromethyl, difluoromethyl, trifluoromethyl, methylmethoxyl, methyihydroxyl, or phenyl; and It4 is H or hydroxyl; with the proviso that when R2 is trifluoromethyl, Z is 0, It4 is H and Ar is phenyl, the phenyl is not solely substituted at the 4’ position by H, F, or OH; wherein the compound exhibits an EC50 in the range of about 1 tM to about 1000 jtM for inhibition of p38 MAPK; or a pharmaceutically acceptable salt, ester, solvate or prodrug of the compound.
[0017] Another embodiment of the present invention is a compound having
the formula of Genus VII:

WO 2006/122154 PCT/US2006/01 7988

Genus VII

100181 Wherein X3 is H, halogen, C1-C10 alkoxy, or OH; Y1, Y2, Y3, and Y4
are independently selected from the group consisting of H, C1-C10 alkyl, substituted C1-C10 alkyl, C1-C10 alkenyl, C1-C10 haloalkyl, C1-C10 nitroalkyl, C1 -C10 thioalkyl, C1 -C10 hydroxyalkyl, C1 -C10 alkoxy, phenyl, substituted phenyl, halogen, hydroxyl, C1 -C10 alkoxyalkyl, C1-C10 carboxy, C1-C10 alkoxycarbonyl; R4 is H, halogen, or OH; and wherein the compound exhibits an BC50 in the range of about 1 ç.tM to about 1000 j.tM for inhibition of p38 MAPK; or a pharmaceutically acceptable salt, ester, solvate or prodrug ofthe compound.
[00191 A further embodiment of the present invention is a pharmaceutical
composition containing a compound having a formula as described above and a pharmaceutically acceptable excipient.
[00201 These and other embodiments are described in greater detail below.

Brief Description ofthe Drawings
[00211 Figure 1 is a schematic representation of the p38 MAPK signalling
cascade (prior art, Figure 1 from Underwood et al. 2001 Prog Respir Res 31:342-345). This schematic shows activation of the p38 signaling cascade by a variety of stimuli and the downstream effects of p38 activation on an inflammatory response through transcriptional activation and translation/m1RNA stabilization.
[00221 Figure 2 is a plot showing the fractional inhibition of p38y by various
pirfenidone metabolites and analogs as a function ofthe concentration ofthe compounds. The EC50 concentrations of these compounds are shown to the right of the plot. A detailed description ofthe assay can be found in Example 5.
[0023] Figure 3 is a plot showing the fractional inhibition of p38a by various
pirfenidone metabolites and analogs as a function of the concentration of the compounds.

-4-

WO 2006/122154 PCT/US2006/017988

The EC50 concentrations of these compounds are shown to the right of the plot A detailed description ofthe assay can be found in Example 5.
100241 Figure 4 is a summary of the biochemical data for various pirfenidone
metabolites and analogs. The pirfenidone metabolites and analogs referred to in Figures 2, 3, 5, and 6 are described by the substitution pattern shown in Figure 4. The summary shows the effect of substitutions at three positions on the EC50 concentrations for inhibition of p38u and p38’y.
[0025] Figure 5 is a plot showing the fractional activity (TNFa release from
macrophage in response to LPS) of various pirfenidone metabolites and analogs as a function of the concentration of each compound. A detailed description of the assay can be found in Example 5.
[0026] Figure 6 is a series of bar charts showing the cytotoxicity of various
pirfenidone metabolites and analogs at various concentrations of the compounds. Cytotoxicity was determined by measuring LDH release following incubation of cells in the presence of the compound. The amount of LDH released is normalized to that released upon treatment with Triton-X- 100 and plotted versus compound concentration.

Detailed Description ofthe Preferred Embodiments
[0027] it has now been discovered that a high therapeutic effect in treating
various disorders associated with enhanced activity of kinase p38 may be achieved by using a relatively low-potency p38 kinase inhibitor compound.
[0028] Therefore, in one embodiment there is provided a method of
modulating a stress-activated kinase (SAPK) system by contacting a compound with a p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK). A preferred compound exhibits an EC50 in the range of about 1 jiM to about 1000 j.M, preferably about 50 jM to about 650 jiM for the inhibition of at least one p38 MAPK. The concentration at which the compound is contacted with the p38 MAPK is generally less than EC30 for inhibition ofthe p38 by this compound. Preferably, the concentration is less than EC20, even more preferably, the

concentration is less than EC10.

[0029] "Mitogen-activated protein kinases (MAPKs)" are evolutionarily
conserved serine/threonine kinases involved in the regulation of many cellular events. Several MAPK groups have been identified in mammalian cells, including extracellular signal-regulated kinase (ERK), p38, and SAPK/JNK. It is believed that MAPKs are

-5-

WO 2006/122154 PCT/US2006JOJ 7988

activated by their specific MAPK kinases (MAPKKs): ERK by MEK1 and MEK2, p38 by MKK3 and MKK6, and SAPKIJNK by SEK1 (also known as MKK4) and MKK7 (SEK2). These MAPKKS may also be activated by various MAPKK kinases (MArKKKs) such as Raf, MLK, MEKK1, TAK1, and ASK1.
[00301 It is believed that the MAPK network involves at least twelve cloned
highly conserved, proline-directed serine-threonine kinases which, when activated by cell stresses (oxidative stress, DNA damage, heat or osmotic shock, ultraviolet irradiation, isehemia-reperfusion), exogenous agents (anisornycin, Na arsenite, lipopolysaccharide, LPS) or pro-inflammatory cytokines, TNF-cr and IL-1p, can phosphorylate and activate other kinases or nuclear proteins such as transcription factors in either the cytoplasm or the nucleus (FIG. 1).
p38 MAPK
100311 As used herein, "p38 MAPK" is a member of the stress-activated
protein kinase family, which includes at least 4 isoforms (a, p,y, 8’), several of which are considered important in processes critical to the inflammatory response and tissue remodeling (Lee et al. 2000 Immunoph.arrnacol. 47:185-201). The predominant kinases in monocytes and macrophages, p3 8a and p38(3, appear more widely expressed compared to p3Sy (skeletal muscle) or p383 (testes, pancreas, prostate, small intestine, and in salivary, pituitary and adrenal glands). The p38y isoform is expressed in myofibroblasts, which have some phenotypic similarities to muscle cells including expression of alpha-smooth muscle actin. A number of substrates of p38 MAP kinase have been identified
including other kinases (MAPKAP 1(2/3, PRAK, MNK 1/2, MSKI/RLPK, RSK-B),
transcription factors (ATF2/6, myocyte enhancer factor 2, nuclear transcription factor-(3, CHOP/GADD153, Elki and SAP-W) and cytosolic proteins (stathrnin), many of which
are important physiologically.
[0032] Jiang, Y. et al. 1996 J Biol Chem 271:17920-17926 reported
. characterization of p3 8(3 as a 372-amino acid protein closely related to p38 Both p38cL and p38(3 are activated by proinflammatory cytokines and environmental stress, p38(3 is
preferentially activated by MAP kinase kinase-6 (MKK6) and preferentially
phospohorylate activated transcription factor 2 (ATF2). Kumar, S. et al. 1997 Biochem
Biophys Res Comn 235:533-538 and Stein, B. et al. 1997 JBiol Chein 272:19509-19517
reported a second isoform of p38f3, p-38(32, containing 364 amino acids with 73% identity
to p38a. It is believed that p380 is activated by proInflammatory cytokines and

WO 2006/122154 PCT/US2006/0 17988

environmental stress, although the second reported p38J3 isoform, p38f32, appears to be preferentially expressed in the central nervous system (CNS), heart and skeletal muscle, compared to the more ubiquitous tissue expression of p380. Furthermore, it is believed that activated transcription factor-2 (ATF-2) is a better substrate for p3832 than for p38a.
[0033] The identification of p38y was reported by Li, Z. et al. 1996 Biochem
Biopliys Res Comm 228:334-340 and of p386 by Wang, X. et al. 1997 J Biol Chem 272:23668-23674 and by Kumar, S. et al. 1997 Biochem Biophys Res Comm 235:533-
538. These two p38 isoforms (y and ö) represent a unique subset of the MAPK family based on their tissue expression patterns, substrate utilization, response to direct and indirect stimuli, and susceptibility to kinase inhibitors. Based upon primary sequence conservation, p38a and 13 are closely related, but diverge from ’ and ö, which are more closely related to each other.
[0034) Typically the p38 MAP kinase pathway is directly or Indirectly
activated by cell surface receptors, such as receptor tyrosine kinases, chemokine or G protein-coupled receptors, which have been activated by a specific ligand, e.g,, cytokines, chemokines or lipopolysaceharide (LPS) binding to a cognate receptor. Subsequently, a p38 MAP kinase is activated by phosphorylation on specific threonine and tyrosine residues. After activation, p38 MAP kinase can phosphorylate other intracellular proteins, including protein kinases, and can be translocated to the cell nucleus, where it phosphorylates and activates transcription factors leading to the expression of pro-inflammatory cytokines and other proteins that contribute to the inflammatory response, cell adhesion, and proteolytic degradation. For example, in cells ofmyeloid lineage, such as macrophages and monocytes, both IL-l3 and TNFa are transcribed in response to p38 activation. Subsequent translation and secretion of these and other cytokines initiates a local or systemic inflammatory response in adjacent tissue and through infiltration of leukocytes. While this response is a normal part of physiological responses to cellular stress, acute or chronic cellular stress leads to the excess, unregulated, or excess and unregulated expression of pro-inflammatory cytokines. This, in turn, leads to tissue damage, often resulting in pain and debilitation.
[0035) in alveolar macrophages, inhibition of p38 kinases with p38 inhibitor,
SB203580, reduces cytokine gene products. It Is believed that inflammatory cytokines (TNF-a, IFN-y, IL-4, IL-5) and chemokines (IL-8, RANTES, eotaxin) are capable of regulating or supporting chronic airway inflammation. The production and action of

- 7-

WO 2006/12254 PCT1US20061017988

many ofthe potential mediators of airway inflammation appear to be dependent upon the stress-activated MAP kinase system (SAPK) or p38 kinase cascade (Underwood et al. 2001 Prog Respir Res 31:342-345). Activation of the p38 kinase pathway by numerous environmental stimuli results in the elaboration of recognized inflammatory mediators whose production is considered to be translationally regulated. In addition, a variety of inflammatory mediators activate p38 MAPK which may then activate downstream targets of the MAPK system including other kinases or transcription factors, thus creating the potential for an amplified inflammatory process in the lung.
Downstream substrates of p38 group of MAP kinases
(00361 Protein kinase substrates of 08a or p3J3: MAP kinase-activated
protein kinase 2 (MAPKAPK2 or M2), MAP kinase interaction protein kinase (MNKI),
p38 regulated/activated kinase (PRAK), mitogen- and stress-activated kinase (MSK:
RSK-B or RLPK).
[00371 Transcription factors activated by p38: activating transcription factor
(ATF)-1, 2 and 6, SRF accessory protein I (Sap 1), CHOP (growth arrest and DNA
40 damage inducible gene 153, or GADDI53), p53, C/EBPI3, myocyte enhance factor 2C (MBF2C), MEF2A, MITF1, DDIT3, ELK1, NFAT, and high mobility group-box protein
(HBP 1).
[00381 Other types of substrates for p38: cPLA2, Na/H exchanger isoforni-
1, tau, keratin 8, and stathmin.
[0039]. Genes regulated by the p38 pathway: c-jurL, e-fos, junB, IL-i, TNF, IL-
6, IL-8, MCP-1, VCAM-1, NOS, PPARy, cyclooxygenase (COX)2, collagenase-i (MMP-l), Collagenase-3 (MMP-1 3), HIV-LTR, Fgl.-2, brain natriuretic peptide (BNP), CD23, CCK, phosphoenolpynivate carboxy-kinase-cytosolic, cyclin Dl, LDL receptor (Ono et al. 2000 Cellular Signalling 12:1-13).

Biological consequences of p38 activation
 p38and inflammation
[0040] Acute and chronic inflammation are believed to be central to the
pathogenesis of many diseases such as rheumatoid arthritis, asthma, chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and acute respiratory distress syndrome (ARDS). The activation of the p38 pathway may play an central role in: (1) production of proinflammatory cytokines such as IL-1p, TNF-ct and IL-6; (2) induction of enzymes

-8-

WO 2006/122154 PCT/US2006/017988

such as COX-2, which controls connective tissue remodeling in pathological condition;
(3) expression of an intracellular enzyme such as NOS, which regulates oxidation; (4) induction of adherent proteins such as VCAM-1 and many other inflammatory related molecules. In addition to these, the p38 pathway may play a regulatory role in the proliferation and differentiation of cells of the immune system. p38 may participate in GM-CSF, CSF, FPO, and CD40-induced cell proliferation and/or differentiation.
E00411 The role of the p38 pathway in inflammatory-related diseases was
studied in several animal models, inhibition of p38 by SB203580 reduced mortality in a nnirine model of endotoxin-induced shock and inhibited the development of mouse collagen-induced arthritis and rat adjuvant arthritis. A recent study showed that SB220025, which is a more potent p38 inhibitor, caused a significant dose-dependent decrease in vascular density of the granuloma. These results indicate that p38 or the components ofthe p38 pathway can be a therapeutic target for inflammatory disease. p38 and ipoptosis
[0042) It appears that concomitant activation of p38 and apoptosis is induced
by a variety of agents such as NGF withdrawal and Fas ligation. Cysteine proteases (caspases) are central to the apoptotic pathway and are expressed as inactive zymogens. Caspase inhibitors may then block p38 activation through Fas cross-linking. However, overexpression of dominant active MKK6b can also induce caspase activity and cell death. The role of p38 in apoptosis is cell type- and stimulus-dependent. While p38 signaling has been shown to promote cell death in some cell lines, in different cell lines p38 has been shown to enhance survival, cell growth, and differentiation.
p38 in the cell cycle
[0043] Overexpression of p38u in yeast leads to significant slowing of
proliferation, indicating involvement of p38a in cell growth. A slower proliferation of cultured mammalian cells was observed when the cells were treated with p380J3 inhibitor, SB2035 80.
p38anl çrdiomyocyte hypertrophy
[0044] Activation and function ofp38 in cardiomyocyte hypertrophy has been
studied. During progression of hypertrophy, both p38ct and p3S3 levels were increased and constitutively active MKK3 and M1CK6.elicited hypertrophic responses enhanced by sareomeric organization and elevated atrial natriuretic factor expression. Also, reduced

-9-

WO 2006/122154 PCT/U S2006/OJ 7988

signaling of p38 in the heart promotes myocyte differentiation via a inechanism involving caleineurin-NFAT signaling.
V38 and

[0045] Despite the non-viability of p38 knockout mice, evidence exists
regarding the differential role of p38 in development. p38 has been linked to placental angiogenesis but not cardiovascular development in several studies. Furthermore, p38 has also been linked to erythropoietin expression suggesting a role in erythropoiesis. PRAK has recently been implicated in cell development in murine implantation. PRAK rnRNA, as well as p38 isoforms, were found to be expressed throughout blastocyst development
D38 and cell differentiation

[0046) p38a and/or p3813 were found to play an important role in cell
differentiation for several different cell types. The differentiation of 3T3-Li cells into adipocytes and the differentiation of PC12 cells into neurons both require p3 8a and/or P. The p38 pathway was found to be necessary and sufficient for SKT6 differentiation into hemoglobinized cells as well as C2C1 12 differentiation in myotubules,
08 in senescence and tumor suppression
[0047] p38 has a role in tumorigenesis and senescence. There have been
reports that activation of MKK6 and MKK3 led to a senescent phenotype dependent upon p38 MAPK activity. Also, p38 MAPK activity was shown responsible for senescence in response to telomere shortening, 11202 exposure, and chronic RAS oncogene signaling. A common feature of tumor cells is a loss of senescence and p38 is linked to tumorigenesis in certain cells. It has been reported that p38 activation is reduced in tumors and that loss of components of the p38 pathway such as MKK3 and MKK6 resulted in increased proliferation and likelihood of tumorigenic conversion regardless of the cell line or the tumor induction agent used in these studies.
p38 MAP kinase inhibitors
[0048) A "p38 MAPK inhibitor" is a compound that inhibits the activity of
p38. The inhibitory effects of a compound on the activity of p38 may be measured by various methods well-known to a skilled artisan. For example, the inhibitory effects may be measured by measuring the level of inhibition of lipopolysaccharide (LPS)-stimulated cytokine production (Lee et al. 1988 hit Jlinrnunopharinacol 10:835-843; Lee at al. 1993

- 10- /7

WO 2006/122154 PCTIUS2006/01 7988

Ann NY Acad Sci 696:149-170; Lee et al. 1994 Nature 372:739746; Lee et al. 1999 Pharinacol Ther 82:389-397).
[00491 Efforts to develop p38 MAPK inhibitors have focused on increasing potency. SB203 580 and other 2,4,5-triaryl imidazoles were found to be potent p38 khiase inhibitors with BC50 values in nanomolar range. For example, for SB203580 the BC50 was found to be 48 nM, The pyridinylirnidazoles SK.F 86002 (P1) and SB203582 (P2) shown below have been used as the template for the majority of p38 inhibitors. Recent publications (Lee et al. 2000 Immunopharinacology 47:185-201) have disclosed the p38 inhibitors (P3- P6) shown below. Notable among these inhibitors is the relatively high potency and selectivity described for compound P4 (p38 BC50 = 0.19 nM) and the inhibition ofinflammation driven angiogenesis by SB 220025 (P6).
[00501 Two p38 inhibitors reported to be in clinical development are H11P689
(P7) and VX-745 (P8). VX-745 is reportedly in Phase U trials for rheumatoid arthritis. Potent topical anti-inflammatory activity has been disclosed for HRP689, which has reportedly entered clinical development to explore its potential as a topical agent for the treatment ofpsoriasis and other skin disorders.

P1 SK&F 86002

P4

P2XN; SB 203580
P3 X = CH; L-167307

PS RWJ 68354

- 11-

WO 2006/122154 PCT/US2006/01 7988

F

NN

NY c1 C1 T 6-- 1

H

P6 X = H, Y CH; HEP 689 (SB 235699) P8 VX-745
P7 X = HN2, Y = N; SB 220025

[00511 Further discussion of various p38 inhibitors can be found in Boehm et
al. 2000 Exp Opin Ther Pat 10:25-37; and Salituro et al. 1999 Curr Med Chem 6:807-

823.

. [0052] Preferred p38 inhibitors described herein are pirfenidone derivatives
and analogs that exhibit relatively low potency of p38 inhibition while, surprisingly, still
having a relatively high therapeutic effect (e.g., for modulating an SAPK system) as a
result of such inhibition. Preferably, the p38 inhibitors of the embodiments exhibit EC50
in the range of about 1 pM and about 1000.tM, preferably about 50 jiM to about 650 pM
for the inhibition ofthe p38 MAPK.

PIRFENIDONE DERIVATIVES AND ANALOGS

[0053] Pirfenidone (5-methyl-i -phenyl-2-(1H)-pyridone) itself is a known
compound and its pharmacological effects are disclosed, for example, in Japanese Patent Application KOKAT (Laid-Open) Nos. 87677/1974 and 1284338/1976. U.S. Pat. No. 3,839,346, issued Oct. 1, 1974; U.S. Pat. No. 3,974,281, issued Aug. 10, 1976; U.S. Pat. No. 4,042,699, issued Aug. 16, 1977; and U.S. Pat, No. 4,052,509, issued Oct. 4, 1977, all of which are hereby incorporated by reference in their entireties, describe methods of manufacture of 5-methyl-1-phenyl-2-(1H)-pyridone and its use as an anti-inflammatory agent.
[9054] Pirfenidone and derivatives thereof are useful compounds for
modulating a stress activated protein kinase (SAPK) system.

- 12-

WO 20061122154 PCT/US2006/01 7988

[00551 The term "alkyl" used herein refers to a monovalent straight or
branched chain radical of from one to ten carbon atoms, including, but not limited to, methyl, ethyl, m.propyl, isopropyl, n-butyl, isobutyl, tert-butyl, n-hexyl, and the like.
[0056] The term "alkenyl" used herein refers to a monovalent straight or
branched chain radical of from two to ten carbon atoms containing a carbon double bond including, but not limited to, 1-propenyl, 2-propenyl, 2-methyl-1-propenyi, 1-butenyl, 2-butenyl, and the like.
(0057) The term "halogen" used herein refers to fluorine, chlorine, bromine,
or iodine.

[0058] The term "haioalkyl" used herein refers to one or more halogen groups
appended to an alkyl radical.
[00591 The term "nitroalkyl" used herein refers to one or more nitro groups
appended to an alkyl radical.
[0060] The term "thioalkyl" used herein refers to one or more thio groups
appended to an alkyl radical.
[0061) The term "hydroxyalkyl" used herein refers to one or more hydroxy
groups appended to an alkyl radical.
[0062] The term "alkoxy" used herein refers to straight or branched chain
alkyl radical covalently bonded to the parent molecule through an --0-- linkage. Examples of ailcoxy groups include, but are limited to, niethoxy, etboxy, propoxy, isopropoxy, butoxy, n-butoxy, sec-butoxy, t-butoxy and the like.
[0063] The term "alkoxyalkyl" used herein refers to one or more alkoxy
groups appended to an alkyl radical.
[0064) The term "carboxy" used herein refers to COON optionally
appended to an alkyl group. Examples of earboxy groups include, but are not limited to, - COOH, -CH2COOH, CH2CH2CO0H, -CH(CO0H)(CH3), and the like.
[0065] The term "alkoxycarbonyl" refers to ---(CO)-----0-alkyl. Examples of
alkoxycarbonyl groups include, but are limited to, methoxycarbonyl group, ethoxycarbonyl group, propoxycarbonyl group, and the like.
[0066] Carbohydrates are polyhydroxy aldehydes or ketones, or substances
that yield such compounds upon hydrolysis. Carbohydrates comprise the elements carbon (C), hydrogen (H) and oxygen (0) with a ratio of hydrogen twice that of carbon and oxygen.

- 13-

W() 2006/122154 .PCT/US2006/017988

[0067] in their basic form, carbohydrates are simple sugars or
monosaccharides. These simple sugars can combine with each other to form more complex carbohydrates. The combination of two simple sugars is a disaccharide. Carbohydrates consisting of two to ten simple sugars are called oligosaceharides, and those with a larger number are called polysaccharides.
100681 The term "uronide" refers to a monosaccharide having a carboxyl
group (-COOH) on the carbon that is not part of the ring. The uronide name retains the root of the monosaccharide, but the -ose sugar suffix is changed to -uronide. For example, the structure of glucuronide corresponds to glucose.
100691 As used herein, a radical indicates species with a single, unpaired
electron such that the species containing the radical can be covalently bonded to another
species. Hence, in this context, a radical is not necessarily a free radical. Rather, a
radical indicates a specific portion of a larger molecule. The term "radical" can be used
interchangeably with the term "group."
[0070] As used herein, a substituted group is derived from the unsubstituted
40 parent structure in which there has been an exchange of one or more hydrogen atoms for another atom or group. When substituted, the substituent group(s) is (are) one or more
group(s) individually and independently selected from C1-C10 alkyl, C1-C10 cycloalkyl,
aryl, fused aryl, heterocyclyl, heteroary!, hydroxy, C1 -C10 alkoxy, aryloxy, mercapto, Ci-
C10 alkylthio, arylthio, cyano, halogen, carbonyl, thiocarbonyl, C1-C10 alkoxycarbonyl,
nitro, silyl, tribalometbanesulfonyl, trifluoromethyl, and amino, including mono- and
di-substituted amino groups, and the protected derivatives thereof. The protecting groups that can form the protective derivatives of the above substituents are known to those of skill in the art and can be found in references such as Greene and Wuts Protective Groups in Organic Synthesis; John Wiley and Sons: New York, 1999. Wherever a substituent is described as "optionally substituted" that substituent can be substituted with the above substituents.

[0071] The term "purified" refers to a compound which has been separated
from other compounds such that it comprises at least 95% of the measured substance when assayed.
[0072] Asymmetric carbon atoms may be present in the compounds described
herein. All such isomers, including diastereoniers and enantiomers, as well as the mixtures thereof are intended to be included in the scope of the recited compound. In certain cases, compounds can exist in tautomeric forms. All tautomeric forms are

- 14-

WO 2006/122154 PCT/US2006/01 7988)

I

intended to be included in the scope of the recited compound. Likewise, when
compounds contain an alkenyl or alkenylene group, there exists the possibility of cis- and
thins- isomeric forms of the compounds. Both cis- and trans- isomers, as well as the
mixtures of cis- and trans- isomers, are contemplated. Thus, reference herein to a
compound includes all of the aforementioned isomeric forms unless the context clearly

dictates otherwise.

[0073] Various forms are included in the embodiments, including polymorphs,
solvates, hydrates, conformers, salts, and prodrug derivatives. A polymorpb is a composition having the same chemical formula, but a different structure. A solvate is a composition formed by solvation (the combination of solvent molecules with molecules or ions of the solute). A hydrate is a compound formed by an incorporation of water. A conformer is a structure that is a conformational isomer. Conformational isomerism is the phenomenon of molecules with the same structural formula but different conformations (conformers) of atoms about a rotating bond. Salts of compounds can be prepared by methods known to those skilled in the art. For example, salts of compounds can be prepared by reacting the appropriate base or acid with a stoichiometric equivalent of the compound. A prodrug is a compound that undergoes biotransformation (chemical conversion) before exhibiting its pharmacological effects. For example, a prodrug can thus be viewed as a drug containing specialized protective groups used in a transient manner to alter or to eliminate undesirable properties in the parent molecule. Thus, reference herein to a compound includes all of the aforementioned forms unless the context clearly dictates otherwise.
[0074) The compounds described below are useful in the methods described
herein. In an embodiment, a compound as described below exhibits an BC50 in the range of about 1 IiM to about 1000 tiM for inhibition ofp38 MAPK.
[0075) An embodiment provides a family of compounds represented by the
following genus (Genus Ia):

X4 X5 R, R2

X3*NR3
X2 X10 R

[0076] wherein

Genus Ia;

- 15-

WO 2006/122154 PCT/US2006/017988

[0077] Ri, R2, R3, and R4 are independently selected from the group consisting
of I-I, C1-C10 alkyl, substituted C1 -C10 alkyl, C1 -C10 alkenyl, C1-C10 haloalkyl, C1 -C10 nitroalkyl, C1 -C10 thioalkyl, Ci-Cio hydroxyalkyl, CI-CIO alkoxy, phenyl, substituted phenyl, halogen, hydroxyl, CI -CIO allcoxyalkyl, C1-C10 carboxy, C1 -C10 alkoxycarbonyl, CO-uronide, CO-monosaccharide, CO-oligosaccharide, and CO-polysaccharide; and
[0078] X1, X2, X3, X4, and X5 are independently selected from the group
consisting of H, halogen, alkoxy, and hydroxy.
[0079] Another embodiment provides a family of compounds represented by
the following genus (Genus lb):

X3&N

0

0/

R4

Genus Tb;
. 10080.1 wherein
100811 X3 is selected from the group consisting of H, halogen, C1 -C10 alkoxy,
and OH;
[00821 R2 is selected from the group consisting of H, halogen, C1-C10 alkyl,
substituted C1-C10 alkyl, C1 -C10 hydroxyalkyl, CI-Cio alkoxyalkyl, C1 -C10 carboxy, Cp-C10 alkoxycarbonyl, CO-uronide, CO-monosaccharide, CO-oligosacoharide, and CO-polysaccharide; and
[0083] R4 is selected from the group consisting ofH, halogen, and OR
[0084) Another embodiment provides a family of compounds represented by
the following genus (Genus Ic):

R2

. 0/
Genus Ic;
[00851 wherein
[0086] X3 is selected from the group consisting of H, F, OH, and 0OH3;
100871 R2 is selected from the group consisting of H, CE3, CHF2, CH2F,
CH20H, COOH, CO-Glucoronide, Br, CH3, and CH20CH3; and

- 16 2140

WO 20061.122154 PC.t’/US2006101 7988

[0088] R4 is selected frorn the group consisting of H and OH,-
[00891 with the proviso that when 1t and X3 are H, R2 is notH;[00891 CH3.
[0090) Another embodiment provides a family of compounds represented by
the following subgenus (Subgenus II):

X30N
0

0/

R4

Subgenus II;
[0091) wherein
[00921 X3 is selected from the group consisting of H, OH, and OCH3;
[0093] R2 is selected from the group consisting of H, CH20H, COOH, CO
Glucoronide, Br, CH3, and CH2OCH3; and
(0094] 1(4 is selected from the group consisting of H and OH, with the proviso
. that when X3 is OH then R2 is not CH3.

[0095] Another embodiment provides a family of compounds represented by
the following subgenus (Subgenus Ill):

X3Ø

Subgenus III;
[0096] wherein
[0097) X3 is selected from the group consisting of H, F, and OH; and
[0098] 1(2 is selected from the group consisting of H, Br, CH217, CHF2, and

CF3.

[0099] Another embodiment provides a family of compounds represented by
the following subgenus (Subgenus IV):

xaCJ9

Subgenus IV;

- 17-

2/

WO 20061122153 PCTIUS2006I0I 7988

101001 wherein X3 is selected from the group consisting ofI-I, halogen, CI -CIO
alkoxy, OH, C -CIO alkyl, substituted C1-C10 alkyl, C1 -C10 alkenyl, C1-C10 haloalkyl, C1-C10 nitroalkyl, C1-C10 thioalkyl, C -C10 hydroxyalkyl, phenyl, substituted phenyl, C1 -C10 alkoxyalkyl, C1-C10 carboxy, CI-C10 Ælkoxycarbonyl, CO-uronide, CO-monosaccharide, CO-oligosaccharide, and CO-polysaccharide.
[01011 Another embodiment provides a family of compounds represented by
the following subgenus (Subgenus V):

CF3
XsØ

Subgenus V;
[01021 wherein X3 is selected from the group consisting of H, halogen, C1 -C10
aikoxy, C1_C10 alkyl, substituted C1 -C10 alkyl, CiC10 alkenyl, C1 -C10 haloalkyl, C1 -C10
nitroalkyl, CI -CIO thioalkyl, C1-C10 hydroxyalkyl, phenyl, substituted phenyl, C1 -C10

W alkoxyalkyl, C1-00 carboxy, C1-C10 alkoxycarbonyl, CO-uronide, CO-monosaccharide, CO-oligosaccharide, and CO-polysaccharide.
101031 Another embodiment provides a family of compounds represented by
the following genus (Genus VT):

X3ArN0/
Z R4
Genus VI
[0104] wherein
[0105] Ar is pyridinyl or phenyl;
[0106] ZisOorS;
[0107] X3 is H, F, Cl, OH, CH3, or OCH3;
[0108] R2 is methyl, C(0)FI, C(0)CH3, C(=O)OCH3, C(=O)O-glucosyl,
fluoromethyl, difluoromethyl, trifluoromethyl, bromo, methylmethoxyl, methyihydroxyl, or phenyl; and
[0109] R1 is H or hydroxyl;
101101 with the proviso that when R2 is trifluorornethyl, Z is 0, R4 is H and Ar
is phenyl, the phenyl is not solely substituted at the 4’ position by H, F, or OH.

WO 2006I22154

- L?

PCT/US2006101 7988

101111 The Genus VI includes the families of compounds represented by the
Subgenus VIa and the Subgenus VIb:

R2 R2

X3& ND/ N
011/
R4 Z R4
Subgenus VIa Subgenus VIb
[01121 wherein Z. X3, R2 and R4 are defined as in Genus VI. It will be
recognized that the phenyl ring in the structure represented by Subgenus VIa is substituted by X3 at the 4’ position.
[01131 Another embodiment provides a family of compounds represented by
the following genus (Genus VII):

91

914

Genus VU

4

[01141 wherein
[0115] X3 is selected from the group consisting of H, halogen, C1-C10 alkoxy,
and OH;
101161 Y1, Y2, Y3, and Y4 are independently selected from the group
consisting of H, C1C10 alkyl, substituted C1 -C10 alkyl, C1 -C10 alkenyl, C1 -C10 haloalkyl, C1-C10 nitroalkyl, C1-00 thioalkyl, C1-C10 hydroxyalkyl, C1 -C10 alkoxy, phenyl, substituted phenyl, halogen, hydroxyl, C1-00 alkoxyalkyl, C1-00 carboxy, C1 -C10 alkoxycarbonyl; and
[0117] R4 is selected from the group consisting of H, halogen, and OR
[0118) It will be recognized that a particular compound described herein may
be a member of more than one of the various genera described above. The compounds described herein are useful for modulating a stress activated protein kinase (SAPK) system. Exemplary compounds of Genera Ia-c, Subgenera Il-V and Genera VI and VII that are useful for modulating a stress activated protein kinase (SAPK) system are set

WO 20061122154 PCTIUS2006I017988

[J

[0119] Another embodiment is directed to purified compounds represented by Genera la-c, Subgenera Il-V and/or Genera VI and VII. The degree of purity may be expressed as a percentage as described above. In preferred embodiments, purified compounds represented by Genera la-c, Subgenera 11-V and/or Genera VI and VII have a purity of about 96% or greater, more preferably about 98% or greater, by weight based on total weight of the composition that comprises the purified compound. For example, an embodiment provides purified Compound 3 (Table 1).
E0:1201 Compounds of Genera la-c, Subgenera TI-V and/or Genera VI and VII
can be synthesized by using various reactions. Examples of syntheses include the following, designated Synthetic Schemes 1, 2, and 3.

-25-

WO 2006/122154 PCT/US2006101 7988

Synthetic Scheme 1

A

K2CO3/DMF/ temp

XI 2= X X4 = L-I, alkyl, alkenyl, iiitroalkyL thioalkyl, phenyl, substituted phenyl, C142Phe,
halogen, hydroxy, alkoxy, haloalkyl
R1=R2=R3R4=’R5=H, alkyl, alkenyl, ntroa1lcyl, thioalkyl, phenyl, substituted phenyl, CH2Phe, halogen, hydroxy, alkoxy, haloalkyl
R1

B

X, x2

HNO/X3

0 X4 Cu (OAc)2 /Oxidant (TEMPO, PyridincN-oxide,02)/basc(Py, TEA)/(
I 4A molecular sieves)

x3

X3

- 26-

W() 2006/122154 PCT/US20061017988

Synthetic Scheme 2

X__cf_R2
XBr, I N 0

N 0
H

Cut, K7CO

[0121) Ullmann reaction: Chcm.Pharm.Bul]. 45(4) 719-721. Target N-aryl-
pyridine-2-ones were obtained via arylation of 2-hydroxypyridines. The Ullmann reaction is useful in the preparation of disclosed compounds, except the 5-bromo analogs and compound 33 which are afforded, for example, by synthetic scheme 3.
[0122) A mixture of 2-hydroxypyridine (1 mmol), aryl iodide or bromide (2
mmol), Cul (0.1-0.5 mmol) and anhydrous potassium carbonate (1 mmol) in DMF (3 ml) was stirred overnight at 135°C under argon atmosphere. Deep colored reaction mixture was taken into ethyl acetate and 10% ammonium hydroxide. Organic layer was washed with brine and dried over magnesium sulfate. Column chromatography furnished target compounds as off-white solids in 25-60% yield.

Synthetic Scheme 3

HO ’-’ R1

RI Hd - N 0
ç L0 Cu(OAc)2, 02, PY

R2

[0123) Target N-aryl-2-pyridones may be obtained via arylation of 2-
bydroxypyridines with alkylboronic acids (Tetrahedron Lett. 42 (2001) 3415-3418). The akylboronic acid route is useful in the preparation of disclosed compounds. A mixture of 2-hydroxypyridine (5 mmol), aryihoronic acid (10 mmol), cupper(II) acetate (0.5-1 mmol), pyridine (10 mmol) and molecular sieves 4A (0.5-1 g) in dichloromethane (25 nil)
was stirred for 24-48 hours at room temperature opened to the air. Reaction mixture was washed with saturated sodium bicarbonate with EDTA and organic phase was dried over sodium sulfate. Target N-aryl-2-pyridones were isolated by column chromatography as white solids in 85-100% yield.

-27- 31

WO 2006/122154 PCT[US2006/017988

[0124] As pirfenidone derivatives, compounds of Genera la-c, Subgenera 11-V
and/or Genera VI and VII may also be synthesized by any conventional reactions known in the art based on the known synthetic schemes for pirfenidone, such as disclosed in U.S. Patent Nos. 3,839,346; 3,974,281; 4,042,699; and 4,052,509, all of which are hereby expressly incorporated by reference in their entirety.
[01251 Starting materials described herein are available commercially, are
known, or can be prepared by methods known in the art. Additionally, starting materials not described herein are available commercially, are known, or can be prepared by

methods known in the art.

[0126] Starting materials can have the appropriate substituents to ultimately
give desired products with the corresponding substituents. Alternatively, substituents can be added at any point of synthesis to ultimately give desired products with the corresponding substituents.
[01271 Synthetic Schemes 1-3 show methods that can be used to prepare
compounds of Genera Ia-c, Subgenera 11-V and/or Genera VI and VII. One skilled in the art will appreciate that a number of different synthetic reaction schemes can be used to synthesize the compounds of Genera la-c, Subgenera IT-V and/or Genera VI and VII. Further, one skilled in the art will understand that a number of different solvents, coupling agents, and reaction conditions can be used in the syntheses reactions to yield comparable

results.

101281 One skilled in the art will appreciate variations in the sequence and,
further, will recognize variations in the appropriate reaction conditions from the analogous reactions shown or otherwise known which may be appropriately used in the processes above to make the compounds of Genera Ia-c, Subgenera U-V and/or Genera

VI and VII.

[0129] In the processes described herein for the preparation of the compounds
of compounds of Genera Ia-c, Subgenera 11-V and/or Genera VI and VII, the use of protective groups is generally well recognized by one skilled in the art of organic chemistry, and accordingly the use of appropriate protecting groups may be implied by the processes of the schemes herein, although such groups may not be expressly illustrated. Introduction and removal of such suitable protecting groups are well known in the art of organic chemistry; see for example, T.W. Greene, "Protective Groups in Organic Synthesis", Wiley (Mew York), 1999. The products of the reactions

-28-

WO 2006/122154 PCT/US2006/017988

described herein may be isolated by conventional means such as extraction, distillation, chromatography, and the like.
[01301 The salts, e.g., pharmaceutically acceptable salts, of the compounds of Genera la-c, Subgenera Il-V and/or Genera VI and VII may he prepared by reacting the appropriate base or acid with a stoichiometric equivalent of the compounds. Similarly, pharmaceutically acceptable derivatives (e.g., esters), metabolites, hydrates, solvates and prodrugs of the compounds of Genera Ia-c, Subgenera IIV and/or Genera VI and VII may be prepared by methods generally known to those skilled in the art. Thus, another embodiment provides compounds that are prodrugs of an active compound. In general, a prodrug is a compound which is metabolized in vivo (e.g., by a metabolic transformation such as deamination, dealkylation, de-esterification, and the like) to provide an active compound. A "pharmaceutically acceptable prodrug" means a compound which is, within the scope of sound medical judgment, suitable for pharmaceutical use in a patient without undue toxicity, irritation, allergic response, and the like, and effective for the intended use, including a pharmaceutically acceptable ester as well as a zwitterionic form, where possible, of the compounds of the embodiments. Examples of pharmaceutically-acceptable prodrug types are described in T. Higuchi and V. Stella, Pro-drugs as Novel Delivery Systems, Vol. 14 ofthe A.C.S. Symposium Series, and in Edward B. Roche, ed., Bioreversible Carriers in Drug Design, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987, both of which are hereby expressly incorporated by reference in their entirety.
[01311 The compounds and compositions described herein may also include metabolites. As used herein, the term "metabolite" means a product of metabolism of a compound of the embodiments or a pharmaceutically acceptable salt, analog, or derivative thereof, that exhibits a similar activity in vitro or in vivo to a compound of the embodiments. The compounds and compositions described herein may also include hydrates and solvates. As used herein, the term "solvate refers to a complex formed by a solute (herein, a compound of Genera la-c, Subgenera Il-V and/or Genera VI and VII) and a solvent. Such solvents for the purpose of the embodiments preferably should not interfere with the biological activity of the solute. Solvents may be, by way of example, water, ethanol, or acetic acid. In view of the foregoing, reference herein to a particular compound or genus of compounds will be understood to include the various forms described above, including pharmaceutically acceptable salts, esters, prodrugs, metabolites and solvates thereof unless stated otherwise.

-29-

WO 2006/122.154 PCT/US2006/0i 7988

Methods of inhibiting p38 MAP kinase
[0132] In an embodiment, methods are provided for modulating a SAPK
system, in vitro or in viva. The methods include contacting a SAPK-modulating concentration of a compound with at least one p38 MAPK (e.g., by contacting the compound with a cell or tissue containing at least one p38 MAPK), where the compound has a relatively low potency for inhibition of the at least one p38 MAPK, corresponding to a relatively high inhibitory concentration for inhibition of the at least one p38 MAPK by the compound.
[01331 "Contacting a cell" refers to a condition in which a compound or other
composition of matter is in direct contact with a cell or tissue, or is close enough to induce a desired biological effect in a cell or tissue. For example, contacting a cell or tissue containing p38 MAPK with a compound may be conducted in any manner that permits an interaction between p38 MAPK and the compound, resulting in the desired biological effect in a cell. Contacting a cell or tissue may be accomplished, for example, by intermixing or administration of a compound (such as a compound of Genera Ia-c, Subgenera 11-V and/or Genera VI and VII and/or a salt, ester, prodrug and/or intermediate thereof, and/or a pharmaceutical composition comprising one or more ofthe foregoing).
[0134] Alternatively, contacting a cell or tissue may be accomplished by
introducing a compound in a manner such that the compound will be targeted, directly or indirectly, to a cell or tissue containing p38 MAPK. Contacting a cell or tissue may be accomplished under conditions such that a compound binds to at least one p38 MAPK. Such conditions may include proximity of the compound and p38-containing cell or tissue, pH, temperature, or any condition that affects the binding of a compound to p38 MAPK.

[01351 In certain embodiments, the cell is contacted with the compound in
vitro; in other embodiments, the cell is contacted with the compound
[01361 When the cell is contacted the effective concentration (BC) of
a compound is a concentration that results in a reduction of a specified endpoint by a
target percentage (e.g., 50%, 40%, 30%, 20%, 10%) relative to the maximal observable reduction of the specified endpoint by that compound. Such an endpoint may be a physiological response, for example, reduction in blood or other bodily fluid concentration of TNFa. For example, BC50, EC40, BC30, EC20 and BC10 are determined as

-30 3 9

WO 2006/122154 PCT/US2006/0 17988

concentrations that result in reductions in the serum TNFa concentration by 50%, 40%, 30%, 20% and 10%, respectively, relative to the maximal observable reduction on a dose -

response curve.

[0137] When the cell is contacted in vitro, except in a cell-based assay, the
effective concentration (BC) is a concentration that results in a reduction in the activity of the specified target by a given percentage (e.g., 50%, 40%, 30%, 20%, 10%). For example, BC50, BC40, BC30, BC20 and BC10 are determined as concentrations that result in reductions in the activity of the specified target by 50%, 40%, 30%, 201/o and 10%, respectively, on a dose-response curve. When complete inhibition of a specified target is not obtained, the effective concentration (BC) of a compound is a concentration that results in a reduction of a target activity by a given percentage (e.g., 50%, 40%, 30%, 20%, 10%) relative to the maximal reduction ofthe target activity by that compound.
101381 When the cell is contacted in vitro, in a cell-based assay, the effective
concentration (BC) of a compound is a concentration that results in a reduction of a specified endpoint by a target percentage (e.g., 50%, 40%, 30%, 20%, 10%) relative to the maximal observable reduction of the specified endpoint by that compound. Such an endpoint may be a cellular response, for example, reduction in the secretion of TNFa. as determined by the TNF(x concentration in cell medium. For example, BC50, BC40, BC30, BC20 and BC10 are determined as concentrations that result in reductions in the TNFct concentration by 50%, 40%, 30%, 20% and 10%, respectively, relative to the maximal observable reduction on a dose-response curve.
[01391 The EC50 of the SAPK system-modulating compound is preferably in
the range of about 1 M to about 1000 jiM, more preferably about 50 j.iM to about 650
iM for inhibition of at least one p38 MAPK. Thus, for example, modulation of the
SAPK system may involve contacting a compound (e.g., a compound of Genera la-c,
Subgenera TI-V and/or Genera VI and VII) with at least one p38 MAPK at a
. concentration that is less than an BC40, preferably less than BC30, more preferably less than BC20, even preferably less than BC10 for inhibition ofthe at least one p38 MAPK by
the compound as determined on a dose-response curve in vivo.
[01401 In certain embodiments, the compound is provided in the form of a
pharmaceutical composition, together with a pharmaceutically acceptable carrier.

-31- .

WO 2006/122154 PCT/1JS2006101 7988

Screening a library of compounds for low-potency p38 inhibitors
[01411 In another aspect, a method is provided for identifying a
pharmaceutically active compound, e.g., for determining whether a compound is potentially useful as a therapeutic agent, e.g., for the prevention or treatment of an inflammatory condition (such as p38- or cytokirie-associated condition). The method includes assaying a plurality of compounds for inhibition of at least one p38 MAPK and selecting a compound which exhibits a relatively low potency for inhibiting p38 MAPK. Preferably, an EC50 of such a low-potency p38 inhibitor compound is in the range of about I IiM to about 1000 jiM, preferably about 50 jiM to about 650 jiM for inhibition of the at least one p38 MAPK. The plurality of compounds to be assayed is preferably selected from a library of potential compounds. The assaying of the plurality of compounds from the library may be conducted in various ways. For example, in some embodiments, the methods further comprise contacting at least one p38 MAPK with the plurality of compounds, and determining whether the compounds inhibit the activity of cytokines. A p38 MAPK is preferably selected from the group consisting of p38ct, p38, p38y, and p385. In preferred embodiments, the contacting step takes place in vitro; in certain preferred embodiments, the contacting step comprises contacting a cell comprising p38 MAPK with the compound.
[0142] In yet another embodiment, methods are provided for inhibiting the
activity of p38 MAPK in a cell, in vitro or in vivo. In general, such methods include contacting a cell containing at least one p38 MAPK with an effective p38-inhibiting
amount of a compound (e.g, a compound of Genera la-c, Subgenera 11-V and/or Genera
VI and VII), under conditions such that p38 activity in the cell is inhibited Examples of
such methods are provided in the EXAMPLES section below. The compound preferably
exhibits an EC50 in the range of about I jiM to about 1000 jiM, preferably about 50 pM to
about 650 jiM for inhibition ofthe at least one p38 MAPK. The contacting of at least one

40 p38 MAPK with the compound is preferably conducted at a SAPK system-modulating
concentration that is less than EC30, preferably less than EC20, more preferably less than
EC10 for inhibition ofthe at least one p38 MAPK by the compound.
[01431 In vivo methods include for example, introducing into a group of
animals orally or by injection a compound of interest (e.g., a compound of Genera la-c,
Subgenera Il-V and/or Genera VI and VII) in various concentrations. Following the

-32-

WO 2006/122154 pCT1uS2006101 7988

introduction of the compound, lipopolysaccharide is administered intravenously. Serum TNFa levels are measured and compared to that from control animals. The preferred compounds inhibit the release of TNFcL, thus reducing TNF. levels in the blood samples ofthe tested animals. The compound preferably exhibits an BC50 in the range of about 1 tM to about 1000.tM, preferably about 50.tM to about 650 RM for inhibition of the release of TNFa.

[0144] The method of identifying a pharmaceutically active compound may further include determining a mammalian toxicity of the selected compound. Such methods are generally known to those skilled in the art. The method of identifying a pharmaceutically active compound may also include administering the selected compound to a test subject, either in conjunction with the determination of mammalian toxicity or for other reasons. In an embodiment, the test subject test subject has or is at risk for having an inflammatory condition. Preferably the test subject is a mammal, and may be a human.

Methods of treatment and/or prevention
[01451 Another embodiment provides methods for treating or preventing disease states, e.g., inflammatory condition(s) and/or fibrotic condition(s). The methods include identifying a subject at risk for or having at least one condition selected from an inflammatory condition and a fibrotic condition and administering a compound to the subject in an effective amount to treat or prevent the inflammatory condition and/or fibrotic condition. In preferred embodiments, the compound exhibits an EC50 in the range of about 1.LM to about 1000 iM, preferably about 50 iM to about 650 AM for inhibition of at least one p38 MAPK. In preferred embodiments, the effective amount produces a blood or serum or another bodily fluid concentration that is less than an BC30 or, preferably, an EC20 or, more preferably, an BC10 for inhibition of p38 MAPK by the compound. In preferred embodiments, the compound exhibits an BC50 in the range of about 1 jiM to about 1000 jiM, preferably about 50 jiM to about 650 p.M for inhibition of
the TNFc secretion. In other preferred embodiments, the effective amount produces a blood or serum or another bodily fluid concentration that is less than an BC30 or, preferably, an BC20 or, more preferably, an BC15 or, more preferably, an BC10 for inhibition of LPS-stimulated TNFoc release in a bodily fluid by the compound. The

33 2?

WO 2006/122154 PCT1US20061017988

effective amount is preferably about 70% or less, more preferably less than about 50%, of an amount that causes an undesirable side effect in the subj ect, such as, but not limited to, drowsiness, nausea, cold symptom, gastrointestinal upset, and photosensitivity rash. The compound used for the treatment or prevention is preferably a compound of Genera Iac, Subgenera IT-V and/or Genera VI and VII.
[0146] Methods for identifying a subject at risk for or having an inflammatory
condition are known to those skilled in the art. Examples ofinflammatory conditions that may be treated or prevented by the methods described herein include p-38 associated conditions, e.g., conditions associated with altered cytokine activity, conditions associated with modulation of an SAPK system, autoimmune diseases, and diseases associated with acute and chronic inflammation. The cytokine (or cytokines) is (are) preferably selected from the group consisting of, but not limited to, IL-l3, IL-6, IL-8, and TNFcL. In an embodiment, the compound used to treat or prevent the inflammatory condition is compound that inhibits a kinase in the SAPK signaling pathway. Examples of preferred compounds include compound ofGenera Ia-c, Subgenera TI-V and/or Genera VI and VII.
[0147] The term "p38-associated condition" means a disease or other
deleterious condition in which the p38 MAP kinase signaling pathway is implicated, whether directly or indirectly. Examples of p38-associated conditions include conditions caused by IL-1p, TNFc, IL-6 or IL-8 dysregulation or overexpression resulting from sustained, prolonged, enhanced or elevated levels of p38 activity. Such conditions include, without limitation, inflammatory diseases, autoimmune diseases, fibrotic diseases, destructive bone disorders, proliferative disorders, infectious diseases, neurodegenerative diseases, allergies, reperfiision isohemia in stroke, heart attacks, angiogenic disorders, organ hypoxia, vascular hyperplasia, cardiac hypertrophy, thrombin-induced platelet aggregation, and conditions associated with the prostaglandin or cyclooxygenase pathways, e.g., conditions involving prostaglandin endoperoxide synthase. A p38-associated condition can include any condition associated with or mediated by an isoforni of p38.
[0148] A "fibrotic condition," ’fibroproliferative condition," "fibrotic
disease," "fibroproliferative disease," "fibrotic disorder," and "fibroproliferative disorder" are used interchangeably to refer to a condition, disease or disorder that is characterized by dysregulated proliferation or activity of fibroblasts and/or pathologic or excessive accumulation of collagenous tissue. Typically, any such disease, disorder or condition is

-34-

WO 2006/122154 PCT1US2006/017988

amenable to treatment by administration of a compound having anti-fibrotic activity. Fibrotic disorders include, but are not limited to, pulmonary fibrosis, including idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) and pulmonary fibrosis from a known etiology, liver fibrosis, and renal fibrosis. Other exemplary fibrotic conditions include musculoskeletal fibrosis, cardiac fibrosis, post-surgical adhesions, scleroderrna, glaucoma, and skin lesions such as keloids.

101491 The term "modulating SAPK system" means increasing or decreasing
activity of the stress-activated protein kinase system activity, e.g., by inhibiting p38 activity, whether in vitro or in vivo. In certain embodiments, the SAPK system is modulated when p38 activity in a cell is inhibited by about 50%, preferably by about 40%, more preferably by about 30%, even more preferably by about 20%, or yet even more preferably by about 10% compared to the p38 activity of an untreated control cell.
[0150] A condition associated with altered cytokine activity, as used herein,
refers to a condition in which cytokine activity is altered compared to a non-diseased state. This includes, but is not limited to, conditions caused by IL-1p, TNFa, IL-6 or IL-8 overproduction or dysregulation resulting in sustained, prolonged, enhanced or elevated levels of cytokine activity, which may be associated with p38 activity. Such conditions include, without limitation, Inflammatory diseases, autoimmune diseases, fibrotic diseases, destructive bone disorders, proliferative disorders, infectious diseases, neurodegenerative diseases, allergies, reperfusionlischemia in stroke, heart attacks, angiogenic disorders, organ hypoxia, vascular hyperplasia, cardiac hypertrophy, thrombin-induced platelet aggregation, and conditions associated with the cyclooxygenase and lipoxygenase signaling pathways, such as prostaglandin endoperoxide synthase. A cytokine-associated condition can include any condition associated with or mediated by IL-1 (particularly IL-1p), TNFcx, IL-6 or IL-8, or any other cytokine which can be regulated by p38. In preferred embodiments, the cytokine associated condition is a condition associated with TNFx..
[0151] The methods described herein may also be used to treat autoinimune
diseases and diseases associated with acute and chronic inflammation. These diseases include, but are not limited to: chronic obstructive pulmonary disease (COPD), bronchiolitis obliterans syndrome, chronic allograft fibrosis, infianimatoiy pulmonary fibrosis (IPF), rheumatoid arthritis; rheumatoid spondylitis; osteoarthritis; gout, other arthritic conditions; sepsis; septic shock; endotoxic shock; gram-negative sepsis; toxic

 35 7?

WO 2006/122154

AO
PCT/1JS2006/0 7988

shock syndrome; myofacial pain syndrome (MPS); Shigellosis; asthma; adult respiratory distress syndrome; inflammatory bowel disease; Crohns disease; psoriasis; eczema; ulcerative colitis; glomerular nephritis; scieroderma; chronic thyroiditis; Grav&s disease; Ormonds disease; autoimmune gastritis; myasthenia gravis; autoimmune hemolytic anemia; autoinimune neutropenia; thrombocytopenia; pancreatic fibrosis; chronic active hepatitis including hepatic fibrosis; acute and chronic renal disease; renal fibrosis, irritable bowel syndrome; pyresis; restenosis; cerebral malaria; stroke and ischemic injury; neural trauma; Alzheimer’s disease; Huntingtonrs disease; Parkinsonts disease; acute and chronic pain; allergies, including allergic rhinItis and allergic conjunctivitis; cardiac hypertrophy, chronic heart failure; acute coronary syndrome; cachexia; malaria; leprosy; leishmaniasis; Lyme disease; Reiter’s syndrome; acute syaoviitis; muscle degeneration, bursitis; tendonifis; tenosynoviitis; herniated, ruptured, or prolapsed intervertebral disk syndrome; osteopetrosis; thrombosis; silicosis; pulmonary sarcosis; bone resorption diseases, such as osteoporosis or multiple myeloma-related bone disorders; cancer, including but not limited to metastatic breast carcinoma, colorectal carcinoma, malignant melanoma, gastric cancer, and non-small cell lung cancer; graft-versus-host reaction; and auto-immune diseases, such as Multiple Sclerosis, lupus and fibromyalgia; AIDS and other viral diseases such as Herpes Zoster, Herpes Simplex I or II, influenza virus, Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) and cytomegalovirus; and diabetes mellitus. In addition, the methods of the embodiments can be used to treat proliferative disorders (including both benign and malignant hyperplasias), including acute myelogenous leukemia, chronic myelogenous leukemia, Kaposi’s sarcoma, metastatic melanoma, multiple myeloma, breast cancer, including metastatic breast carcinoma; colorectal. carcinoma; malignant melanoma; gastric cancer; non-small cell lung cancer (NSCLC); bone metastases, and the like; pain disorders including neuromuscular pain, headache, cancer pain, dental pain, and arthritis pain; angiogenic disorders including solid tumor angiogenesis, ocular neovascularization, and infantile hemangioma; conditions associated with the cyclooxygenase and lipoxygenase signaling pathways, including conditions associated with prostaglandin endoperoxide synthase-2 (including edema, fever, analgesia, and pain); organ hypoxia; thrombin-induced platelet aggregation. In addition, the methods described herein may be useful for the treatment of protozoal diseases in animals, including mammals.
[0152] A subject may include one or more cells or tissues, or organisms. A preferred subject is a mammal, A mammal may include any mammal. As a non-limiting

-36-

WO 2006/1122154 PCT/US2006/01.7988

example, preferred mammals include cattle, pigs, sheep, goats, horses, camels, buffalo, cats, dogs, rats, mice, and humans. A highly preferred subject mammal is a human. The compound(s) may be administered to the subject via any drug delivery route known in the art. Specific exemplary administration routes include oral, ocular, rectal, buccal, topical, nasal, ophthalmic, subcutaneous, intramuscular, intravenous (bolus and infusion), intracerebral, transdermal, and pulmonary.
[01531 The terms ’therapeutically effective amount" and "prophylactically
effective amount", as used herein, refer to an amount of a compound sufficient to treat, ameliorate, or prevent the identified disease or condition, or to exhibit a detectable therapeutic, prophylactic, or inhibitory effect. The effect can be detected by, for example, the assays disclosed in the following examples. The precise effective amount for a subject will depend upon the subject’s body weight, size, and health; the nature and extent of the condition; and the therapeutic or combination of therapeutics selected for
administration. Therapeutically and prophylactically effective amounts for a given
situation can be determined by routine experimentation that is within the skill and judgment of the clinician. Preferably, the effective amount of the compound of the embodiments produces a blood or serum or another bodily fluid concentration that is less than an EC30, BC20 or BC10 for inhibition ofp38 MAP kinase.
[0154] For any compound, the therapeutically or prophylactically effective
amount can be estimated initially either in cell culture assays, e.g., of neoplastic cells, or in animal models, usually rats, mice, rabbits, dogs, or pigs. The animal model may also be used to determine the appropriate concentration range and route of administration. Such information can then be used to determine useful doses and routes for administration in humans.

[0155] Therapeutic/prophylactic efficacy and toxicity may be determined by
standard pharmaceutical procedures in cell cultures or experimental animals, e.g., ED-j0 (the dose therapeutically effective in 50% of the population) and LD50 (the dose lethal to 50% of the population). The dose ratio between therapeutic and toxic effects is the therapeutic index, and it can be expressed as the ratio, ED50/LD50. Pharmaceutical compositions that exhibit large therapeutic indices are preferred. However, the pharmaceutical compositions that exhibit narrow therapeutic indices are also within the scope of the embodiments. The data obtained from cell culture assays and animal studies may be used in formulating a range of dosage for human use. The dosage contained in such compositions is preferably within a range of circulating concentrations that include

-37-

WO 20061122 1’ PCTIUS2006/017988

an ED50 with little or no toxicity. The dosage may vary within this range depending upon the dosage form employed, sensitivity ofthe patient, and the route of administration.
[01561 More specifically, the maximum plasma concentrations (Cnax) may
range from about 65 gM to about 115 riM, or about 75 iJM to about 105 M, or about 85 !IM to about 95 riM, or about 85 p.M to about 90 p.M depending upon the route of administration. Guidance as to particular dosages and methods of delivery is provided in the literature and is generally available to practitioners in the art. In general the dose will be in the range of about 100 mg/day to about 10 g/day, or about 200 mg to about 5 g/day, or about 400 rug to about 3 g/day, or about 500 rug to about 2 g/day, in single, divided, or continuous doses for a patient weighing between about 40 to about 100 kg (which dose may be adjusted for patients above or below this weight range, particularly children under 40 kg). Generally the dose will be in the range of about 25 mg/kg to about 300 mg/kg of body weight per day.
[01571 The exact dosage will be determined by the practitioner, in light of
factors related to the subject that requires treatment. Dosage and administration are adjusted to provide sufficient levels of the active agent(s) or to maintain the desired effect. Factors which may be taken into account include the severity ofthe disease state, general health of the subject, age, weight, and gender of the subject, diet, time and frequency of administration, drug combination(s), reaction sensitivities, and tolerance/response to therapy. Long-acting pharmaceutical compositions may be administered twice a day, once a day, once very two days, three times a week, twice a week, every 3 to 4 days, or every week depending on half-life and clearance rate of the particular formulation. For example, in an embodiment, a pharmaceutical composition contains an amount of a compound as described herein that is selected for administration to a patient on a schedule selected from: twice a day, once a day, once very two days, three times a week, twice a week, and once a week.
[01581 It will be appreciated that treatment as described herein includes
preventing a disease, ameliorating symptoms, slowing disease progression, reversing damage, or curing a disease.
[01591 In one aspect, treating an inflammatory condition results in an increase
in average survival time of a population oftreated subjects in comparison to a population of untreated subjects. Preferably, the average survival time is increased by more than about 30 days; more preferably, by more than about 60 days; more preferably, by more than about 90 days; and even more preferably by more than about 120 days. An increase

-38-

WO 2006/12214

A?) PCT/IJS2006/0I 7988

in survival time of a population may be measured by any reproducible means. in a preferred aspect, an increase in average survival time of a population may be measured, for example, by calculating for a population the average length of survival following initiation of treatment with an active compound. In an another preferred aspect, an increase in average survival time of a population may also be measured, for example, by calculating for a population the average length of survival following completion of a first round oftreatment with an active compound.
[0160] In another aspect, treating an inflammatory condition results in a decrease in the mortality rate of a population of treated subjects in cornparis3n to a population ofsubjects receiving carrier alone. In another aspect, treating an inflammatory condition results in a decrease in the mortality rate of a population of treated subjects in comparison to an untreated population. In a further aspect, treating an inflammatory condition results a decrease in the mortality rate of a population of treated subjects in comparison to a population receiving monotherapy with a drug that is not a compound of the embodiments, or a pharmaceutically acceptable salt, metabolite, analog or derivative thereof. Preferably, the mortality rate is decreased by more than about 2%; more preferably, by more than about 5%; more preferably, by more than about 10%; and most preferably, by more than about 25%. In a preferred aspect, a decrease in the mortality rate of a population of treated subjects may be measured by any reproducible means. In another preferred aspect, a decrease in the mortality rate of a population may be measured, for example, by calculating for a population the average number of disease-related deaths per unit time following initiation oftreatment with an active compound. In another preferred aspect, a decrease in the mortality rate of a population may also be measured, for example, by calculating for a population the average number of disease related deaths per unit time following completion of a first round of treatment with an active compound.
[0161] In another aspect, treating an inflammatory condition results in a decrease in growth rate of a tumor. Preferably, after treatment, tumor growth rate is reduced by at least about 5% relative to /number prior to treatment; more preferably, tumor growth rate is reduced by at least about 10%; more preferably, reduced by at least about 20%; more preferably, reduced by at least about 30%; more preferably, reduced by at least about 40%; more preferably, reduced by at least about 50%; even more preferably, reduced by at least 60%; and most preferably, reduced by at least about 75%. Tumor growth rate may be measured by any reproducible means of measurement. In a

-39-

WO 2006/1221M PCT/1JS2006/01 7988

preferred aspect, tumor growth rate is measured according to a change in tumor diameter per unit time.
[01621 In another aspect, treating an inflammatory condition results in a
reduction in the rate of cellular proliferation. Preferably, after treatment, the rate of cellular proliferation is reduced by at least about 5%; more preferably, by at least about 10%; more preferably, by at least about 20%; more preferably, by at least about 30%; more preferably, by at least about 40%; more preferably, by at least about 50%; even more preferably, by at least about 60%; and most preferably, by at least about 75%. The rate of cellular proliferation may be measured by any reproducible means of measurement. In a preferred aspect, the rate of cellular proliferation is measured, for example, by measuring the number of dividing cells in a tissue sample per unit time.
[01631 In another aspect, treating an inflammatory condition results in a
reduction in the proportion of proliferating cells. Preferably, after treatment, the proportion of proliferating cells is reduced by at least about 5%; more preferably, by at least about 10%; more preferably, by at least about 20%; more preferably, by at least about 30%; more preferably, by at least about 40%; more preferably, by at least about 50%; even more preferably, by at least about 60%; and most preferably, by at least about 75%. The proportion of proliferating cells may be measured by any reproducible means of measurement. In a preferred aspect, the proportion of proliferating cells is measured, for example, by quantifying the number of dividing cells relative to the number of nondividing cells in a tissue sample. In another preferred aspect, the proportion of proliferating cells is equivalent to the mitotic index.
101641 In another aspect, treating an inflammatory condition results in a
decrease in size of an area or zone of cellular proliferation. Preferably, after treatment, size of an area or zone of cellular proliferation is reduced by at least 5% relative to its size prior to treatment; more preferably, reduced by at least about 10%; more preferably, reduced by at least about 20%; more preferably, reduced by at least about 30%; more preferably, reduced by at least about 40%; more preferably, reduced by at least about 50%; even more preferably, reduced by at least about 60%; and most preferably, reduced by at least about 75%. Size of an area or zone of cellular proliferation may be measured
by any reproducible means ofmeasurement. In a preferred aspect, size of an area or zone
of cellular proliferation may be measured as a diameter or width of an area or zone of cellular proliferation.

40
i
y

WO 2(06/122154 PCT/US20061017988

[0161 The methods described herein may include identifying a subject in
need oftreatment. In a preferred embodiment, the methods include identifying a mammal in need of treatment. In a highly preferred embodiment, the methods include identifying a human in need of treatment. Identifying a subject in need of treatment may be accomplished by any means that indicates a subject who may benefit from treatment. For example, identifying a subject in need of treatment may occur by clinical diagnosis, laboratory testing, or any other means known to one of skill in the art, including any combination ofmeans for identification.

[0166] As described elsewhere herein, the compounds described herein may
be formulated in pharmaceutical compositions, if desired, and can be administered by any route that permits treatment of the disease or condition. A preferred route of administration is oral administration. Administration may take the form of single dose administration, or the compound ofthe embodiments can be administered over a period of time, either in divided doses or in a continuous-release formulation or administration method (e.g., a pump). However the compounds ofthe embodiments are administered to the subject, the amounts of compound administered and the route of administration chosen should be selected to permit efficacious treatment of the disease condition.
[0167] The methods of the embodiments also include the use of a compound
or compounds as described herein together with one or more additional therapeutic agents for the treatment of disease conditions. Thus, for example, the combination of active ingredients may be: (1) co-formulated and administered or delivered simultaneously in a combined formulation; (2) delivered by alternation or in parallel as separate formulations; or (3) by any other combination therapy regimen known in the art. When delivered in alternation therapy, the methods described herein may comprise administering or delivering the active ingredients sequentially, e.g., in separate solution, emulsion, suspension, tablets, pills or capsules, or by different injections in separate syringes. in general, during alternation therapy, an effective dosage of each active ingredient is administered sequentially, i.e., serially, whereas in simultaneous therapy, effective dosages of two or more active ingredients are administered together. Various sequences of intermittent combination therapy may also be used.
[0168] Diagnostic tests are contemplated as part of the methods described
herein. For example, a tissue biopsy sample may be taken from a subject suffering from an inflammatory condition, e.g., a p38-associated or cytokine-associated condition. The biopsy sample can be tested to determine the level of p38 activity (or cytokine levels)

-41-

WO 2006/122154 PCT/US2006/017988

present in the sample; the sample can then be contacted with a selected compound of the embodiments, and the p38 activity (or cytokine levels) measured to determine whether the compound has a desired effect (e.g., inhibition of p38 or cytokine activity with an EC50 in the range of about 100 tM and about 1000[LM, preferably about 50 nM to about 650 jiM). Such a test may be used to determine whether treatment with such a compound is likely to be effective in that subject. Alternatively, the sample may be contacted with a labeled compound (e.g., a fluorescently-labeled compound, or a radioactivity-labeled compound) and the sample then examined and the fluorescent or radioactive signal detected to determine the distribution of p38 in the tissue sample. Repeated biopsy samples taken during a course oftreatment may also be used to study the efficacy of the treatment. Other diagnostic tests using the compounds described herein will be apparent to one of ordinary skill in the art in light ofthe teachings ofthis specification.
[0169] Thus, for example, an embodiment provides methods for determining
the presence, location, or quantity, or any combination thereof of p38 protein in a cell or tissue sample. The methods include: a) contacting the cell or tissue sample with a compound of the embodiments under conditions such that the compound can bind to at least one p38 MAPK; and b) determining the presence, location, or quantity, or any combination thereof ofthe compound in the cell or tissue sample, thereby determining the presence, location, or quantity, or any combination thereof ofthe at least one p38 MAPK in the cell or tissue sample. Determining the presence, location, or quantity, or any combination thereof of the compound in the cell or tissue sample may be conducted by any means that reveals the presence, location, or quantity, or any combination thereof of the compound in the cell or tissue. For example, as described previously, radioactive or fluorescent labeling methods may be used. Additional methods of determining the presence, location, or quantity, or any combination thereof of the compound will be apparent to a skilled artisan.
[0170] Another embodiment provides methods for determining: (1) whether a compound will be a useful therapeutic agent for treatment of a subject suffering from an inflammatory condition, or (2) the severity of disease or (3) the course of disease during treatment with a disease-modifying agent. The methods include: a) obtaining a cell or tissue sample from the subject before, during and after termination of treatment with a compound as described hereinor another disease-modifying agent; b) contacting the sample with the compound; and c) determining the amount ofthe compound that binds to

-42-

WO 2006/122154 PCT/US2006/()1 7988 /

the sample, wherein binding to p38 MAPK by the compound is related to the amount of
p38 MAPK in the sample.

Specific examples of diseases contemplated to be treated by the compounds and methods
described herein
COPD

[01711 Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is characterized by a chronic inflammatory process in the lung that includes (1) increased number of inflammatory cells (neutrophils, macrophages and SD84 T cells) in the airways and parenchyma, (2) increased inflammatory cytokine and chemokine expression, and (3) increased number of proteases (elastases, cathepsins, and matrix metalloproteinases, MMPs). The production and action of many of potential mediators of airway inflammation are believed to be dependent on the stress-induced MAPK or p38 kinase cascade. Several reports support the association pf p38 kinase activation with as plethora of pulmonary events: LPS- and TNF-a-induced intercellular adhesion molecule-] expression on pulmonary microvascular endothelial cells, MMP-9 activation, hypoxia-induced stimulation of pulmonary arterial cells, byperosmolarity-induced IL-8 expression in bronchial epithelial cells, and enhanced eosinophil trafficking and survival.
101721 Trifihieff et al. (2005 Brit J Pharmacol 144:1002-10) reported that CGH2466, a combined adenosine receptor antagonist, p38 MAPK and phosphodiesterase type 4 inhibitor showed potent in vitro and in vivo anti-inflammatory activities in diseases such as asthma and COPE). Underwood et al. (2000 Am J Physiol Lung Gel! Mo! Physiol 279:L895L902) demonstrated that the potent and selective p38 MAPK inhibitor, SB239063, reduced proinflammatory cytokine production, including IL- i 0, TNF-a, IL-6, and IL-8, which have been linked to airway fibrosis because of their ability to regulate fibroblast proliferation and matrix production; that leads to diminished neutrophil trafficking and activation in the lung. Earlier, the same compound was found capable of altering responses associated with chronic fibrosis induced by bleomycin. This inhibitory activity was selective for the a and P isoforms of the p38. The compounds and methods

described herein are useful in the treatment of COPD.

-43-

A?
WO 20061122154 PCTIIJS2006/017988

Pulmonary fibrosis
101731 Pulmonary fibrosis also called idiopathic pulmonary fibrosis (1PF), interstitial diffuse pulmonary fibrosis, inflammatory pulmonary fibrosis or fibrosing alveolitis, is an inflammatory lung disorder and a heterogeneous group of conditions characterized by abnormal formation of fibrous tissue between alveoli caused by alveolitis comprising an inflammatory cellular infiltration into the alveolar septae with resulting fibrosis. The effects of 1PF are chronic, progressive, and often fatal. p38 MAPK activation has been demonstrated in the lung of patients with pulmonary fibrosis. A number of investigations about pulmonary fibrosis have indicated that sustained and augmented expression of some cytokines in the lung are relevant to recruitment of inflammatory cells and accumulation of extracellular matrix components followed by remodeling of the lung architecture. In particular, proinflammatory cytokines such as TNF-ct and interleukin IL-l3 were demonstrated to play major roles in the formation of pneumonitis and pulmonary fibrosis. In addition, profibrotic cytokines such as TGF-f3 and CTGF also play critical roles in the pathogenesis of pulmonary fibrosis. Matsuoka et al. (2002 Am JPhysiol Lung Cell Mo! Physiol 283:LI 03-Li 12) have demonstrated that a p38 inhibitor, FR-167653, ameliorates murine bleomycin-induced pulmonary fibrosis. Furthermore, pirfenidone (5-methyl-1-phenyl-2-(1H)-pyridone), a compound with combined anti-inflammatory, antioxidant and antifibrotic effects was found effective in experimental models of pulmonary fibrosis as well as in clinical studies (Raghu et al. 1999 Am JRespir Grit Care Med 159:1061-1069; Nagai et al. 2002 Intern Med 41:1118-1123; Gabi et al. 2002 Mo! Genet Metab 76:234-242; Azuma et al. 2002 Ain JRespir Grit Care Med 165:A729). The compounds and methods described herein are useful in the treatment ofpulmonary fibrosis, such as 1FF.

Bronchiolitis obliterans and Bronchiolitis obliterans syndrome
[0174] Bronchiolitis obliterans, and its correlating clinical condition bronchiolitis obliterans syndrome, are characterized by obstruction of the pulmonary pathway via obliteration of pulmonary small airways. In bronchiolitis obliterans, pathologic examination characteristically finds lesions which obstruct or obliterate small airways in the lung. These lesions are granular fibromyxoid tissue and dense submucosal scar tissue. Lesions progress from prolonged, abnormal, or aberrant inflammation of

WO 2006/1221154 PCT/US2006/01 7988

epithelial and epithelial-localized structures of the small airways, mediated by proinfiammatory cytokines such as TNFa and result in excessive fibroproliferation. The obliteration of pulmonary small airways progressively leads to airflow obstruction, characterized by progressive decline in forced expiratory volume in one second (FEV1), and is often accompanied by recurring infections of the lower respiratory tract and colonization of pulmonary tissue by pathogenic microorganisms.
[01 75J J3ronchiolitis obliterans syndrome affects 50-60% of patients surviving
five years after lung transplantation surgery, and five year survival after onset of bronchiolitis obliterans syndrome is only 30-40%. Lung transplantation patients experiencing bronchiolitis obliterans syndrome often respond poorly to augmented immunosuppression. In patients with idiopathic pulmonary fibrosis, survival after bronchiolitis obliterans syndrome is shorter than in patients with emphysema. The compounds and methods described herein are useful in the treatment of bronchiolitis obliterans syndrome.

Chronic Allograft Fibrosis
[01761 Allograft failure is a profound concern in transplantation management.
One of the primary causes of allograft failure is chronic allograft dysfunction. Hallmarks of chronic allograft dysfunction are chronic inflammation and chronic fibrosis, both of which are associated with the production of inflammatory cytokines and growth factors. Mediation of inflammatory cytokine and growth factors, particularly resulting in interruption of collagen and TGF production, is useful in the treatment of chronic allograft fibrosis. The term "chronic allograft fibrosis" as used herein is intended to encompass both chronic inflammation and chronic fibrosis associated with chronic allograft fibrosis. The compounds and methods described herein are useful in the treatment of chronic allograft fibrosis.

Renal fibrosis

[0177] Irrespectivc of the nature of the initial insult, renal fibrosis is
considered to be the common final pathway by which kidney disease progresses to end-stage renal failure. Stanibe et al. (2004 JAm Soc Nephrol 15:370-379) tested an inhibitor of the active (phosphorylated) form of p38, NPC 31169, developed by Scios Inc. (San Francisco, CA) in a rat model of renal fibrosis, and reported a significant reduction in renal fibrosis assessed by interstitial volume, collagen IV deposition, and connective

WO 2006/1221.54 PCT/US2006/017988

tissue growth mRNA levels. The compounds and methods described herein are useful in

the treatment ofrenal fibrosis.

Lelomyoma
[0178) Uterine leiomyomas or fibroids are the most common pelvic tumors in
women with no known long-term effective drug therapies available. Leiomyomas are characterized by increased cell proliferation and tissue fibrosis. Pirfenidone was tested on cell proliferation and collagen expression in cultured myometrial and leiomyoma smooth muscle cells, and was found to be an effective inhibitor of inyometrial and leiomyoma cell proliferation (Lee et al. 1998 J Clin Endocrinol Metab 83:219-223). The compounds and methods described herein are useful in the treatment ofleiornyomas.

Endomyocardial fibrosis
[0179] Endomyocardial fibrosis (EMF) is a disorder characterized by the
development of restrictive cardiomyopathy. EMF is sometimes considered part of a spectrum of a single disease process that includes Löffler endocarditis (nontropical eosinophilic endomyocardial fibrosis or fibropiastic parietal endocarditis with eosinophilia). In EMF, the underlying process produces patchy fibrosis of the endocardial surface ofthe heart, leading to reduced compliance and, ultimately, restrictive physiology as the endomyocardial surface becomes more generally involved. Endocardial fibrosis principally involves the inflow tracts of the right and left ventricles and may affect the atrioventricular valves, leading to tricuspid and mitral regurgitation. MAPK activation was shown to contribute to arrhythmogenIe atrial structural remodeling in EMF. The compounds and methods described herein are useful in the treatment and/or prevention of endomyocardial fibrosis.

Other inflammatory diseases
[0180) Many autoinunune diseases and diseases associated with chronic
inflammation, as well as acute responses, have been linked to activation of p38 MAP kinase and overexpression or dysregulation of inflammatory cytokines. These diseases include, but are not limited to: rheumatoid arthritis; rheumatoid spondylitis; osteoartbritis; gout, other arthritic conditions; sepsis; septic shock; endotoxic shock; gram-negative sepsis; toxic shock syndrome; asthma; adult respiratory distress syndrome; chronic obstructive pulmonary disease; chronic pulmonary inflammation; inflammatory bowel

-46-

WO 2006/122154 PCT/US2006/01 79S

disease; Crohn’s disease; psoriasis; eczema; ulcerative colitis; pancreatic fibrosis; hepatic fibrosis; acute and chronic renal disease; irritable bowel syndrome; pyresis; restenosis; cerebral malaria; stroke and isc.hemic injury; neural trauma; Alzheimer’s disease; Huntington’s disease; Parkinson’s disease; acute and chronic pain; allergic rhinitis; allergic conjunctivitis; chronic heart failure; acute coronary syndrome; cachexia; malaria; leprosy; leishmaniasis; Lyme disease; Reiter’s syndrome; acute synoviitis; muscle degeneration, bursitis; tendonitis; tenosynovitis; herniated, ruptures, or prolapsed intervertebral disk syndrome; osteopetrosis; thrombosis; cancer; restenosis; silicosis; pulmonary sarcosis; bone resorption diseases, such as osteoporosis; graft-versus-host reaction; and auto-immune diseases, such as Multiple Sclerosis, lupus and fibromyalgia; AIDS and other viral diseases such as Herpes Zoster, Herpes Simplex 1 or 11, influenza virus and cytomegalovirus; and diabetes mellitus.
[01811 Many studies have shown that reducing the activity of p38 MAP
kinase, its upstream activators or its downstream effctors, either through genetic or chemical means, blunts the inflammatory response and prevents or minimizes tissue damage (see, e.g., English, et al. 2002 Trends Pharnzacol Sci 23:40-45; and Doug et al. 2002 Annu Rev hnmunol 20:55-72). Thus, inhibitors of p38 activity, which also inhibit excess or unregulated cytokine production and may inhibit more than a single pro-inflammatory cytokine, may be useful as anti-inflammatory agents and therapeutics. Furthermore, the large number of diseases associated with p38 MAP kinase-associated inflammatory responses indicates that there is a need for effective methods for treating these conditions.
101821 Cardiovascular disease. Inflammation and leukocyte
activation/infiltration play a major role in the initiation and progression of cardiovascular diseases including atherosclerosis and heart failure. Acute p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway inhibition attenuates tissue damage and leukocyte accumulation in myocardial ischemia/reperfusion injury, The compounds and methods described herein are useful for treating cardiovascular disease.
101831 Multiple sclerosis. Inflammation in the central nervous system occurs
in diseases such as multiple sclerosis and leads to axon dysfunction and destruction. Both in vitro and in vivo observations have shown an important role for nitric oxide (NO) in mediating inflammatory axonopatby. p38 MAP kinase is activated by NO exposure and inhibition of p38 signalling was shown to lead to neuronal and axonal survival effects. 0CM and IGF-1 reduced p38 activation in NO-exposed cortical neurons and improved

-47-

WO 2006/122154 PCTiUS2006/017988

axon survival in cultures exposed to NO, a process dependent on initogen-activated protein kinase/extracellular signal-related kinase signalling. The compounds and methods described herein are useful for treating multiple sclerosis.
101841 P -inigryg aftnQftnctio Nonspecific inflammation is associated
with primary graft nonfimetion (PNF). Jnflarnmatory islet damage is mediated at least partially by pro-inflammatory cytokines, such as interleukin-1 3 (IL-1p) and tumor necrosis factor-a (TNF-a) produced by resident islet macrophages. The p38 pathway is known to be involved in cytokine production in the cells of the monocyte-macrophage lineage Inhibition of the p38 pathway by a chemical p38 inhibitor, SB203580,
suppresses IL-l3 and TNF-a production in human islets exposed to lipopolysaceharide
(LPS) and/or inflammatory cytokines. Although IL-1 3 is predominantly produced by
resident macrophages, ductal cells and islet vascular endothelial cells were found to be
another cellular source of IL-l1 in isolated human islets. SB203580 also inhibited the
expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) in
. the treated islets. Furthermore, human islets treated with SB203580 for I b prior to transplantation showed significantly improved graft function. The compounds and
methods described herein are useful for improving graft survival in clinical islet
transplantation.
[01851_ Acute renal iniury. Cisplatin is an important chemotherapeutic agent
but can cause acute renal injury. Part ofthis acute renal injury is mediated through tumor
necrosis factor-a (TNF- (x). Cisplatin activates p38 MAPK and induces apoptosis in cancer cells. p38 MAPK activation leads to increased production of TNF- a in ischernic injury and in macrophages. In vitro, cisplatin caused a dose dependent activation of p38 MAPK in proximal tubule cel1s hihibition of p38 MAPK activation led to inhibition of TNF- a production. In viva, mice treated with a single dose of cisplatin developed severe renal dysfunction, which was accompanied by an increase in kidney p38 MAPK activity and an increase in infiltrating leukocytes. However, animals treated with a p38 MAPK inhibitor SKF86002 along with cisplatin showed less renal dysfunction, less severe histologic damage and fewer leukocytes compared with cispiatin+vehicle treated animals. The compounds and methods described herein are useful for preventing acute renal injury.
L0I86) Periodontitis. The proinflammatory mediator bradykinin (BK)
stimulates interleukin-8 (IL-8) production in human gingival fibroblasts in vitro and plays

-48-

WO 2006/122154 PCT/US2006/01 7988

an important role in the pathogenesis of various inflammatory diseases including periodontitis. The specific p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) inhibitor SB 203580 reduced IL-8 production stimulated by the combination of BK and IL-lP as well as the IL-1 3-stimulated IL-8 production. The compounds and methods described herein are useful for treating or preventing periodontitis.

Pharmaceutical Compositions
[01871 While it is possible for the compounds described herein to be administered alone, it may be preferable to formulate the compounds as pharmaceutical compositions. As such, in yet another aspect, pharmaceutical compositions useful in the methods of the invention are provided. More particularly, the pharmaceutical compositions described herein may be useful, inter alia, for treating or preventing inflammatory conditions, e.g., conditions associated with p38 activity or cytokine activity or any combination thereof. A pharmaceutical composition is any composition that may be administered in vitro or in vivo or both to a subject in order to treat or ameliorate a condition. In a preferred embodiment, a pharmaceutical composition may be administered in vivo. A subject may include one or more cells or tissues, or organisms. A preferred subject is a mammal. A mammal includes any mammal, such as by way of non-limiting example, cattle, pigs, sheep, goats, horses, camels, buffalo, cats, dogs, rats, mice, and humans. A highly preferred subject mammal is a human.
[0188] In an embodiment, the pharmaceutical compositions may be formulated with pharmaceutically acceptable excipients such as carriers, solvents, stabilizers, adjuvants, diluents, etc., depending upon the particular mode of administration and dosage form. The pharmaceutical compositions should generally be formulated to achieve a physiologically compatible pH, and may range from a pH of about 3 to a pH of about ii, preferably about pH 3 to about pH 7, depending on the formulation and route of administration. In alternative embodiments, it may be preferred that the pH is adjusted to a range from about pH 5.0 to about pH 8. More particularly, the pharmaceutical compositions may comprise a therapeutically or prophylactically effective amount of at least one compound as described herein, together with one or more pharmaceutically acceptable excipients. Optionally, the pharmaceutical compositions may comprise a combination of the compounds described herein, or may include a second active

49- 3

WO 2006/122154 PCT/US2006/01 7988

ingredient useful in the treatment or prevention of bacterial infection (e.g., anti-bacterial or anti-microbial agents).
[0189] Formulations, e.g., for parenteral or oral administration, are most
typically solids, liquid solutions, emulsions or suspensions, while inhalable formulations for pulmonary administration are generally liquids or powders, with powder formulations being generally preferred. A preferred pharmaceutical composition may also be formulated as a lyophilized solid that is reconstituted with a physiologically compatible solvent prior to administration. Alternative pharmaceutical compositions may be formulated as syrups, creams, ointments, tablets, and the like.
[01901 The term "pharmaceutically acceptable excipient" refers to an
excipient for administration of a pharmaceutical agent, such as the compounds described herein. The term refers to any pharmaceutical excipient that may be administered without undue toxicity.
[0191] Pharmaceutically acceptable excipients are determined in part by the
particular composition being administered, as well as by the particular method used to administer the composition. Accordingly, there exists a wide variety of suitable formulations of pharmaceutical compositions (see, e.g., Remington’s Pharmaceutical Sciences).
[0192] Suitable excipients may be carrier molecules that include large, slowly
metabolized macromolecules such as proteins, polysaccharides, polylactic acids, polyglycolic acids, polymeric amino acids, amino acid copolymers, and inactive virus particles. Other exemplary excipients include antioxidants such as ascorbic acid; chelating agents such as BDTA; carbohydrates such as dextrin, hydroxyalkylcellulose, bydroxyalkyimethylcellulose, stearic acid; liquids such as oils, water, saline, glycerol and ethanol; wetting or emulsifying agents; pH buffering substances; and the like. Liposomes are also included within the definition ofpharmaceutically acceptable excipients.
[01931 The pharmaceutical compositions described herein may be formulated
in any form suitable for the intended method of administration. When intended for oral use for example, tablets, troches, lozenges, aqueous or oil suspensions, lion-aqueous solutions, dispersible powders or granules (including micronized particles or nanoparticles), emulsions, hard or soft capsules, syrups or elixirs may be prepared. Compositions intended for oral use may be prepared according to any method known to the art for the manufacture of pharmaceutical compositions, and such compositions may

-50-

WO 2006/122154 PCT/US2006/017988

contain one or more agents including sweetening agents, flavoring agents, coloring agents and preserving agents, in order to provide a palatable preparation.
[0194] Pharmaceutically acceptable excipients particularly suitable for use in
conjunction with tablets include, for example, inert diluents, such as celluloses, calcium or sodium carbonate, lactose, calcium or sodium phosphate; disintegrating agents, such as cross-linked povidone, maize starch, or algiriic acid; binding agents, such as povidone, starch, gelatin or acacia; and lubricating agents, such as magnesium stearate, stearic acid

or talc.

[01951 Tablets may be uncoated or may be coated by known techniques
including microencapsulation to delay disintegration and adsorption in the gastrointestinal tract and thereby provide a sustained action over a longer period. For example, a time delay material such as glyceryl monostearate or glyceryl distearate alone or with a wax maybe employed.
101961 Formulations for oral use may be also presented as hard gelatin
capsules where the active ingredient is mixed with an inert solid diluent, for example celluloses, lactose, calcium phosphate or kaolin, or as soft gelatin capsules wherein the active ingredient is mixed with non-aqueous or oil medium, such as glycerin, propylene glycol, polyethylene glycol, peanut oil, liquid paraffin or olive oil.
[01971 In another embodiment, pharmaceutical compositions may be
formulated as suspensions comprising a compound ofthe embodiments in admixture with at least one pharmaceutically acceptable excipient suitable for the manufacture of a suspension.
[0198] In yet another embodiment, pharmaceutical compositions may be
formulated as dispersible powders and granules suitable for preparation of a suspension by the addition ofsuitable excipients.
[0199] Excipients suitable for use in connection with suspensions include
suspending agents, such as sodium earboxymethylcellulose, methylcellulose, hydroxypropyl methyleellulose, sodium alginate, polyvinylpyrrolidone, gum tragacanth, gum acacia, dispersing or wetting agents such as a naturally occurring phosphatide (e.g., lecithin), a condensation product of an alkylene oxide with a fatty acid (e.g., polyoxyethylene stearate), a condensation product of ethylene oxide with a long chain aliphatic alcohol (e.g., heptadecaethyleneoxycethanol), a condensation product of ethylene oxide with a partial ester derived from a fatty acid and a hexitol anhydride (e.g., polyoxyethylene sorbitan monooleate); polysaccharides and polysaccharide-like

-51-

WO 2006/12214 PCTIUS2006/017988

compounds (e.g. dextran sulfate); glycoarninoglycans and glycosaminoglycan-like compounds (e.g., hyaluronic acid); and thickening agents, such as carbomer, beeswax, hard paraffin or cetyl alcohol. The suspensions may also contain one or more preservatives such as acetic acid, methyl and/or n-propyl p-hydroxy-benzoate; one or more coloring agents; one or more flavoring agents; and one or more sweetening agents such as sucrose or saccharin.

[02001 The pharmaceutical compositions may also be in the form of oil-in
water emulsions. The oily phase may be a vegetable oil, such as olive oil or arachis oil, a mineral oil, such as liquid paraffin, or a mixture of these. Suitable emulsifying agents include naturally-occurring gums, such as gum acacia and gum tragacantb; naturally occurring phosphatides, such as soybean lecithin, esters or partial esters derived from fatty acids; hexitol anhydrides, such as sorbi.tan monooleate; and condensation products of these partial esters with ethylene oxide, such as polyoxyethylene sorbitan monooleate. The emulsion may also contain sweetening and flavoring agents. Syrups and elixirs may be formulated with sweetening agents, such as glycerol, sorbitol or sucrose. Such formulations may also contain a demulcent, a preservative, a flavoring or a coloring agent.

102011 Additionally, the pharmaceutical compositions may be in the form of a
sterile injectable preparation, such as a sterile injectable aqueous emulsion or oleaginous suspension. This emulsion or suspension may be formulated according to the known art using those suitable dispersing or wetting agents and suspending agents which have been mentioned above. The sterile injectable preparation may also be a sterile injectable solution or suspension in a non-toxic parenterally acceptable diluent or solvent, such as a solution in 1,2-propane-dioL
102021 The sterile injectable preparation may also be prepared as a lyophilized
powder. Among the acceptable vehicles and solvents that may be employed are water, Ringer’s solution, and isotonic sodium chloride solution. In addition, sterile fixed oils may be employed as a solvent or suspending medium. For this purpose any bland fixed oil may be employed including synthetic mono- or diglycerides. In addition, fatty acids such as oleic acid may likewise be used in the preparation ofinjectables.
[0203] To obtain a stable water-soluble dose form of a pharmaceutical
composition, a pharmaceutically acceptable salt of a compound described herein may be dissolved in an aqueous solution of an organic or inorganic acid, such as 0.3 M solution ofsuocinic acid, or more preferably, citric acid. If a soluble salt form is not available, the

-52-

WO 2006/122154 PCT/US2006/017988

compound may he dissolved in a suitable co-solvent or combination of co-solvents. Examples of suitable co-solvents include alcohol, propylene glycol, polyethylene glycol 300, polysorbate 80, glycerin and the like in concentrations ranging from about 0 to about 60% of the total volume. In one embodiment, the active compound is dissolved in DMSO and diluted with water.

[02041 The pharmaceutical composition may also be in the form of a solution
of a salt form ofthe active ingredient in an appropriate aqueous vehicle, such as water or isotonic saline or dextrose solution. Also contemplated are compounds which have been modified by substitutions or additions of chemical or biochemical moieties which make them more suitable for delivery (e.g., increase solubility, bioactivity, palatability, decrease adverse reactions, etc.), for example by esterification, glycosylation, PEGylation, etc.
[0205] In a preferred embodiment, the compounds described herein may be
formulated for oral administration in a lipid-based formulation suitable for low solubility compounds. Lipid-based formulations can generally enhance the oral bioavailability of 10 such compounds.
[0206] As such, a preferred pharmaceutical composition comprises a
therapeutically or prophylactically effective amount of a compound described herein, together with at least one pharmaceutically acceptable excipient selected from the group consisting of- medium chain fatty acids or propylene glycol esters thereof (e.g., propylene glycol esters of edible fatty acids such as caprylic and capric fatty acids) and pharmaceutically acceptable surfactants such as polyoxyl 40 hydrogenated castor oil.
[0207) In an alternative preferred embodiment, cyclodextrins may be added as
aqueous solubility enhancers. Preferred cyclodextrins include hydroxypropyl, hydroxyethyl, giucosyl, maltosyl and maltotriosyl derivatives of a-, 3-, and ’y-cyclodextrin. A particularly preferred cyclodextrin solubility enhancer is hydroxypropyl-o-eyclodextrin (BPBC), which may be added to any of the above-described compositions to further improve the aqueous solubility characteristics of the compounds of the embodiments. In one embodiment, the composition comprises about 0.1% to about 20% hydroxypropyl-o-cyclodextrin, more preferably about 1% to about 15% hydroxypropyl-o-cyclodextrin, and even more preferably from about 2.5% to about 10% hydroxypropyl-o-cyclodextrin. The amount of solubility enhancer employed will depend on the amount of the compound of the embodiments in the composition.

-53-

WO 2006/122154 PCT/US2006/O1 7988

E02081 A pharmaceutical composition contains a total amount of the active
ingredient(s) sufficient to achieve an intended therapeutic effect. More specifically, in some embodiments, the pharmaceutical composition contains a therapeutically effective amount (e.g, an amount of an SAPK-modulating compound that is effective in the prevention or treatment of the symptoms of an inflammatory disease or condition, wherein the compound exhibits an EC50 in the range of about 1 iM to about 1000 jtM, preferably about 50 iM to about 650 ^for inhibition of at least one p38 MAPK). The total amounts of the compound that may be combined with the carrier materials to produce a unitary dosing form will vary depending upon the host treated and the particular mode of administration. Preferably, the compositions are formulated so that a dose of between 0.01 to 100 mg/kg body weight/day of an SAPK-modulating compound is administered to a patient receiving the compositions.

EXAMPLE 1

102091 Compounds are screened for the ability to inhibit ATF2
phosphorylation by p38 MAP kinase in vitro. The ability of compounds to inhibit ATF2 phosphorylation in this in vitro assay is correlated with the inhibition of p38 MAP kinase and TNFct expression in vivo, and is therefore an indicator of potential in vivo therapeutic activity (Raingeaud, J. et al. 1995 J. Biol. Chem. 270:7420-7426; Brinkman, M.N., et al. 1999 J. Biol. Chein. 274:30882-30886; and Fuchs, S.Y. et al. J. Biol. Chern. 275:12560-12564,2000).
[0210] All kinases and the substrate ATF2 are acquired from Upstate
(Charlottesville, VA). p38 MAP Kinases are recombinant human full-length proteins with an amino-terminal GST fusion, expressed in and purified from E. coil. ATF2 is a GST fusion protein containing amino acids 19-96 of human ATF2 expressed in E. coil. All proteins are aliquoted and stored at -80°C.

[0211] p3 8 MAP kinase assays are performed using an assay buffer containing
25 mM HEPES, pH 7.5, 10 mM MgC12, 2 mM DTT, 20 mM f3-glycerophosphate, 0.1 mM Na3VO4, 40 jiM ATP and 1.25 jiM of ATF2, together with 6 ng of p38ct. protein, 12 ng p383 protein, 1.5 rig p38y, or 0.4 ng JNK2a2. Compounds are serially diluted in DMSO and 2 jiL oftest compound at various concentrations is used. The vehicle control receives DMSO only.

-54- -?

WO 2006/122154 PCT/US2006/017988

[0212] Test compounds are pre-incubated with 20 p1 of enzyme in kinase
buffer (25 mM HEPES, pH 7.5, 10 mM M902, 2 mM DTT, 20 mM ft-glycerophosphate and 0.1 mM Na3VO4) at room temperature for 15 minutes. Reactions are initiated by addition of 30 Jd substrate solution to yield a final concentration of 40[LM ATP and 1.25 pM ATF2 in kinase buffer. The reactions are incubated for 30 minutes at 37°C and terminated by the addition of 18 p1 of 200 mM EDTA. An ELISA method is used to measure the phosphorylation of ATF2 at Thr 69. High binding 96-well plates are coated with 50 p.l of kinase reaction for 1 hour at 37°C. The coated plates are washed with 200 p.l washing buffer (25 mM Tris HC1, pH 8.3, 192 mM glycine, 0.1% SDS and 0.05% Tween-20) three times. The plates are then washed three times with SuperBiock in TBS (Pierce, 37535). After blocking, plates are incubated with 50 p1 of rabbit anti-phospho-ATF2 antibody (Cell Signaling, 9221L, 1:500) for 30 minutes at 37°C.
[0213] Plates are washed three times with washing buffer prior to incubation
with 50 p1 HRP-conjugated goat anti-rabbit antibody (Cell Signaling, 7074, 1:500) for 30 minutes at 37°C. Plates are then washed three times with washing buffer before incubation with 50 p.1 of Ultra TMB-ELISA (Pierce, 34028) for 8 minutes at room temperature. Finally, 50 p1 of phosphoric acid (1 M) is added to stop reactions and plate absorbance is read at 450 urn on a SpectraMax 250 plate reader.
[0214] The compounds inhibit the phosphorylation of ATF2 in this in vitro
assay. Preferred compounds exhibit BC50 values of between about 1.iM and about 1000 pM, preferably about 50 [LM to about 650 p.M.

EXAMPLE 2

(0215] Compounds are screened for the ability to inhibit TNFcL release from
THP-1 cells stimulated with lipopolysaccharide (LPS) in vitro. The ability of compounds to inhibit TNFc release in this in vitro assay is correlated with the inhibition of p38 activity and TNFa, and is therefore an indicator of potential in vivo therapeutic activity (Lee J. C. et al. 1993 Ann. N.Y. Acad. Sd. 696:149-170; and1994 Nature 372:739-746).
[0216] THP- I cells from ATCC (TI]3202) are maintained at 37°C, 5% CO2 in
RPMI 1640 media (MediaTech, Herndon, VA) containing 4.5 g/L glucose, supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% penicillin/streptomycin and 50 p.M 3-mercaptoethariol.

WO 2006/122154 PCT/1i S20O6/01798

[02171 Test compounds are initially dissolved in RPMI media with 1% DMSO
(v/v). Compounds are then serially diluted in RPMI media for all subsequent dilutions. The assay is performed under sterile conditions. THP-1 cells at a culture density of 6-8 x 105 cells/mi are collected and resuspended in the RPMI media at 106 ceils/rnL 100 tl of resuspended cells are added to each well, which contain 100 il of a test compound. Test compounds are prepared at twice the final concentration. Final DM50 concentration is no more than 0.5 % (vfv). Cells are preincubated with compound for 60 minutes at 37°C, 5% CO2 prior to stimulation with lipopolysaccharide (LPS) (Sigma L-2880, 4 mg/ml stock in PBS). The final LPS concentration in each well is 10 or 30 g/ml for TNFa and IL-I13 release, respectively. Unstimulated control cell suspensions receive PBS vehicle only. Cell mixtures are incubated for 18 or 48 hours for TNFa and IL-10 release, respectively. 150 d of supernatants are taken and transferred to a fresh plate and stored at -20°C until farther analysis. TNFa and IL-il) levels arc measured using ELISA kits. A Luminescence is used as the plate reader. Analysis is performed by non-linear
regression to generate a dose response curve. The calculated EC50 value is the
concentration ofthe test compound that causes a 50 % decrease in TNFa or IL-il) levels.
[02181 Compounds inhibit the release of TNFa, IL-i 13 or both TNFa, and IL-
113 in this in vitro assay. Preferred compounds exhibit EC50 values for TNFa and/or IL-113 of between about 1.LM and about 1000 tM, preferably about 50.rM to about 650 i.LM. Data are provided in Table 2 below.

No.’
13 -H

Table 2

X3--aN; Z

R4
X3 R2 R4

7 -H
9 -OH
11 -F
8 -H
12 -F

- CH3
-H
-H
-H
- CF3
- CF3

Z TM? EC50 ()2 Toxicity3
-H 0 A
-H 0 B
-H 0 C
-H 0 B
-H 0 B
-H 0 C

1 M
D
D
D
D
D

-56-
c70

WO 2006/122154 PCTJI.JS2006/01798

S -OH -CH3 -H 0 A mM
1 -H -CH20H -H 0 B D
2 -H -COOH -H 0 C D
3 -H -glucuronide -H 0 C D
6 -H CH20CH3 -H 0 A > 1 mM
4 41 -CH3 -OH 0 A ?: 1 MM
14 -F -CH3 -H 0 B D
15 -OCH3 -CF3 -H 0 C D
16 -COCH3 -H -H 0 C D
10 -OH -CF3 -11 0 A D
17 -H -phenyl -H 0 C D
18 -H -CH3 -H S c D
25 See note

CH3 -H 0 B B

26 -H -Br -H 0 A B
27 -OCH3 -Br -H 0 A A
28 -OH -CH2F -H 0 C D
29 -OH -CliP2 -H 0 C D
30 -OH -Br -H 0 A A
31 -OCH3 -CH2F -H 0 A A
32 -OCH3 -CHF2 -H 0 A A
33 -H See note 5 - 0 C D
24 -H CO2CH3 -H 0 C D
Compound number as shown in Table 1

2 A: 2,000; B: > 2,000; C: Inconclusive (e.g., no data or no activity observed)
D: Inconclusive (e.g., no data or no toxicity observed)

’ Compound 25 is as depicted in Table 1, namely the aryl group attached to a 2-pyridone nitrogen is an N-methylpyridinium moiety
Compound 33 is as depicted in Table 1, namely a brornoaryl group fused to the 5 and 6 positions of a 2-pyridone ring

-57-

W() 2006122154

’0
PCT/L3S200610I 7988

EXAMPLE 3

[0219] Compounds are screened for the ability to inhibit TNFa release from
primary human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) stimulated with lipopolysaccharide (LPS) in vitro. The ability of compounds to inhibit TNPa release in this in vitro assay is correlated with the inhibition of p38 activity and is therefore an indicator of potential in vivo therapeutic activity (2002 0steoarthritis & Cartilage 10:961-967; and Laufer, S.A. and Wagner, G.K. 2002 J. Med. Chein. 45:2733-2740),
[02201 Human peripheral blood mononuclear cells (PI3MC) are isolated by
differential centrifugation through a Ficoll-HyPaque density gradient from pooled serum of 3-8 individual blood donors. Isolated PJ3MC contain approximately 10% CD-14

positive monocytes, 90% lymphocytes and <1% granulocytes and platelets. PBMC (1o6 /ml) are cultured in polystyrene plates and stimulated with lipopolysaceharide (LPS; 50 ug/rul; Sigma, St. Louis, MO) in the presence and absence ofthe test compound in serial dilutions, in duplicate, for 24 hr at 37°C in GIBCOTM RPMI medium (Invitrogen, Carlsbad, CA) without serum. The TNF(x level in cell supernatants is determined by ELISA using a commercially available kit (MDS Panlabs #309700).
[0221] Preferred compounds inhibit the release of TNFa in this assay with an
EC50 value ofbetween about 1 p.M and about 1000 p.M, preferably about 50 p.M to about 650 p.M.

EXAMPLE 4

[0222] Compounds are screened for the ability to inhibit the release of TNTFa
in an in vivo animal model (See, e.g., Griswold D. E. et al. 1993 Drugs Exp. Res. 19:243-248; Badger, A.M. et al. 1996J. Pharinacol. Exp. Ther. 279:1453-1461; Dong, C. et al. 2002 Aimu. Rev. J)nmunol. 20:55-72 (and references cited therein); Ono, K. and Han, J. 2000 Cellular Signalling 12:1-13 (and references cited therein); and Griffiths, J.B. . et al. 1999 Curr. Rheuinatol. Rep. 1:139-148).
[0223] Without being bound by any particular theory, it is believed that
inhibition of TNFu in this model is due to inhibition of p38 MAP kinase by the compound.
[0224] Male Sprague-Dawley rats (0.2 - 0.35 kg) are randomly divided into
groups of six or more and are dosed intravenously by infusion or bolus injection, or are dosed orally with test compounds in a suitable formulation in each case. Thirty minutes

- 58-

WO 2006/122 154 PCTIUS2006/017988

following end of infusion or bolus injection, and 1-2 hr following oral administration, lipopolysaccharide E. coli/0127:B8 (0.8 mg/kg) is administered IV. Blood samples are collected 1.5 hours posttreatment with LPS. Serum TNPc levels are determined using the ELISA kit from Biosource (KRC30I IC) and compared to that from vehicle-treated

control.

[02251 Preferred compounds inhibit the release of TNFo. in this in vivo assay.
Preferred compounds exhibit an ED50 value of less than 500 mg/kg, preferably less than 400 mg/kg, preferably less than 200 mg/kg, preferably less than 100 mg/kg, more preferably, less than 50 mg/kg, more preferably, less than 40 mg/kg, more preferably, less than 30 mg/kg, more preferably, less than 20 mg/kg, more preferably, less than 10 mg/kg.
102261 The methods of determining the BC50 of the inhibition of p38 by a
compound include any methods known in the art that allow the quantitative detection of any of the downstream substrates of p38 MAPK as described above. Therefore, these methods additionally include but limited to detection of expression of genes known to be regulated by p38 either individually, or by gene arrays.

EXAMPLE 5

102271 The following methods can be used for (I) a kinase assay for
determination of BC50, (2) a non-radiomentric kinase assay for determination of BC50, (3) modulation of induction of TNFL expression, (4) a test for cell toxicity, and (5) an assay to test the effect of compounds on collagen production.

Kinase

102281 The activity of the P38 kinase isoforms P38? and P38a is determined
by phosphorylation of ATF-2 in presence of 32P-7-ATP. The incorporation of 32p into ATF-2 in the presence or absence of inhibitors is determined. Pirfenidon.e and its different derivatives are tested for inhibition of P387 and P38a kinase activity in this biochemical assay. The compounds are solubilized in water or DMSO and tested at different concentrations from 0 to 10 mM using the appropriate solvent for dilutions and as vehicle control. The enzymes P38y and P38a are obtained as activated and purified recombinant protein (Upstate, Charlottesville,VA). The activated enzyme is used at 24.8 nM in the final reaction. The enzymes are diluted prior to the reaction in the following buffer (1M HEPES, p1-I 7.4, 500mM DTT, 1% Triton X-100 and 10mg/mi BSA). The reaction is performed in the following solution that is prepared as a two fold stock

-59-

WO 2006/122154

0?1
PCT/US206/01 7988

solution (1M HEPES, pH 7.4, 500mM DTT and 1% Triton X-100) and uonradioactive AT? is present in the reaction at 6.25 p.M AT? (Cell Signaling, Beverly, MA). To determine the phosphorylation of ATF-2, y-{32P]- AT? 3000CiImrnol is added to each reaction at a concentration of 7.5 pM. ATF2 (Cell Signaling, Beverly, MA) as a kinase substrate is used at 3 p.M. As a first step in assembling the enzyme reaction, activated kinase and inhibitor or the appropriate vehicle control are added to reaction buffer and incubated for 30 nun at room temperature. The kinase reaction is initiated by the addition ofATF-2 and ATP mixture. The final volume for each reaction is 20 p.1 and performed at room temperature for 30 minutes. After the 30 minutes of incubation SOW of Laeminlie buffer is added. Subsequently 20% of the reaction is separated by SDS Page (Biokad, Hercules, CA) under reducing conditions. After electrophoresis, the gel is exposed to a phosphorimager plate and analyzed using a phosphoimager (Storm System, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). The signal obtained is quantified after background correction and calculated as percent inhibition using the uninhibited kinase activity with the vehicle control as 0% inhibition. The kinase activity, in the presence of different inhibitor concentrations, is plotted using Kaleidagraph (Synergy Software, Reading, PA) to determine the BC50 for each compound and tested P38 kinase.
Non-radiometric Kinase Assay
[02291 An alternate, non-radiometric kinase assay was also employed to define the EC50 for inhibition of P38. In this assay, p38 kinase transfers a phosphate from ATP to an EGF-R peptide substrate, resulting in the formation of phosphorylated EGF-R peptide with the concomitant conversion of AT? to AD?. In an uncoupled reaction, p38 also hydrolyzes ATP at a slower rate in the absence of peptide substrate (Fox et al, FEBS Lett 1999), which contributes slightly to AT? consumption. Thus, the amount of ATP consumed is directly proportional to p38 activity. At the end of a kinase reaction, the amount ofAT? remaining is determined using Kinase-G10 Plus Luminescent Kinase Assay (Promega, Inc., Madison, WI). These reagents use residual AT? to support the ATP-dependent enzymatic conversion of beetle luciferin to oxyluciferin with the concomitant production oflight, which is detected by a luminometer.
[02301 Kinase reactions are conducted by mixing compound (diluted in DMSO and assay buffer) with either p38u or p38’y, and EGF-R peptide substrate (AnaSpec, Inc., San Jose, CA) in assay buffer. Reactions are then initiated by the addition
of ATP and allowed to run for 45 minutes at room temperature. Final buffer conditions are: 20 mM HEPES (pH 7.4), 2 ruM DTT, 0.1% Tritori-X-100, 10 MM MgCl2, 10%

-60-
)

WO 20061122154 PCT/US2006/0 17988

glycerol, 12.5 mM p38a or p3 8? (Upstate, Cbarlottesville,VA), 50 gM EGF-R peptide substrate, and 10 i.tM ATP. The final assay volume is 10 p1, A control reaction is performed in the absence of compound. Additional control reactions that omit p38 are performed at every compound concentration. All reactions are performed in triplicate.
[02311 Forty-five minutes after initiation ofthe kinase reaction, the reaction is
quenched by the addition of 10 tL of KinaseG10 Plus assay reagent. The luciferase reaction is allowed to equilibrate for 15 minutes prior to being read on an Envision Multilabel Plate Reader (Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Boston, MA). Data are plotted as luminescent signal versus log compound concentration in KaleidaGraph (Synergy Software, Reading, PA). EC50 values are determined by fitting the data to 4-paramater binding equation using a fixed upper bound that is determined from control reactions in the absence ofp38 (as luminescence is inversely related to kinase activity).

Inhibition ofTNFa induction

[02321 THP-1 (ATCC, Rockville, MD) is grown under regular tissue culture
conditions as recommended by ATCC. IS hours prior to the experiment, cells were plated in a 96 well format in regular culture media containing 1% serum and 0.25 ml culture volume at a density of 500,000 cells per well. The compound is added to each well in triplicates and the appropriate solvent control is included in each assay. The p38 inhibitor 88203 850 at 1 p.M/mi (Upstate, Waltham, MA) is included as a positive control in each assay. For the induction of TNFa expression. 1 j.ig/ml LPS is added to each well 30 minutes post compound addition. Following a 4 hour incubation under tissue culture conditions the cells are sedimented by centrifugation (10 min, 1000rpm, Beckman table top centrifuge) and a fraction ofthe cell free supernatant is collected and used in a tenfold dilution for the quantification in the TNFa specific ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN). The TNFa ELISA is performed according to the directions provided by the manufacturer. The TNFc is detected in pg/mi and plotted as fractional activity normalized to the TNFa expression in the solvent control.

Lud. toxicity testing in a celljtç4 as
[02331 The release of LDH as result of a disrupted cell membrane is applied
as a measure of cell toxicity. LDH is detected by its enzymatic activity using a commercially available diagnostic kit (Roche Diagnostics, Cat# 1 644 793). THP-1 cells

-61-

WO 2006/1122154 PCT/U S2006/01 7988

are used for determination of cell toxicity for consistency with the induced TNFa expression in the previous experiment. As previously described for testing of inhibition of TNFc induction, cells are cultured in a 96 well format under 1% serum and regular tissue culture conditions. The compounds are added at different concentrations in triplicate. The appropriate solvent control is used in each assay. After compound addition the cells are cultured 18 hours under regular tissue culture conditions. After this incubation period, the positive control is initiated by adding Triton-X-100 (2% vfv) to untreated cells and incubated for an additional 10 minutes for complete cell lysis. Subsequently the cells are sedimented by centrifugation and a fraction of the supernatant removed and analyzed for LDH enzyme activity according to the manufacturer’s instructions. The data is typically reported as % cell toxicity normalized to the Triton-X-100 lysed cells as 100% cell toxicity.
[0234] Toxicity data are also obtained using a commercially available AT? assay (Molecular Probes’ ATP Determination Kit A22066, available from Invitrogen) and/or using a MTT assay. Both the AT? and the MTT assays measure metabolic competence of the cell. The MTT assay measures the ability of the cell to reduce a marker substrate, which is related to metabolic competence (i.e. viability). The ATP assay measures the cellular AT? concentration in the presence and absence of compound. Toxic compounds lead to reduced metabolic activity which leads to a reduction in ATP

concentration.

Assay for Effect ofCompounds on Collagen Production
[02351 HFL-1 Cells (ATCC, Rockville, MD) were grown under regular tissue culture conditions in complete media containing 10% fetal bovine serum (FBS; Mediatech, Inc., Herndon, VA). Cells in early passage were plated in 6 well plates. When the cells reached confluence, the media was removed, cells washed with PBS, and the cells were kept overnight in complete media containing 0.1% FBS - The media was then replaced with fresh media plus 0.1% FCS, 10 iM L-Proline (EMD Chemicals, Gibbstown, NJ), 20 tg/mL ascorbic acid (EMD Chemicals, Gibbstown, NJ). Compounds were added to triplicate wells to a final concentration of 1 mM from I OOX stock solutions in DMSO. One hour after the addition of compound, the cells were treated with TGF-PI (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) to a final concentration of 10 ng/mL (25 ng total). Three days after addition of TGF-3, the media was removed, cells were washed with PBS and then lysed. The total collagen content of lysed cells was assessed with a dye-based

-62-

WO 2006/122154 lCT/US2006/0.1 7988

collagen assay (Sircol Collagen Assay, Newtownabbey, Northern Ireland) and a Quant plate-based spectrophotometer (BioTek Insturments, Inc., Winooski, VT) with appropriate standard curves. The dynamic range ofthe assay is defined by cells that were mock treated (1% DMSO without compound) in the presence and absence of TGF-3. Data are reported in Table 3 as the percent inhibition of TGF-13-induced collagen as determined in the following equation:

% inhibition100*[(collagen, mockl+ TGF-3)-(collagen, treated/+TGF-J3)]/[(co1lagen, mock/+TGF-)-(collagen, rnock/-TGF-13)J

Table 3

Compound No. % Inhibition of TGIi’-p Stimulated
Collagen Synthesis
8 48
14 23
15 49
26 58
30 69

EXAMPLE 6

[02361 Preparation of 1 -(4-hydroxyphenyl)-5-(trifloromethyl)-2-pyridone (Compound 10): A mixture of 5-(trifloromethyl)-2(1H)-pyridone (815.5 mg, 5 mniol), 4-iodoanisole (2.34g. 10 irimol), Cul (952 mg, 5 nimol), K2CO3 (691 mg, 5 nrrnol) and DMF (5 ml) was heated at 135°C overnight. The reaction mixture was diluted with 10% ammonia (15 ml) and extracted with ethyl acetate. The organic extract was washed with saturated sodium chloride, dried over magnesium sulfate and evaporated. Column chromatography purification (30% ethyl acetate-hexane) afforded 526 mg (39.2%) of 1 (4-methoxypheny1)5-(trifloromethyl)2-pyridofle. This compound (268.2 mg, 1 mmol) was treated with IM BBr3 solution in dichioromethane (DCM, 2 ml) in DCM (5 ml) for 2 hours at 0°C. Reaction mixture was diluted with DCM and washed 3 times with water. Organic phase was dried over sodium sulfate and evaporated. The residue was separated by column chromatography (20% ethyl acetate- DCM) to afford the title compound as a off-white solid, 226 mg (89%). The ’H NMR spectra was consistent with the structure of Compound 10.

-63-

WO 2006/122154 PCT/1JS2006/01 7988

S

EXAMPLE 7

(02371 Preparation of 1 -phenyl-5-acetyl-2-pyridone (Compound 16): 2-
methoxy-5-acetyl pyridine (1.51 g, 10 mrnol) was treated with 6N HCI at 100°C for 5 hours. The reaction mixture was neutralized with sodium hydroxide to pH 7 and then extracted several times with DCM. Organic layer was dried over sodium sulfate, evaporated and the residue was crystallized from ethyl acetate to give 5-acetyl-2(1H)- pyridone as a white solid, 1.06 g (78%). This compound (685.7 rng, 5 mmol) was reacted with iodobenzene (0.84 ml, 7.5 mmol) in the presence of Cul (95 mg, 0.5 mmol) and K2CO3 (691 mg, 5 mmol) in DMF (5 ml) at 135°C overnight. The reaction mixture was diluted with 10% ammonia (15 ml) and extracted with ethyl acetate. The organic extract was washed with saturated sodium chloride, dried over magnesium sulfate and evaporated. Column chromatography (10% ethyl acetate-DCM) afforded 407 mg (38%) of the target compound as a white solid. The ’H NMR spectra was consistent with the structure ofCompound 16.

EXAMPLE 8

[0238] Preparation of 1 -(4-pyridinyl)-5-methyl-2-pyridone (Compound 22):
Compound 22 was synthesized by condensation of 5-methyl-2(1H)-pyridone (327.4 mg, 3 mmol) with 4-bromopyridine hydrochloride (778 mg, 4 mmol) in the presence of Ciii (60 mg, 0.3 mmol) and K2CO3 (1.36 g, 10 mmol) in DMF (3 ml) at 135°C overnight. The reaction mixture was diluted with 10% ammonia (15 ml) and extracted with ethyl acetate. Organic extract was washed with saturated sodium chloride, dried over magnesium sulfate and evaporated. Column chromatography (5% MeOH-DCM) afforded 197 mg (35%) of the target compound as a yellowish solid. The ’H NMR spectra was consistent with the structure ofCompound 22,

EXAMPLE 9

[0239] Preparation of 1 -pbenyl.-5-methyl-2-pyridinethione (Compound 18):
1 -phenyl-5-methyl-2-pyridinone (555.7 mg, 3 niniol) was reacted with Lawesson’s reagent (606.7 mg, 1.5 mmol) in toluene (5 ml) at 90°C. Reaction mixture was evaporated and the target compound was isolated by column chromatography (20-30% ethyl acetate-hexane) followed by crystallization from methyl-tert-butyl ether. Yield 403 mg (67%), yellow solid. The H NMR spectra was consistent with the structure of Compound 18.

-64 6,? y -

WO 206/122I54 I’CT/US2006/01 7988

[0240)
scheme:

EXAMPLE 10

Compound 33 was prepared according to the following synthetic

OEf 0OH- OEI 0

BrNH2
Br

OU

HSO4 OR
EIOLOE E!00M DCC, HOBI
I F-i
HO
HO’

Cu(OAc)2, 02, PY

3

2

b

Compound 33

[0241) A mixture of commercially available ethyl 3,3-diethoxypropionate (97
nil, 50 mmol), sodium hydroxide (10M, 6 ml, 60 mmol) and water (15 ml) was refluxed until homogenous (approximately 30 After cooling to 0°C 6N hydrochloric acid was added to bring p11 of the solution to 2-3 (l0 ml). The mixture was extracted with dichioromethanc, organic phase was washed with water, dried over sodium sulfate, and the solvent was removed under vacuum to give acid 1 which was used without any additional purification.
102421 To a solution of crude acid 1 (approximately 50 mmol) in DCM (100
ml) at 0°C was sequentially added 4-bromoaniline (10.3 g, 60 mmol), HOBT (675 mg, 5 mmol) and finally DCC (12.4 g, 60 mmol). The reaction mixture was stirred at 0°C for 1 hour and then refluxed for another 4 hours. The solid was filtered off, filtrate was washed with saturated sodium bicarbonate, dried over sodium sulfate, and the solvent was removed under vacuum to give amide 2 as slightly yellow solid. This solid was dissolved in sulfuric acid (96%, 50 ml) at 0°C. The solution was kept at the same temperature for another 3 h and then poured into ice-water (500 ml). The solid was filtered off, washed with water, and stirred with hot acetonitrile (100 ml). Quinolinone 3 was filtered off and dried under vacuum. The yield was 10 g (91%).
[0243) Mixture of compound 3 (309 ing, 1.38 inmol), phenylboroiiic acid (336
ing, 2.76 mmol), Cu(OAc)2 (36 ing, 0.2 mmol), molecular sieves 4a (0.3 g), pyridine (0.24 ml) and DCM (10 ml) was stirred at room temperature for 2 days. Reaction mixture was filtered trough Celite, washed with saturated sodium bicarbonate with EDTA and

-65.- 61

W() 2006/12214 PCT/US2006/017988

organic phase was dried over sodium sulfate. Compound 33 was isolated by chromatograpy (50% ethylacetate-hexane - ethylacetate. The yield was 352 mg (85%).

EXAMPLE ii

[02441 The pharmacokinetic (PK) properties of pirfenidone, pirfenidone
analogs and derivatives were assessed in dual canulated (right jugular/left carotid) Sprague Dawley rats (Charles River Laboratories, Inc., Wilmington, MA). Male rats weighing approximately 275-300g were administered an intravenous (5 mg/Kg) or oral (50 mg/Kg via gavage) dose of compound in an appropriate formulation. Plasma samples were collected via intra-arterial canula at desired times in the 24 hours after dosing using EDTA as an anticoagulant. Three animals were used for each compound. All experiments were conducted by trained personnel in accordance with guidelines of the appropriate Institutional Animal Care and Use Committees (JACUC).
[02451 Compound concentrations were assessed by LC-MS using a MDS
SCIEX API 3000 mass spectrometer (Applied Biosystcms, Foster City, CA) coupled to a Shimadzu VP HPLC (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) outfitted with a Duragel G Cis guard cartridge (Peeke Scientific, Redwood City, CA). Calibration samples were prepared by mixing known amounts of pirfenidone, or a pirfenidone analog or derivative, with rat plasma. A standard curve was created by serial dilution ofthe calibration sample in the same matrix. Both standard and analytical samples were prepared for injection to the HPLC by mixing an aliquot of plasma sample with 3 volumes ofice cold acetonitrile containing internal standard. Samples were then centrifuged. An aliquot ofthe resulting supernatant was then mixed with five volumes of 0.2% formic acid in water, injected to the HPLC, and resolved in a methanol gradient (containing 0.18-0.2% formic acid). The integrated analyte signal was corrected for that of the internal standard and compared to the appropriate standard curve in order to define the analyte concentration.
102461 The pharmacokinetic parameters shown in Table 4 were derived using
the WinNonlin Software package (Pharsight Corp, Mountain View, CA).

-66-

W() 2006/.122154 PCT/US2006/01 7988

Table 4

Route Dose Compound T112 MRTInI Clobs AUClast E
of mg/kg hr. hr mLlhrlkg ng-hr/inL
Admin. x106
IV 5 8 13.9 20.3 0.117 30.2
19 2.96 6.26 0.142 35
26 L62 2.4 0.691 10.3
Oral 50 8 122.4 40.5
19 191.7 54.8
26 65.8 63.9

[0247] While the present invention has been described in some detail for purposes of clarity and understanding, one skilled in the art will appreciate that various changes in form and detail can be made without departing from the true scope of the invention. All figures, tables, appendices, patents, patent applications and publications,

referred to above, are hereby incorporated by reference in their entirety.

-67

WO 2006/122154 PCT/US2006/017988

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A method of modulating a stress activated protein kinase (SAPK) system, comprising contacting a compound with a p38 mitogen-.activated protein kinase (MAPK), wherein the compound exhibits an EC50 in the range of about I iM to
about 1000 tM for inhibition of at least one p38 MAPK; and
wherein the contacting is conducted at a SAPK-modulating concentration
that is less than an EC30 for inhibition of the at least one p38 MAPK by the compound.
2. The method of Claim 1 in which the p38 MAPK is selected from the group
consisting of p38ct, p38f3, p38y, and p388.
3. The method of Claim 1 in which the contacting is conducted at a SAPK
modulating concentration that is less than an EC20 for inhibition of p38 MAPK by the compound.
4. The method of Claim 1 in which the contacting is conducted at a SAPK-
modulating concentration that is less than an EC10 for inhibition of p38 MAPK by the compound.
5. The method of Claim 1, wherein the EC0 values and the EC30 values are
obtained from a dose response curve.
6. The method of Claim 1 in which the SAPK-modulating concentration is
effective to alter TNFcc release in whole blood by at least 15%.
7. The method of Claim 1 in which the EC50 is in the range of about 50 IiM to
about 650 pM.
8. The method of Claim 1 in which the compound comprises a pyridone ring.
9. The method of Claim 1 in which the compound is of Genus la:

X4 X5 R, R2

.

X3NR3

Genus la;
wherein

R1, R, R3 and R4 are independently selected from the group consisting of
H, C1 -C10 alkyl, substituted C1 -C10 alkyl, C1 -C10 alkenyl, C1-Cio haloalkyl, C1 -C10 nitroalkyl, C1 -C10 thioalkyi, CI -CI() hydroxyalkyl, C1 -C10 alkoxy, phenyl,

-68-

WO 2006/122154 PCT/US2006/01 7988

substituted phenyl, halogen, hydroxyl, C1-C10 alkoxyalkyl, C1 -C10 carboxy, C1 -C10 alkoxycarbonyl, CO-uronide, COmonosaccharide, CO-oligosaceharide, and CO-polysaccharide; and
X1, X2, X3, X4, and X5 are independently selected from the group
consisting of H, halogen, C1-Cjo aikoxy, and hydroxy.
10. The method of Claim 9, wherein the compound is a metabolite, hydrate, solvate, or prodrug of a compound of Genus Ia.
Ii. The method ofClaim I in which the compound is of Genus Ib:

X3--ON
0 R4

Genus Tb;
wherein
X3 is selected from the group consisting of H, halogen, C1 -C10 alkoxy, and
OH;
R2 is selected from the group consisting of H, halogen, C1-C10 alkyl, substituted CI-Clo alkyl, C1 -C10 hydroxyalkyl, C-C1ç alkoxyalkyl, C1 -C10 carboxy, C1-C10 alkoxycarbonyl, CO-uronide, CO-monosaccharide, CO-oligosaceharide, and CO-polysaccharide; and
R4 is selected from the group consisting ofH, halogen, and OR
12. The method of Claim 1 in which the compound is of Genus Ic:

X3N

Genus [c;
. wherein

X3 is selected from the group consisting of H, F, OH and 0C113;
R2 is selected from the group consisting of H, CF3, CHF2, CH2F, CH20H, COOH, CO-Glucoronide, Br, CH3, and CH20CH3; and
R4 is selected from the group consisting of H and OH;
with the proviso that when R4 and X3 are H, R2 is not CH3.
13. The method of Claim 1 in which the compound is of Subgenus II:

-69-

WO 2006/122154 PCT/US2006/01 7988

X3Ø

Subgenus II;
wherein

X3 is selected from the group consisting of H, OH and OC143;
R2 is selected from the group consisting of H, CH20H, COOH, CO-
Glucoronide, CR3, and CH20CH3; and
R4 is selected from the group consisting of H and OH, with proviso that when X3 is OH, then R2 is not CR3.
14. The method ofClaim 1 in which the compound is of Subgenus III:

X3--ON

Subgenus JU;
wherein
X3 is selected from the group consisting ofH, F, and OH; and
R2 is selected from the group consisting ofH, Br, CH2F, CHF2, and CF3.
IS. The method ofClaim 1 in which the compound is of Subgenus IV:

X3&N

Subgenus W
wherein X3 is selected from the group consisting of H, halogen, C1 -C10 alkoxy, OH, C1C10 alkyl, substituted C1 -C10 alkyl, C1C10 alkenyl, C1 -C10 haloalkyl, C1 -C10 nitroalkyl, C1 -C10 thioalkyl, C1 -C10 hydroxyalkyl, phenyl, substituted phenyl, C1 -C10 alkoxyalkyl, C1 -C10 carboxy, Cl-Cio alkoxycarhonyl, CO-uronide, CO-monosaccharide, CO-oligosaccharide, and CO-polysaccharide.
16. The method of Claim I in which the compound is of Subgenus V:

-70- ? x

WO 20061122154 PCT/US2006/01 7988

CF3 X3QØ

Subgenus V
wherein X3 is selected from the group consisting of H, halogen, C1 -C9
alkoxy, CI -CIO alkyl, substituted C1 -C10 alkyl, CI -CID alkenyl, CI-CIO haloalkyl, CI-Crn nitroalkyl, C1-C10 thioalkyl, C1 -C10 bydroxyalkyl, phenyl, substituted phenyl, C1 -C10 alkoxyalkyl, C1 -C10 carboxy, C -C10 alkoxycarbonyl, COuronide, CO-monosaccharide, CO-oligosaccharide, and CO-polysaccharide.
17. The method ofClaim I in which the compound is of Genus VI:

X3Ar

;/

Z R4
Genus VI
wherein

Ar is pyridinyl or phenyl;
ZisOorS;
X3 is H, F, Cl, OH, C113, or OCH3;
R2 is methyl, C(=O)H, C(0)CH3, C(=’O)OCH3, C(=O)O-glucosyl, fluorornethyl, difluoromethyl, trifluoromethyl, bromo, methylmethoxyl, methyihydroxyl, or phenyl; and
R4 is H or bydroxyl;
with the proviso that when R2 is trifluoromethyl, Z is 0, R4 is H and Ar is phenyl, the phenyl is not solely substituted at the 4’ position by H, F, or OR
IS. The method of Claim 1 in which the compound is of Genus VII:

- 71-

WO 2006/12214 PCT/1JS2006/017988

Y

wherein

Genus VII

X3 is H, halogen, C1 -C10 alkoxy, or OH;
Yb Y2, Y3, and Y4 are independently selected from the group consisting of
H, C1 -C10 alkyl, substituted C1-C10 alkyl, C1C10 alkenyl, C1-Cio haloalkyl, C1 -C10 nitroalkyl, C1-C10 thioaJkyl, C1-C10 hydroxyalkyl, C1 -C10 alkoxy, phenyl, substituted phenyl, halogen, hydroxyl, C -C10 alkoxyalkyl, C1-C10 carboxy, C1-Cio alkoxycarbonyl; and
1(4 is H, halogen, or OH.
19. The method ofClaim 18 in which the compound is:

20. A method oftreating or preventing a disease state in a subject, comprising identifying a subject at risk for or having a condition selected from an inflammatory condition and a fibrotic condition;
administering a compound to the subject in an effective amount to treat or prevent the condition;
wherein the compound exhibits an EC50 in the range of about 1 jtM to about 1000 [LM for inhibition of at least one p38 MAPK; and
wherein the effective amount produces a blood or serum or another bodily
fluid concentration that is less than an BC30 for inhibition of the at least one p38 MAPK.

-72-

WO 2006/122154 PCT/1JS20061017988

21. The method of Claim 20 in which the condition is selected from the group consisting of fibrosis, chronic obstructive pulmonary disease, inflammatory pulmonary fibrosis, idiopathic pulmonary fibrosis, bronchiolitis obliterans syndrome, chronic allograft fibrosis, rheumatoid arthritis; rheumatoid spondylitis; osteoarthritis; gout; sepsis; septic shock; endotoxic shock; gram-negative sepsis; toxic shock syndrome; myofacial pain syndrome (MPS); Shigellosis; asthma; adult respiratory distress syndrome; inflammatory bowel disease; Crobn’s disease; psoriasis; eczema; ulcerative colitis; glomerular nephritis; scleroderma; chronic thyroiditis; Grave’s disease; Omiond’s disease; autoimmune gastritis; myasthenia gravis; autoimmune hemolytic anemia; autoimmune neutropenia; thrombocytopenia; pancreatic fibrosis; chronic active hepatitis; hepatic fibrosis; renal disease; renal fibrosis, irritable bowel syndrome; pyresis; resteriosis; cerebral malaria; stroke and isehemic injury; neural trauma; Alzheimer’s disease; Huntington’s disease; Parkinson’s disease; acute and chronic pain; allergies; cardiac hypertrophy, chronic heart failure; acute coronary syndrome; cachexia; malaria; leprosy; leishmaniasis; Lyme disease; Reiter’s syndrome; acute synoviitis; muscle degeneration, bursitis; tendonitis; tenosynoviitis; herniated, ruptured, or prolapsed intervertebral disk syndrome; osteopetrosis; thrombosis; silicosis; pulmonary sarcosis; bone resorption disease; cancer; Multiple Sclerosis, lupus; fibromyalgia; AID; Herpes Zoster, Herpes Simplex; influenza virus; Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS); cytomegalovirus; and diabetes mellitus.
22. The method of Claim 20 in which the effective amount is less than 50% of an amount that causes an undesirable side effect in the subject.
23. The method of Claim 20 in which the compound inhibits a kinase in the SAPK signaling pathway.
24. The method ofClaim 20 in which the compound is a pirfenidone analog.
25. The method of Claim 20 in which the compound is of Genus la:

wherein

X4 X5R1 R2

X3 N / / R3
X2 XiO R

Genus Ia;

73-

WO 2006/122154 .PC1JUS20061017988

R1, R2, R3, and R4 are independently selected from the group consisting of
H, C -C10 alkyl, substituted C1-C10 alkyl, C1-C10 alkenyl, CI-Clo haloalkyl, C1-C10 nitroalkyl, C1-Cio thioalkyl, C1-Cio hydroxyalkyl, C1 -C10 alkoxy, phenyl, substituted phenyl, halogen, hydroxyl, C1-00 alkoxyalkyl, C1 -C10 carboxy, C1 -C10 alkoxycarbonyl, CO-uronide, COmonosaccharide, CO-oligosacebaride, and CO polysaccharide; and
X1, X2, X3, X4, and Xs are independently selected from the group consisting of H, halogen, alkoxy, and hydroxy.
26. The method of Claim 25, wherein the compound is a metabolite, hydrate, solvate, or prodrug of a compound of Genus Ia.
27. The method of Claim 20 in which the compound is of Genus Ib:

X3&N

0 R4

Genus 1b;
wherein

X3 is selected from the group consisting of H, halogen, C1-Cio alkoxy, and
OH;
R2 is selected from the group consisting of H, C1-C10 alkyl, substituted C1 -
C10 alkyl, C1-C10 hydroxyalkyl, C -C10 alkoxyalkyl, C1 -C10 carboxy, C1 -C10 alkoxycarbonyl, CO-uroriide, CO-monosaccharide, CO-oligosaccharide, and CO-polysaccharide; and
R4 is selected from the group consisting of H, halogen, and OH.
28. The method of Claim 27, wherein the compound is a metabolite, hydrate, solvate, or prodrug of a compound of Genus lb.
29. The method of Claim 20 in which the compound is ofGenus Ic:

X3QØ
0 R4

Genus Ic;
wherein
X3 is selected from the group consisting ofH, F, OH and OCH3;

- 74-

WO 2006/122154 PCT/US2006/01 7988

Compound Compound
Number

140;? FN
32. The method ofClaim 20 in which the compound is of Subgenus U:

Subgenus II;
wherein

X3 is selected from the group consisting of H, OH and OCH3;
R2 is selected from the group consisting of H, CH20H, COOH, CO
. Glucoronide, CH3, and CH20CH3; and R4 is selected from the group consisting of H and OH, with proviso that when X3 is OH, then R2 is not CH3.
33. The method of Claim 32, wherein the compound is a metabolite hydrate, solvate, or prodrug of a compound of Subgenus U.
34. The method ofClaim 20 in which the compound is of Subgenus Ill:

X3Ø

Subgenus ill;
wherein

X3 is selected from the group consisting of H, F, and OH; and
R2 is selected from the group consisting of H, Br, CH2F, CHF2, and CF3.
35. The method of Claim 34, wherein the compound is a metabolite, hydrate, solvate, or prodrug of a compound of Subgenus IlL
36. The method of Claim 20 in which the compound is of Subgenus IV:

- 77-

WO 20061122 154

REM

PC’r/US206/017988

X3Jh9

Subgenus IV
wherein X3 is selected from the group consisting of H, halogen, C1 -C10 alkoxy, OH, C1 -C10 alkyl, substituted C1C10 alkyl, C1-C10 alkenyl, C1 -C10 haloalkyl, C1-C10 nitroalkyl, CI-C10 thioalkyl, C1-C10 hydroxyalkyl, phenyl, substituted phenyl, C1-C10 alkoxyalkyl, C1 -C10 carboxy, CI -CIO alkoxycarbonyl, CO-uronide, CO-monosaccharide, CO-oligosaccharide, and CO-polysaccharide.
37. The method of Claim 36, wherein the compound is a metabolite, hydrate, solvate, or prodrug of a compound of Subgenus IV.
3S. The method ofClaim 20 in which the compound is of Subgenus \:

CF3

X3- -OØ

Subgenus V
wherein X3 is selected from the group consisting of H, halogen, C1 -C10 alkoxy, C1 -C10 alkyl, substituted C1 -C10 alkyl, Cl-C alkenyl, CI -CIO haloalkyl, C1-00 nitroalkyl, C1-C10 thioalkyl, C1-C10 hydroxyalkyl, phenyl, substituted phenyl, C1-C10 alkoxyalkyl, Cl-C10 carboxy, CI-CIO alkoxycarbonyl, CO-uronide, CO-monosaccharide, CO-oligosaceharide, and CO-polysaccharide.
39. The method of Claim 38, wherein the compound is a metabolite, hydrate, solvate, or prodrug of a compound of Subgenus V.
40. The method ofClaim 20 in which the compound is of Genus VI:

X3ArN
Z R4
Genus VI
wherein
Ar is pyridinyl or phenyl;
ZisOorS;

- 78-

WO 2006/122 154 PCT!US2006/01 7988

X3 is H, F, Cl, OH, CH3, or OCT-I3;
R2 is methyl, C=O)H, Ci=O)CH3, C(0)OCH3, CO)O-gIucosyl, fluoroinethyl, difluoromethyl, trifluoromethyl, bromo, methylmethoxyl, methyihydroxyl, or phenyl; and
R4 is H or hydroxyl;
with the proviso that when R2 is trifluoromethyl, Z is 0, R4 is H and Ar is phenyl, the phenyl is not solely substituted at the 4’ position by H, F, or OH.
41. The method of Claim 40, wherein the compound is a metabolite, hydrate, solvate, or prodrug of a compound of Subgenus VI.
42. The method of Claim 40, wherein the compound is selected from Compounds
14 to 32 as follows:

14 FN

CF
15 CH3-ON
.

0;?X

CH3
16
&N

17
ON
Y/

S;?Z

CHF2

19 ON

79

WO 2006/122154 PCTIUS2006/0 17988

F2HCy

32 NO

Ly)

OCH3

43. The method ofClaim 20 in which the compound is of Genus VII:

Y

94

. Genus VII

wherein

4

X3 is H, halogen, alkoxy, or OH;
Y1, Y2, Y3, and Y4 are independently selected from the group consisting of
H, CI-CIO alkyl, substituted CC10 alkyl, C1 -C10 alkenyl, C1 -C10 haloalkyl, C1C10 nitroalkyl, C1 -C10 thioalkyl, CI-C hydroxyalkyl, CI-Clo alkoxy, phenyl, substituted phenyl, halogen, hydroxyl, C1-00 alkoxyalkyl, C1 -C10 carboxy, C1 -C10 alkoxycarbonyl; and
R4 is H, halogen, or OH.
44. The method of Claim 43, wherein the compound is a metabolite, hydrate, solvate, or prodrug of a compound of Genus VII.
45. The method of Claim 44, wherein the compound is:
Br-,
1?’i’

L)

46. A method of identifying a pharmaceutically active compound, comprising: providing a library of compounds;

82

WO 2006/122154 PCT/tJS2006/017988

assaying a plurality of compounds from the library for inhibition of at least
one p38 MAPK; and
selecting at least one compound from the plurality of compounds, wherein
the selected compound exhibits an EC50 in the range of about 1 iM to about 1000
tM for inhibition ofthe at least one p38 MAPK,
47. A method ofidentifying a pharmaceutically active compound, comprising: providing a library of compounds;
assaying a plurality of compounds from the library for inhibition of TNFa secretion in a bodily fluid in vivo; and
selecting at least one compound from the plurality of compounds, wherein
the selected compound exhibits an EC50 in the range of about 1!IM to about 1000 M for inhibition ofTNFa secretion in a bodily fluid in vivo.
48. A method ofidentifying a pharmaceutically active compound, comprising: providing a library of compounds;
assaying a plurality of compounds from the library for inhibition of TNFct secretion by cultured cells in vitro; and
selecting at least one compound from the plurality of compounds, wherein
the selected compound exhibits an EC50 in the range of about 1 tM to about 1000 j.tM for inhibition ofTNFa secretion by cultured cell in vitro.
49. A method ofidentifying a pharmaceutically active compound, comprising: providing a library of compounds;
assaying a plurality of compounds from the library for inhibition of TNFct secretion in a bodily fluid in vivo; and
selecting at least one compound from the plurality of compounds, wherein
the selected compound exhibits an EC50 in the range of about 1 pM to about 1000 tM for inhibition ofTNFa secretion by cultured cells in vitro.
50. A method ofidentifying a pharmaceutically active compound, comprising: providing a library of compounds;
assaying a plurality of compounds from the library for inhibition of TNFo secretion by cultured cells in vitro; and
selecting at least one compound from the plurality of compounds, wherein
the selected compound exhibits an EC50 in the range of about 1 pM to about 1000 iM for inhibition ofTNFa secretion in a bodily fluid in vivo.

WO 2006/12214 PCT/US2006101 7988

51. The method of any one of Claims 47-50 further comprising determining a mammalian toxicity ofthe selected compound.
52. The method of any one of Claims 4750 further comprising administering the selected compound to a test subject.
53. The method of Claim 52 in which the test subject has or is at risk for having
an inflammatory condition.
54. The method of any one of Claims 47-50 wherein the p38 MAPK is selected
from the group consisting of p38ct, p3813, p38y, and p388.
55. The method of Claim 46 wherein the EC0 is obtained from a dose response

curve.

56. The method of Claim 46 in which the EC50 is in the range of about 50.tM to about 650 W.
57. The method of Claim 47 wherein the EC50 is obtained from a dose response

curve.

58. The method of Claim 47 in which the EC50 is in the range of about 50 pM to about 650 pM.
59. A compound having the formula of Subgenus HI:

X3Ø

Subgenus III;
wherein

X3 is selected from the group consisting of H, F, and OH;
R2 is selected from the group consisting ofH and CF3; and
wherein the compound exhibits an BC50 in the range of about 1 pM to about 1000 LM for inhibition of p38 MAPK; or a pharmaceutically acceptable
10 salt ester, solvate or prodrug ofthe compound.
60. The compound of Claim 59 in which the compound is selected from Compounds S to 12 as follows;

’? F

-84-

WO 2006/122154 PCTJUS2006J0I79$8

Compound
Number

Compound

CF3

&N

9
Ho-Q-Q

CF3
10

Ho_-c_--N;?/

ii
F&N;)/

CF3
12

F--?Q/, N0;?/

61. The compound of Claim 59 having an EC50 in the range of about 1 pM to about 1000 pM for inhibition of p38 MAPK.
62. The compound of Claim 61 in which the EC50 is in the range of about 50 p.M
to about 650 pM.
63. The compound of Claim 61 having an EC in the range of about I. iM to about 1000 pM for inhibition of TNFct secretion in a bodily fluid in vivo.
64. The compound of Claim 61 having an BC50 in the range of about 1 LM to about 1000 p.M for inhibition ofTNFc secretion by cultured cells in vitro.
65. A compound having the formula of Genus VI:

WO 2006/122154 PCT/US2006/0179$

X3-Ar

; /

z R4
Genus VI
wherein

Ar is pyridinyl or phenyl;

ZisOorS; X3 is H, F, Cl, OH, or OCI13; R2 is methyl, C(=O)H, C(=O)CH3, C(’=O)O-glucosyl, fluoroinethyl,
difluorornethyl, trifluoromethyl, methylmethoxyl, methyihydroxyl, or phenyl; and R4 is H or hydroxyl; with the proviso that when R2 is trifluoromethyl, Z is 0, R4 is H and Ar is
phenyl, the phenyl is not solely substituted at the 4’ position by H, F, or OH;

wherein the compound exhibits an EC50 in the range of about 1 IM to
about 1000 tM for inhibition of p38 MAPK; or a pharmaceutically acceptable
salt, ester, solvate or prodrug ofthe compound.
66. The compound of Claim 65, wherein the compound is selected from Compounds 14 to 32 as follows:

c’-’3

14
0

CF3

15 CH3_0c_Nj
0
0

16 ON

17

- 86-

WO 2006/122154 PCT/uS2006!017988

F2HC-
32

67. The compound of Claim 68 having an EC50 in the range of about 1 iM to about 1000 LM for inhibition of at least one p38 MAPK.
68. The compound of Claim 67 in which the BCo is in the range of about 50 pM
to about 650 pM.
69. The compound of Claim 67 having an EC30 in the range of about 1 pM to about 1000 tM for inhibition ofTNFa secretion In a bodily fluid in vivo.
70. The compound of Claim 67 having an BC50 in the range of about 1 pM to about 1000 pM for inhibition ofTNFct secretion by cultured cells in vitro.
71. A compound having the formula of Genus VII:

Y
Y2 R4

Y3,) ",5r- aNO

X3

Genus VII
wherein

X3 is H, halogen, aJkoxy, or OH;
Y1, Y2, Y3, and Y4 are independently selected from the group consisting of
H, C1-00 alkyl, substituted C1 -C10 alkyl, C1-C10 alkenyl, C1 -C10 baloalkyl, CI-Cjo nitroalkyl, Ci-C10 thioalkyl, C1 -C10 hy&oxyalkyl, C1-C10 alkoxy, phenyl, substituted phenyl, halogen, hydroxyl, CI-CIO alkoxyalkyl, C1-Cio carboxy, C1 -C10 alkoxycarbonyl;
R4 is H, halogen, or OH; and

CU
-89-

WO 2006/122154 PCT/US2006101 7988

wherein the compound exhibits an BC50 in the range of about 1[LM to
about 1000 iM for inhibition of p38 MAPK; or a pharmaceutically acceptable
salt, ester, solvate or prodrug ofthe compound.
72. The compound of Claim 71 having an BC50 in the range of about 1 iM to about 1000 J.LM for inhibition of at least one p38 MAPK.
73. The compound of Claim 71 in which the BC50 is in the range of about 50 iM
to about 650 pM.
74. The compound of Claim 71 having an BC50 in the range of about 1 jiM to about 1000 pM for inhibition ofTNFa secretion in a bodily fluid in vivo.
75. The compound of Claim 71 having an BC50 in the range of about 1 p.M to about 1000 pM for inhibition ofTNFa secretion by cultured cells in vitro.
76. The compound of Claim 71, having the formula:

77. The compound of Claim 71 having an BC50 in the range of about 1 pM to about 1000 pM for inhibition of at least one p38 MAPK.
78. The compound of Claim 71 in which the EC50 is in the range of about 50 pM
to about 650 J.LM.
79. The compound of Claim 71 having an EC50 in the range of about 1 pM to about 1000 pM for inhibition ofTNFa secretion in a bodily fluid in vivo.
80. The compound of Claim 71 having an BC50 in the range of about 1 pM to about 1000 p.M for inhibition ofTNFa secretion by cultured cells in vitro.
81. A pharmaceutical composition comprising the compound of Claim 59 and a pharmaceutically acceptable excipient.
82. A pharmaceutical composition comprising the compound of Claim 65 and a pharmaceutically acceptable excipient.
83. A pharmaceutical composition comprising the compound of Claim 71 and a pharmaceutically acceptable excipient.
84. The pharmaceutical composition of Claim 81, wherein the composition contains an amount of said compound that is selected for administration to a patient on a

90

dy

ZIA

WO 2006/122154 PCT/1JS2006/017988

schedule selected from: twice a day, once a day, once every two days, three times a week, twice a week, and once a week.
85. The pharmaceutical of Claim 82, wherein the composition contains an amount
of said compound that is selected for administration to a patient on a schedule selected from: twice a day, once a day, once every two days, three times a week, twice a week,

and once a week.

86. The pharmaceutical composition of Claim 83, wherein the composition contains an amount of said compound that is selected for administration to a patient on a schedule selected from: twice a day, once a day, once every two days, three times a week, twice a week, and once a week.
87. The method of Claim 20, wherein said compound is administered to said subject on a schedule selected from: twice a day, once a day, once every two days, three times a week, twice a week, and once a week.
88. The method of Claim 21, wherein said compound is administered to said subject on a schedule selected from: twice a day, once a day, once every two days, three times a week, twice a week, and once a week.
89. The method Claim 21, wherein the condition is bronchiolitis obliterans syndrome.
90. The method Claim 21, wherein the condition is chronic allograft fibrosis.
91. The method Claim 21, wherein the condition is idiopathic pulmonary fibrosis.
92. The method of Claim 21, wherein the condition is chronic obstructive pulmonary disease.

91- / \

Cell Stress
(DNA damage, heat, osmotic shock) Exogenous Agents (anisomycin, NA arsenite, LPS)
Environmental Stimuli

(cigarett smoke,
allergens)

(PriorArt) 7A6

FIG. IMKK

/ 08 MAP \

IL-i, TNFa Translation

2

?MKK316

C/\’_____ p38MAP \s/ Nucleus

HSP27

Transcription

CAP._LTJ!_Y_AAAA
= Au-rich motif

E.

4-

WO 2006/122154 PCT/US2006/01 7988

1

.

0.8

0.6

OA

0.2

11

2/7

P1rEC50 = 503 pM
5 OH EC50 = 684 PM
COOK EC50 = 1053 pM
5 methyl ether EC50 = 1107 pM
3 OH EC50 = 1454 pM
40HEC50= 174 g

10 100 1000 10

Compound (tM)

FIG. 2

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 2006/122154 PCT/LJS2096/01 7988

1

0.6

04

0.2

0

3/7

P1rEC50 = 462 iM
5 OH EC50= 1059.tM
COON EC50 = 986 jiM
5 methyl ether EC50 = 1743 jiM
3 OH EC50 = 1496 jiM
4 OH EC50 = 288 jiM

10 100 1000 104 Compound (jiM)

FIG. 3

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

P38a P33y
40H 288 g 1741M

P38a P38

N

50H 1059 j.tM 684

P38a P38w jS < 5000H 986 M 1053.tM
Pir 462 M 503 jiM

ether 1743 jiM 1107 jiM

P38a P38y
30H 1496 jiM 1454 jiM

Inhibitor concentration [M]

P38a Pirfenidonetn 5-Gucoronide L -

P38’ Pirfenidone
FIG 4 5-G!ucoronde______________________________

I

1.2

C

0.8H

 - 0.6-.
C

 (C
C,) O4
111 nl 0.
 I
C

02F
30
C
I-

0)

200 400 600 800 1000 1200 1400 100 1UUU ZUUU

Compound (jiM)

FIG. 5

- Pit 1

- - 0" 5GOOH

- - A - 5 glucuronido
- . 30H
A 401-I

 h Analog (dimethyl ether)

WO 2006/122154 PCT/US2006/0 1798$

?0?

6/7

-

FO ! It1t

0 100 250 500 750

Compound (tM)

FIiI& 2000

Pirfenidone
0 4-bydrnxyPirfenidone

T

50

40 E

-1 30

q3
200

10

- ’U

-60

-50
IC
- 40

-20

L10

-

0 250 500 750 1000 2000

Compound (!IM)

c’i ir-r’r--r1 (ID1 U

/t
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 2006/122154 PCT/US200610 17988

7/7

I

IR,IU1I1 iilIIrL’I

0 100 250 500 750 1000 2000

1
Compound (jiM)

FIG. 6

(Continued)

- 35
30

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

0

0

(12) IN’IERNXI’IONAL API’IJCATION PUBLISHED UNDER THE I’ATEN’l’ CO(.)I’URA’I’ION ’I’REATY (PCT)

(1.9) World Intellectual Property OrganizationInLernational Bureau I IN IIIIIiIlUtIIIlftII}IIIIlIIftIIUItllt

(43) International Publication Date (10) International Publication Nuinhei’
16 November 2006 (16.11.2006) PCT (10)

2006/122154 A3

(51) International Patent Classification;
j1611< 31/44 (2006.01) tlhlP 11/00 (2(X)6.01)
MIK 31/4412 (2006.01) A611’13112 (2006.00
A6193114704 (2006101) zt6IP 29/00 (2(x)6.011
A61 9/00(2006.01) A61114.3100 (2006.01)

(21) Internalinual Application Number;
PC’I’/US2006/0 7988

(22) International Filing Date 9 May 2006 (091)52006)

(25) Filing Language: English

(74) Agent: MALLO,Joseph; 2040 Main Street, 14th hour, Irvine, California 92614 (US).

(81) Designated States (un/ext otherwise indicated, for creTe kind of national protection available): Alt, AG, AL, AM, AT, AU, AL, BA, IIB, EU, 13R BW, BY, BZ, CA. CFI, CN, CO. CR, CU, CZ, DE, DK, OM, DZ, EC, Eli, lIG, ES, El, OR, GD, GE, (ill, GM, HR, 1111, ID, 11.., IN, IS, JP, KU,
KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,LU, LV,
LY, MA, MD. MG, MK, MN, MW. MX. MZ, NA, NO, NI,
NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SI), SE, SG,
8K, S1, SM, SY. ’I’). TM, TN, TR, TI, ’17.. 1/A, UG, US,
117., VC, VN, YU, ’LA, ’LM, ’LW.

(26) Publication Language: English (84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (13W, (111,

(30) Priority Data- GM, KU, US, MW, ML, NA, SD, SL, SZ, ’17., hG, ZM,
60/679,471 10 May 2005(10.052005) US LW), Eurasian (AM, AL. BY, KG, KZ, MD, RU, ’I’), ’I’M),

I NT-be"005rut ii ’flfl\ T1.(European (A’I’, BE. BU. Cl-i, CY, C?.. DE, DK, EU, ES, UI, -..........FR,OB,UR,HU,IE,IS,J’LUILU,LV,MC,NL,PL,P’L
(71) Applicant (for all designated States except US): INTER- RO, SE, SI, SK, TR), OAPL (BF, B), CF, CG, Cl, CM, GA,
MUNE, INC. [US/US]; 3280 Bayshore Boulevard, this- ON, GQ, OW, ML, MR, Nit, SN, TO, T(i).
bane, California 94005 (1/5). Published:
with international search report

(72) Inventors; and -- before the expiration of the tune limit for amending the
(75) Inventors/Applicants (for US only): BLATT, Lawrence, claims and to be republished in the event of receipt of’
M tJS/USj; 10 Shoreview, San Francisco, California amendments
- 94121 (US). SEIWERT, Scott, 0. lUS/US; 828 Rock-
away Beach Avenue, Pacifica, California 94044 (US). (8) Date of publication of the International search report:

26 July 2007
ItEt(;ELMAN, Leonid tUS/US; 991 U. Grant P1., San
Mateo, California 94402 (US). RADHAKRISHNAN For two.letxer codes and other abbreviations, refer to the "Guid.
_ S Rawachandran [US/US]; 40623 Palatirto Street, Fre- ance Notes on Codes andAbhreviarions" appearing at the begin-
taUnt, California 94539 (US). rzing ofeach regular issue of the I’Cl’ Gazette.

S

(54) Title: PYRIDONF DERIVATIVES FOR MODITLA’flNG STRESS-ACTIVATE!) PROT}IJN KINASII SYSTEM

S

S
S
S
S
S

1.2

0 2,00 400 600 Boo 1000 7200 1400 1600 1800 21X

1.

::\

c Pit 1
 A-- 5011
- ’G- SCOOH
- .t - S q!ucurotadtt
- - .-- 3011

- - e Analog (d/methyl

Compound (pM)

(57) Abstract: Disclosed are methods of modulating a sirens activated protein kirotse (SAPK) system with an active compound,
wherein the active compound exhibits low potency for inhibition of at least one pI8 MAPK; and wherein the contacting is conducted
at a SAI5K-rnoclulating concentration lht is at a low percentage inhibitory coflcentration for inhibition of the at least one p38 MAPK
by the compound. Also disclosed are derivatives of pirfenidone. These derivatives can modulate a stress activated protein kinase

(SAPK) system. 4

[J

IM I ttlI’IA I IUP4PL)MtI_I1 Kt1-’UIl I
fInternational application No

ciius2006i01 7988

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV, A6101/44 A61K31!4412 A6101/4704 A61P9/00 A61P11/00
A61P13/12 A61P29/00 A61P43/00

According to International Patent Classification (IPC)or to both national classification and PC
B. FIELDS SEARCI-lED
Minimum documentation searched (Classification System followed by classification symbols)
A61K

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)

EFO-Internal, WPI Data, CFEM ABS Data, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category* Citation of document. With indication, where appropriate, of the relevant passages Relevant to claim No.

X OZES 0 N ET AL: "697 Preclinical activity 9,10,
of pirfenidone 21-23,
(5-methyl-1pheny1-2(IH)-pyri done) in 25,26,
cell -based models of nonalcoholic 87-92
steatohepati ti s"
HEPATOLOGY, WILLIAMS AND WILKINS,
BALTIMORE, MD, US,
vol. 38, 2003, page 495, XP004623912
ISSN: 0270-9139
the whole document

- I--

[J Further documents are listed in the continuation 01 Box C. [] See patent family annex
Special categories of cited documents: T later document published after the international tiling date
or priority date and not in conflict with the application but A document defining the general slate of the an which is not cited to understand the principle o(theory underlying the

considered to be of particular relevance invention

E earlier document but published on or after the international X document of particular relevance: the claimed invention filing date cannot be considered novel or cannot be considered to
L document which may throw doubts on priority claim(s) or involve an inventive step when the document is taken atone
which is cited to establish the publication date of another Y document of particular retevance: the claimed invention
citation or Other special reason (as specified) cannot be consirierect to involve an inventive step when the
0 document referring to an oral disclosure, use, exhibition or document is combined with one or more other such docu-
other means menis, such combination being obvious to a parson skilled

P document published prior to the international tiling date but in the art.
later than the priority date claimed document member of the seine patent family
Date of the actual completion of the international search Date of mailing of the International search report

15 March 2007 29/05/2007

Name and mailing address of the ISAI Authorized officer
European Patent Office, PB, 5818 Patentlaan 2
NL 2280 HV Rijswijk

Tel. (+31-70) 340-2040, Ix. 31 651 epo ni, Taylor, Mark Fax; (+31-70) 340-3016
FOr,,, PGlfISAf2lO (second sheet((April 2005)

lPrrDRl ATltM Al A -s

fl

International application No

C(ContnutIon). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category CjtaThn of document with incEcaltor,, where appropriate, at the relevant passages Relevant to claim No.

X WO 03/068230 A (PHARMACIA CORP [US]; 9,10,
DEVADAS BALEKUDRU [US]; WALKER JOHN [US]; 21-23,
SELNESS) 21 August 2003 (2003-08-21) 25,26,
87-92
the whole document
abstract
page 5
page 142, line 10 - page 147, line 13
examples 1-733
page 902, line 19 - page 912, line 24

X GB 1 458 049 A (AFFILIATED MED RES) 9,10,
8 December 1976 (1976-12-08) 21-23,
25,26,
87-92

page 1, line 12 - line 15
page 1, line 44 - line 49
example 1

X US 4 052 509 A (GADEKAR SHREEKRISHNA M) 9,10, 4 October 1977 (1977-10-04) 21-23, cited in the application 25,26,

87-92
abstract
column 2, line 24 - line 36
column 6, line 1 column 8, line 21
column 9, line 47 - line 55
claims 1-6

X US 3 974 281 A (GADEKAR SHREEKRISHNA M) 9,10,

10 August 1976 (1976-08-10) 21-23, cited in the application 25,26,

87-92
abstract
column 5, line 40 column 9, line 63
claims 1-8

X WO 2005/000818 A (WARNER LAMBERT CO [US]; 9,10,

BLACK SHANNON LEIGH [DE]; KAUFMAN MICHAEL 21-23, DAVI) 6 January 2005 (2005-01-06) 25,26,

87-92
abstract

page 2, line 14 - page 6, line 35
examples 95-100
claims 1-15

X WO 2004/105684 A (INTERMUNE INC [US]; 9,10,
BLATT LAWRENCE M [US]; SEIWERT SCOTT 0 21-23,
[US]; OZES) 9 December 2004 (2004-12-09) 25,26,
87-92
abstract

paragraph [1175] - paragraph [1189]

paragraph [2535] paragraph [2536] example 4

F,m TIlSAJ2o (mntinution of second,.hoar) (April 2005)

International application No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT I PCT/1JS2006/017988
I Box II Observations where certain claims were found un5earchable (Continuation of item 2 of first sheet) I

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

Claims Nos.:

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely;

Although claims 1-45 and 87-92 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged
effects of the compounds/compositions.

2. MClaims Nos.: 1-7,20
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:
see FURTHER iNFORMATION sheet PCT/ISA/210

3. liii] Claims

because lt-iey are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a),

I Box Ill Observations where unity of invention Is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet) I

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

see additional sheet

I []As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all

searchable claims.

2. [1] As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment

of any additional fee.

[I]As only some of the required additional search tees were timely paid by the applicant, this International Search Report

covers only those claims for which tees were paid, specifically claims Nos.:

{j] 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:

see annex

Remark on Protest [J The additional search fees were accompanied by the applicant’s protest.
LINo protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCTIISN210 (continuation of first sheet (2)) (January 2004)

F-

S

International Application No. PCT/US2006 /017988

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCl/ISA! 210

Continuation of Box ILl

Although claims 1-45 and 87-92 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compounds/compositions.

Continuation of Box 11.2

Claims Nos.: 1-7,20

The expression "wherein the contacting is conducted at a SAF’K-modulating concentration that is less than the EC50/ EC30 / EC20 for inhibition of

at least one p38 MAPK by the compound (Cf. inter alia Claims 1, 3, 4, 20), represent unacceptable functional features which put the skilled man under undue burden in order to determine the scope of the claimed subject-matter. As such, the requirments of Art. S and 6 PCT are not fulfilled and these aspects will not be searched.

Similarly, the remaining functional features of claims 1-7 cannot and will not be searched.

Claim 8 is not supported in that it has not been demonstrated that any compound having a pyridone ring is active and useful in any of the many indications claimed.

The expressions "analog", "metabolite" and "prodrug" (cf. inter alia, claims 10, 24, 26, 28, 30, 33, 35, 37, 39, 41, 44, 59, 65 and 71) are so vague and indefinite that they have been ignored for the purposes of the search.

The search was consequently restricted to the specifically disclosed compounds, cornpisitions and their uses as defined in claims 9, 10,
21-23, 25,26 and 87-92.

The applicant’s attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the [P0, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be
overcome.

/L7

International Application No. PCT/1152006 /017988 FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT1ISAI 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:
1. claims: 1-8,9,10,20-23,25,26,87-92
Compounds of Genus la, compositions comprising them, and
their use in medicine.

2. claims: 1-8,11,20-23,27,28,87-92

Compounds of Genus lb, compositions comprising them, and their use in medicine.

3. claims: 1-8,12,20-23,29-31,87-92
Compounds of Genus Ic, compositions comprising them, and
their use in medicine.

4. claims: 1-8,13,20-23,32,33,87-92
Compounds of Genus II, compositions comprising them, and
their use in medicine.

5. claims: 1-8,14,20-23,35,59-64,81,84,87-92

Compounds of Genus III, compositions compristng them, and their use in medicine.

6. claims: 1-8,15,20-23,36,37,87-92
Compounds of Genus IV, compositions comprising them, and
their use in medicine.

7. claims: 1-8,16,20--23,38,39,87-92
Compounds of Genus V. compositions comprising them, and
their use in medicine.

8. claims: 1-8,17,20--23,40--42,65--70,82,85,87-92
Compounds of Genus VI, compositions comprising them, and
their use in medicine.

9. claims: 1-8,18,20-23,43-45,71-80,83,86,87-92

Compounds of Genus VII, compositions comprising them, and their use in medicine.

0
IT)Wmational App)ication No. PCT/US 2006 /017988
FURTHER INFORMATION CONTINUO FROM PCT/ISA/ 210 I

10. claims: 20-23,24,87--92
Compositions comprising pirfenidone analogues, and their use
in medicine.

11. claims; 46,54-6
Methods of screening for active compounds having p38 MAPK inhibitory activity.

12. claims: 47-53,5758
Methods of screening for active compounds having TNF-alpha secretion inhibitory activity.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
sppticatlon No

Intormetlon on patent family members PCT/US2006/0 17988 1 1

Patent document Publication Patent family Publication
oiled in search report date mernbe(s) date

WO 03068230 A 21-08-2003 " AU 2003217433 Al 04-09-2003
BR 0307631 A 21-12-2004
CA 2476012 Al 21-08-2003
CN 1646125 A 27-07-2005
EP 1490064 Al 29-12-2004
HR 20040707 A2 31-12-2004
Is 7374 A 26-07--2004
JP 2005531501 T 20-10-2005
JP 2007023053 A 01-02-2007
MA 27268 Al 01-04-2005
MX PA04007470 A 10-11-2004
NZ 534395 A 27-10-2006

OA 12771 A 04-07-2006 ---
GB 1458049 A 08-12-1976 AU 6374673 A 19-06-1975
DE 2362958 Al 27-06-1974
DE 2366349 C2 27-03-1986
ES 421598 Al 01-01-1977
FR 2232316 Al 03-01-1975
GB 1458048 A 08-12-1976
49087677 A 22-08-1974
NL 7317316 A 20-06-1974

4052509 A 04-10-1977 NONE

3974281 A 10-08-1976 CA 1049411 Al 27-02-1979

DE 2555411 Al 10-06-1976 ---
WO 2005000818 A 06-01-2005 NONE - -

WO 2004105684 A 09-12-2004 NONE

Form FCT!lSAJ2l0 (paled taroiW a-ursa) (April 2005)

/10

DERIVADOS DE PIRIDONA PARA MODULAR EL SISTEMA DE PE.OTEfNA CINASA ACTIVADA POR ESTRES

CANPO DE LA INVENCION

5 Esta invenciôn se ref iere a compuestos y mØtodos
empleados en el tratamiento de varias condiciones inflamatorias y/o condiciones fibróticas, qua incluyen
aquellas asociadas con la actividad mejorada de cinasa p38.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÔN
Se ban reconocido un gran nümero de condiciones
crØnicas y agudas por estar asociadas con la perturbación

10 de la respuesta inflamatoria. Un gran nimero de citocinas

participan en esta respuesta, incluyendo IL -1, IL -6, IL -8 y
15 TNFo. Parece que la actividad de estas citocinas en la
regulación de inflamaciôn, puecle estar asociada con la activación de una enzima de la trayectoria de sefIalización
celular, un elemento de la familia de cinasa MAP, en
general, conocida como p38 y tambiØn conocida corno SAPK,
20 CSBP y RK.
Varios inhibidores de p38, tales coma NPC 31169,
&8239063, SB203580, FR-167653, y pirfenidona, han sido probadas in vitro y/o in viva, y se encuentran ser efectivas para modular las respuestas inflamatorias.
25 Existe una continua necesidad de fÆrmacos seguros

y efectivos para tratar varias condiciones i.nflamatorias y/o condiciones fibróticas, tales coma fibrosis pulmonar inflamataria y/c, fibrosis pulmonar idiopÆtica.

5 SiIMARIO DE LA INVENCION

Una modaildad de la presente invención, es un
rnØtodo para modular ui-i sistema de proteina cinasa activado
por estrØs (MAPK), que incluye contactar un compuesto con
una proteina cinasa activada par mitógeno p38 (MAPK)1 en
10 donde ci compuesto exhibe un EC50 en ci intervalo de aproximadamente 1 iM hasta aproximadamente 1000 pM par inhibiciÆn de al menos, una p138 MAPK; y en donde ci cantacto se conduce en una concentración que modula ci SAPK
que es mertor que una EC30 par inhibición de al menos una
15 p38 MAPK par ci compuesto.
Otra modalidad de la presente invenciôu, es un
mØtoda para tratar a prevenir un estado de enfermedad en un sujeto, que incluye, identificar un sujeto en riesgo de
que tiene una condición seleccionada de una condiciOn
20 inflamatoria y una condición fibrótica; administrar un compuesto con un sujeto en una cantidad efectiva para tratar a prevenir la condiciôn; en donde ci compuesto exhibe un EC, 0 en ci intervalo de aproximadamente 1 pM hasta aproximadamente 1000 pM par irihibición de al menos,
25 una pp38 MAPK; y en donde la caritidad efectiva produce una

sangre a un suero u otra concentración de fluido corporal que es menor que un EC50 para inhibición de al menos, una p138 MAPK.
Otra modalidad de la presente invenciôrt es un
5 mØtodo para identificar un compuesto farmacØuticamente activo, que incluye: proporcionar una biblioteca de compuestos; ensayar una pluralidad de compuestos a partir
de la biblioteca par inhibición de al menos, una p38 MAPK;
y seleccionar al menos un compuesto a partir de la
10 pluralidad de compuestos, en donde el compuesto seleccionado exhibe un EC53 en el intervalo de aproximadamente 1 iM hasta aproximadamente 1000 11M par inhibiciôn de al menos una p138 MAPK.
Otra modalidad de la presente invenciOn, es Ufl
15 mØtodo para identificar un compuesto farmacØuticamente activo que incluye: proporcionar una biblioteca de compuestos; someter a ensayo una pluralidad de compuestos a partir de la biblioteca para inhibición de la secreción de TNFc en nfl fluido corporal in viva; y seleccionar al menos
20 un compuesto a partir de la pluralidad de compuestos, en donde el compuesto seleccionado exhibe un EC0 en el intervalo de aproximadamente 1 iM hasta aproximadamente 1000 iM par inhibición de la secreción de TNFc’ en un fluido corporal in viva.
25 Otra modalidad de la presente invención, Cs un

ID

mØtodo para identificar un compuesto fartuacØuticamente activo, que incluye: proporcionar una biblioteca de
compuestos; someter a ensayo una pluralidad de compuestos a
partir de la biblioteca por inhibición de la secreciÆn de
5 TNFcx por cØlulas cultivadas in vitro; y seleccionar al menos, un compuesto a partir de la pluralidad de compuestos, en donde el compuesto seleccionado exhibe un EC50 en el intervalo de aproximadamente 1 iiM hasta aproximadamente 1000 p.M por inhibición de la secreción de
10 TNFa por cØlulas cultivadas in vitro.
Otra rnodalidad de la presente invención, es un
mØtodo para identificar un compuesto farmacØuticamente activo, que incluye: proporcionar una biblioteca de
compuestos; someter a ensayo una pluralidad de compuestos a
15 partir de la biblioteca por inhibición de la secreción de
TNFc en un fluido corporal y seleccionar al menos,
un compuesto a partir de la pluralidad de compuestos, en donde el compuesto seleccionado exhibe un EC50 en el intervalo de aproximadamente 1 1.XM hasta aproximadamente
20 1000 iM por inhibición de la secreci6n de TNFc por cØlulas
cultivadas vitro.
Otra modalidad de la presente invenciôn es un
mØtodo para identificar un compuesto farmacØuticamente activo que incluye: proporcionar una biblioteca de
25 compuestos; someter a ensayo una pluralidad de compuestos a

V

partir de la hiblioteca para inhthiciÆn de la secrec–ôn de TNFo pot’ cØlulas cultivadas in vitro; y seleccionar al menos, un compuesto de la pluralidad de corupuestos, en donde ci compuesto seleccionado exhibe un EC0 en el
5 intervalo de aproximadamente 1 iiM hasta aproximadamente 1000 pM pot’ inhibiciôri de la secreción de TNFc en un fluido corporal in vivo.
Otra modalidad de la presente invenciÆn es un
compuesto que tiene la formula del SubgØnero III:

10

X3-&N;/

SubgØnero III;
15

En donde X3 se selecciona a partir del grupo que
consiste de H, F y OH; y R2 se selecciona del grupo que consiste de H y CF3; y en donde el compuesto exhibe un EC50
en el intervalo de aproximadamente 1 PM hasta
20 aproximadamente 1000 pM pot’ inhthiciOn de p38 MAPK; o una
sal, ester, solvato o profÆrmaco del compuesto, farrnacØuticamente aceptable.
Otra modalidad de la presente invenciOn es un
compuesto que tiene la fOrmula del GØnero IV:
25

(S

X3Ar 0/
5 GØnero VI

En donde Ar es piridinilo o fenilo; Z es 0 u S;
X3 es H, F, Cl, OH, U OCH3; R2 es metilo, C(0)H, C(=O)CH3,
C (=O) 0-glucosilo, [luorometilo, dii luorometilo,
10 trifluorometilo, metilmetoxi, metilhidroxilo, o fenilo; y
R4 es H o hidroxilo; con la provision de que cuando R2 es
trifluorometilo, Z es 0, R4 es H y Ar es fenilo, el fenilo
no es solamente sustituido en la posiciori 4’ por H, F u OH;
en donde el compuesto exhibe un EC50 en el intervalo de
15 aproximadamente 1 M hasta aproximadamente 1000 iM por
inhibición de p38 MAPK; o una sal, Øster, solvato o
profrmaco del compuesto, farmacØuticamente aceptable.
Otra modalidad de la presente invenciOn, es un
compuesto que tiene la fOrmula del GØnero VII:
Yl
20
Y2 R4
Y3 O

X3
25 GØnero VII

En donde X: es H, halôgeno, alcoxi CCi0 U OH;
Y, Y7, Y3 y Y4 son seleccionados independientemente del
grupo que consiste de H, aiquilo C1 -C.1, aiquilo C:j-CjQ
sustituido, aiquenilo C1 -C1, haloalquilo
5 nitroalquiio C1 -C10, tioalquilo C1 -C, hidroxialquilo C]-C1o,
alcoxi C1 -0O3 fenilo, fenilo sustituido, halógeno,
hidroxilo, alcoxialquilo C] --C10, carboxi
alcoxicarbonilo C1 -C10; R4 es H, haiôgeno U OH; y en donde
ci compuesto exhibe un EC53 en el intervalo de
10 aproximadamente 1 pN hasta aproximadamente 1000 iM por inhibiciÆn de p38 MAPK; o una sal, 6ster, solvato o profÆrmaco del compuesto, farmacØuticamente aceptable.
Una modalidad adicional de la presente invención,
Cs una composiciôn farmacØutica que contiene un compuesto
15 que tiene una fórmula como se describe anteriormente y un
excipiente farmacØuticamente aceptable.
Estas y otras modalidades se describen en mâs
detalle posteriormente.

20 BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

S L a Figura 1 es una representacidn esquernÆtica de la cascada de seflalización de p38 MAPK (tØcnica anterior,
Figura 1, de Underwood et al. 2001 Prog Respir Res 31:342-
345). Esta representaciôn esquemÆtica muestra la activaciôn
25 de la cascada de seæalización de p38 por una variedad de

estImulos y los efectos corriente debajo de la activaciân p38 en una respuesta inflamatoria travØs de la activación transcripcional y traducción/estabilizaciôn de ARNm.
La Figura 2 es un trazo que muestra la inhibiciôn
5 fraccional de p38y par varios metabolitos de pirfenidona y
anâlogos coma una funciôn de la concentraciôn de los compuestos. Las concentraciones de EC50 de estos compuestos, se muestran a la derecha del trazo. Una descripción detallada del erisayo se puede encontrar en el
10 Ejemplo 5.
La Figura 3 es un trazo que muestra la inhthición
fraccional de p38c par varios metabolitos de pirfenidona y anÆlogos, coma una función de la concentración de los compuestos. Las concentraciones de EC-50 de estos
15 compuestos, se muestran a la derecha del trazo. Una descripciôn detallada del ensayo se puede encontrar en el Ejemplo S.
La Figura 4 es un sumario de los datos
bioqulmicos para varios metabolitos y anÆlogos de
20 pirfenidona. Los metabolitos y anÆlogos de pirfenidona referidos en las Fiquras 2, 3, 5 y 6, se describen par el patron de sustituciOn mostrado en la Figura 4. El sumario muestra ci etecto de las sustituciones en tres posiciones
en las concentraciones de EC50 par inhibiciOn de p38c y
25 p38y.

La Figura 5 es un trazo que muestra la actividad
fraccional (liberaciÆn de TNFc de macrófagos en respuesta a UPS) de varios metabolitos de pirfenidoria y anÆlogos como una función de la concentración de cada compuesto. Una
5 descripción detallada del ensayo se puede encontrar en el
Ejemplo 5.
La Figura 6 es una serie de diagramas de barras
que muestran la citotoxicidad de varios metabolitos y anÆlogos de pirfenidona a concentraciones de los
10 compuestos. La citotoxicidad se determinó midiendo la liberación de LDH despus de la Incubación de cØlulas en la presencia del compuesto. La cantidad de LDH liberada es normalizada con aquella liberada despuØs del tratamiento
con Triton-X-100 y trazada contra la concentración del
15 compuesto.

DESCRIPCION DETALLADA DE LAS MODALIDADES PREFERIDAS

Se ha descubierto ahora que, un efecto
terapØutico elevado en el tratamiento de varios trastornos
20 asociados con la actividad mejorada de cinasa p38, se puede
lograr usando un compuesto inhibidor de cinasa p38 relativamente de baja potencia.
Por lo tanto, en una modalidad, se proporciona un
mØtodo para modular un sistema de cinasa activadopor
25 estr.,s(SAPK).contactando un compuesto con una proteIna

cinasa act ivada por rnitdgeno p38 (MAPK), Un compuesto
preferido, exhibe un EC,0 en ci intervalo de aproximadamente 1 pM hasta aproximadamente 1000 PM, preferiblemente, aproximadamente 50 pM hasta
5 aproximadamente 650 viM, por la inhibición de al menos, un
p38 MAPK. La concentraciÆn en la cual ci compuesto es contactado con la p38 MAPK es en general, menor que la EC50
pot inhibición de la p38 pot este compuesto.
Preferiblemente, la concentración es menos de EC20, aian mÆs
10 preferiblemente, la concentración es menos de EC10.
"Protelnas cinasas activadas pot mitôgeno
(MAPKs)", son cinasas de serina/treonina evolucionariamente conservadas, involucraclas en la regulaciÆn de muchos eventos celulares. Varios grupos de MAPK han sido
15 identificados en cŒlulas de mami.fero, que incluyen, cinasa
regulada pot la sefIal extracelular (ERK), p138, y SAPK/JNK.
Se cree que las MAPK son activadas por sus cinasas MAPK especIficas (MAPKKs): ERK por MEK1 y MEK2, p38 pot MKK3 y
MKK6, y SAPK/JNK por SEK1 (tambiŒn conocida como MKK4) y
20 MKK7 (SEK2). Estas MAPKKs tambiØn pueden ser activadas por
varias cinasas MAPKK (MAPKKKs) tales como Raf, MLK, MEKK1,
TAK1, y ASK1.
Se cree que la red de MAPK involucra al menos,
doce cinasas de serina-treonina dirigidas pot prolina,
25 altamente conservadas, clonadas, las cuales, cuando se

activan par estrØs celular (estrØs oxidativo, daflo de ADN, \ choque por calor u osmôtico, irradiaciôn ultravioleta, isquemia-reperfusiÆn), agentes exôgenos (anisomicina,
arsenita Na, lipopolisacÆrido, LPS) o citocinas po-
5 inflamatorias,.TNF-c e IL -1, pueden fosforilar y activar
otras cinasas o proteInas nucleares tales como factores de transcripciÆn en ya sea, el citoplasma o el nücleo (Fig.
1)

10 p38 MAPK
Comb se usa en este documento, "p38 MAPK", es un
elemento de la familia de protelna cinasa activada par estrØs, la cual incluye al menos, 4 isoformas (cx, I, Y’ ö), varias de las cuales son consideradas importantes en los
15 procesos criticos a la respuesta inflamatoria y
remodelación de tejido (Lee et a1 2000 Immunopharmacol.
47:185-201). Las cinasas predominantes en monocitos y
magrófagos p38a y p38l3 parecen ms ampliamente expresadas,
comparadas con p387 (müsculo esqueleto) o p38 (testiculos,
20 pancreas, próstata, intestino delgado, y en glÆndulas
salivares, ptuitaria y adrenales) - La isoforma p38y es
expresada en miofibroblastos, los cuales tienen algunas similitudes fenotipicas a cØlulas musculares que incluyen, expresión de actina del müsculo suave alfa. Se han
25 identificado un ntimero de sustratos de cinasas p38 MAP, que

/2/

incluyen otras cinasas (MAPKAP K2/3, PK, MNK 1/2, MSK1/RLPK, RSK-B), factores de transcripciôn (ATF2/6,
factor -2 intensificador del monocito, factor- de
transcripción nuclear, CMOP/GADD153, Elki y SAP -1A1) y
5 proteinas citosólicas (estatmina), muchos de los cuales son
fisiolôgicamente importantes -
Jiang, Y. et al. 1996 J.8iol Chem 271:17920-
17926, reporta la caracterizaciÆn de p38P como una proteina
de 372 aminoÆcjdos estrechamente relacionados con p38 -c.
10 Tanto p38c como p3813, son activados pot citocinas proinflamatorias y estrs arnbiental, la p3813 es preferencialmente activada por la cinasa-6 de la cinasa MAP
(MKK6) y preferencialmente fosforila el factor -2 de
transcripción activado (ATF2). Kumar, S. et al. 1997
15 Biochem Biophys Res Comm 235:533-538 y Stein, B. et al.
1997 J Biol Chem 272:19509-19517, reportaron una segunda
isoforma de p3813, p-38132, que contiene 364 atninoAcidos con
73% de Identidad a p38c. Se cree que la p3813 es activada
pot citocinas proinflamatorias y estrØs ambiental, aunque
20 la segunda isoforrna reportada de p3813, p38132, parece set
mÆs preferencialmente expresada en el sistema nervioso central (SNC), msculo cardiaco y esquelØtico, comparado
con la expresión del tejido mÆs ubicua de p38c. AdemÆs, se
cree que el factor -2 de transcripciôn activado (ATF-2), es
25 un mejor sustrato para p38f32 que para p38a.

La identificac–ón de p387 se reportO par Li, Z. vO
et al. 1996 Biochem Biophys Res Comm 228:334-340 y de p386
par Wang, X. et al. 1997 J Biol Chem 272:23668-23674 y par
Kumar, S. et al. 1997.Biochem Biophys Res Comm 235:533-538.
5 Estas dos isoformas p38 (y y (5) representa una subserie
(mica de la familia de MAPK basada en sus patrones de expresión de tejido, utilización de sustrato, respuesta a estimulo directo e indirecto, y susceptibilidad a inhibidores de cinasa. Basados en la conservación de
10 secuencia primara, las p38a y 3, estÆn estrechamente relacionadas, pero djvergen de y y 6, las cuales estÆn mÆs

40 estrechamente relacionadas entre sI.
Tipicamente, la trayectoria de cinasa p38 NAP, es
directamente o indirectamente activada par los receptores
15 de la superficie celular, tales coma receptor de tirosina
cinasas, quimiocina o receptores acoplados a la protelna G,
los cuales han sido activados por un ligando especifico,
par ejemplo, citocinas, quimiocinas a lipopolisacÆridos
(LPS) que se enlazan a un receptor cognato.
20 Subsecuentemente, una cinasa p38 MAP, es activada por

40 fosforilaciÆn en los residuos especIficos de treonina y
tirosina. DespuØs de la activación, la cinasa p38 NAP,
puede ’fosforilar otras proteinas intracelulares, que
incluyen protelnas cinasas, y pueden ser traslocadas al
25 ixücleo celular, en donde fosforila y activa los factores de

transcrlpcldn que conducen a la expresidn de citocinas pro-inflamatorias y otras proteinas que contribuyen a la respuesta inflarnatoria, adhesion celular, y degradacidn proteolitica. Por ejernplo, en cØlulas de enlace mieloide,
5 tales como macrOfagos y monocitos, tanto IL -i3 como ci
TNFc, son transcritos en respuesta a la activaciOn de p38.
La traducciOn y secreciOn subsecuente de estas y otras citocinas, inicia una respuesta inflamatoria local o sistmica en tejido adyacente y a travØs de la infiltraciOn
10 de leucocitos. Mientras esta respuesta es una parte normal
de las respuestas fisiolOgicas a la tensiOn celular, la tensiOn celular aguda o crOnica, conduce a exceso, no regulado, o expresiOn en exceso y no regulada de citocinas proinflamatorias. Esto en cambio, conduce al daflo del
15 tejido, a menudo, que resulta en dolor y debilitaciOn.
En macrOfagos alveolares, la inhibiciOn de
cinasas p38 con inhibidor p38, SB203580, reduce los productos del gen de citocina. Se cree que las citocinas inflamatorias (TNF-n, IFN-y, IL -4, IL -5) y quimiocinas (IL -
20 8, RANTES, eotaxina), son capaces de regular o soportar la
inflamaciOn crOnica de las vIas respiratorias. La producciOn y acciOn de muchos de los mediadores potenciales
de la inflamaciOn de las vIas respiratorias, parece ser dependiente del sistema de cinasa MAP activado por estrØs
25 (SAPK) o cascada de cinasa p38 (Underwood et 2001 Prog

Respir Res 31:342-345). La activaciôn de la ttayectoria de cinasa p38 pot numerosos estImulos ambientales resulta en la elaboración de mediadores inflamatorios reconocidos cuya producción es considerada pot set temporalmente regulada.
5 Ademâs, una variedad de rnediadores inflamatorios activan la
p38 MAPK, la cual puede entonces activar objetivos corriente abajo del sistema MAPK que incluye otras cinasas
o factores de transcripción, de este modo, creando el potencial para un proceso inflamatorio amplificado en el
10 pulmón.

Sustratos corriente a)ajo del grupo p38 de cinasas MAP

Sustratos de proteina cinasa de p38s 6 p3Si3: La
15 proteina cinasa 2 activada pot cinasa (MAPKAPK2 6 M2), la
proteina cinasa de interacci6n con cinasa MAP (MNK1), cinasa activada/regulada pot p38 (PRAK), cinasa activada
pot estrØs y mitógeno (MSK:RSK-B o RLPK) -

20 Factores de transcripción activados pot p38: Factor de transcripciôn de activaciôn (ATF)-1, 2 y 6, proteina 1 accesoria SRF (Sap 1), CHOP (gen inducible del daflo de ADN 153 y detención de crecimiento, o GADD153),
p53, factor 20 de mejoramiento del miocito C/EBP (MEF2C),
25 MEF2A, MITF1, DDTT3, ELK1, NFAT, y proteina de cuadro de

grupo de alta movilidad (HBP1).

Otros tipos de sustratos para p38: cPLA2,
isoforma-1 intercambiador de Na/H, tau, queratina 8, y
5 estatmina.

Genes regulados por la trayectoria p38: c-jun, C-
fos, junB, IL -1, TNF, IL- 6, IL -8, MCP -1, VCAM-1, INOS,
PPARy, ciclooxigenasa (COX) -2, colagenasa-1 (MMP-1),
10 Colagenasa-3 (MMP-13), VIH-LTR, Fgl-2, pptido natriurØtico
cerebral (BNP), CD23, CCK, carboxi-cinasa-citosólica de
. fosfoenolpiruvato, ciclina Dl, receptor LDIi (Ono et al.
2000 Cellular Signalling 12:1-13)

15 Secuencias Biológicas de activación de p38

38 e inflamaciôn

La inflamaciôn aguda y crônica, son consideradas
por ser centrales a la patogØnesis de muchas enfermedades
20 tales como artritis reumatoide, asma, enfermedad puimonar
obstructiva crónica (COPD) y sIndrome de angustia
respiratoria aguda (ARDS) - La activaciôn de la trayectoria
p38 puede jugar un papel central en: (1) producciÆn de
citocinas proinflamatorias tales comb IL -13, TNF-a e IL -6;
25 (2) inducción de enzimas tales como COX -2, las cuales

controlan al remodelaciôn del tejido conectivo en condiciôn patol6gica; (3) expresiôn de una enzima intracelular tal
como iNOS, el cual regula la oxidaciÆn; (4) inducción de
protelnas adherentes tales como VCAM-1 y muchas otras
5 molØculas relacionadas inflamatorias. AdemÆs de estas, la
trayectoria p38 puede jugar un papel regulador en la proliteración y diferenciaciôn de cØlulas del sistema
inmune. La p38 puede participar en proliferacióri y/o diferenciaciÆn celular inducida por GM-CSF, CSF, EPO, y
10 CD4O

El papel de la trayectoria de p38 en enfermedades
relacionadas inflamatorias, se estudió en varios modelos

40 animales. La inhibición de p38 por SB203580, reduce la

mortalidad en un modelo murina de golpe Inducido por
15 endotoxina e inhibe el desarrollo de artritis inducida por
colÆgeno y artritis adyuvante de ratas. Un estudio reciente
mostrO que el SB220025, el cual es un inhibidor p38 mÆs
potente, causa una reclucción dependiente de la dosis significante en la densidad vascular del granuloma. Estos
20 resultados indican que la p38 o los componentes de la

40 trayectoria de p38, pueden ser un objetivo terapØutico para

la enfermedad inflamatoria.

p38 y apoptosis
25 Parece que la activaciôn concomitante de p38 y

apoptosis, es inducida par una variedad de agentes tales \1A
como separacidn de NGF y ligaciôn Fas Las proteasas
cisteIna (caspasas), son centrales a la trayectoria
apoptótica y son expresadas coma zimÆgenos inactivos. Los
5 inhibidores de caspasa pueden entonces bloquear la activaciôn de p38 a travØs de reticulación Fas.. Sin
embargo, la sobreexpresión de MKK6b activa dominante, puede tambiØn inducir la actividad de caspasa y muerte celular.
El papel de la p38 en apoptosis es de tipo celular y
10 depenthente del estimulo. Nientras la seæalizaciôn de p38 ha sido mostrada POT promover la muerte celular y en
algunas lineas, en thferentes lIneas celulares, la p38 ha
sido mostrada par mejorar la supervivencia, muerte celular
y diferenciación.

15
en el ciclo celular

La sobre expresión de p38c en levadura, conduce a
disminución significante de proliteración, indicando involucramiento de p38a en el crecimiento celular. Se
20 observO una proliferación mÆs lenta de cØlulas de mamifero cultivadas, cuarido las cØlulas fueron tratadas con el inhibidor de p38c/, SB203580.

ehipertrot ia decardiornioc ito 25 La activación y funcidn de p38 en hipertrofia de

cardiomiocito, ha sido estudiada. Durante el progreso de hipertrofia, se incrementaron los riiveles tanto p38a como p383, y constitutivamente activari las respuestas hipertróficas activadas por MKK3 y NKK6, mejoradas por
5 organización sarcomØrica y expreslØn del factor natriurØtico atrial elevado. TambiØn, la seflalización de

10

p38 en el corazón, promueve la diferenciaciOn de miocitos
via un mecanismo que involucra la seflalización de calcineurina-NFAT.

p38 y desarrollo
Debido a la no viabilidad de ratones agØnicos
p38, existe evidencia con respecto al papel diferencial de
p38 en desarrollo. La p38 ha estado ligada a la
15 angiogØnesis placental pero no alt desarrollo cardiovascular
en varios estudios. AdemÆs, la p38 tambiØn ha estado ligada
a la expresiOn de eritropoyetina que sugiere un papel en la eritropoyesis. La PRAK ha sido recientemente implicada en
el desarrollo celular en implantaciÆn murina. El ARNm de
20 PRAK, asi como tambidn en las isoformas p38, se encontraron
ser expresadas a travØs del desarrollo de blastocistos.

38 y diferenciaciÆn celular
Se encontrô que la p38cx y/o p383, juegan un papel
25 importante en la diferenciación celular par varios tipos

celulares diferentes. La diterenciaciÆn de cØlulas 3T3Ll
en adipocitos y la diferenciaciôn de cØlulas PC12 en las neuronas, ambas requieren p38c y/o. La trayectoria de p38
se encontrO par ser necesaria y suficiente para
5 diferenciaciÆn de SKT6 en cØlulas hemoglobinizadas, asi coma tambiØn en la diferenciación de C2C112 en miotübulos-

38 en senescencia y supresiÆn de tumor
La p38 tiene un papel en la tumorigØnesis y
10 senescencia. Existen varios reportes que la activaciôn de
MKK6 y MKK3, conduce a un fenotipo senescente dependiente
de la actividad de p38 MAPK. TambiØn, la actividad de p38 MAPK se mostró responsable por senescencia en respuesta al acortamiento del telómero, exposición a H202, y
15 seflalización de oncógeno RAS crónico. Una caracteristica
comüri de las cØlulas tumorales es uria pØrdida de senescencia y la p138 estª ligada a la tumorigØnesis en ciertas cØlulas. Se ha reportado que la activaciôn de p38
es reducida en tumores y que la pØrdida de componentes de
20 la trayectoria de p38 tal como MKK3 y MKK6, resulta en
proliferación incrementada y probabilidad de conversion tumorigØnica con respecto a la linea celular o ci agente de inducciOn de tumor usado en estos estudios.

25

Inhibidores de cinasa p38 MAP
TJn "inhibidor de p38 MAPK", es un compuesto que
inhibe la actividad de p38. Los efectos inhibitorios de un compuesto en la actividad de p38, pueden ser medidos por
5 varios mØtodos bien conocidos por un experto en la tŒcnica.
Por ejemplo, los efectos irihibitorios pueden ser medidos,
midiendo el nivel de producción de citocina estintulado por
lipopolisacÆrido (LPS) (Lee et al. 1988 J
Immunopharmacol 10:835-843; Lee et al. 1993 Ann NY Acad Sd
10 696:149-170; Lee et al. 1994 Nature 372:739-746; Lee et al.
1999 Pharmacol Ther 82:389-397).
Se han enfocado esfuerzos por desarrollar
inhibidores de p38 MAPK, en incrementar la potencia. El
S3203580 y otros 2,4,5-triaril imidazoles, se encuentran
15 por ser potentes inhibidores de cinasa p38, con valores de
EC50 en el intervalo nanomolar. Por ejemplo, por SB203580,
la EC50 se encontrO por ser 48 nM. Las piridinilimidazoles
SKF 86002 (P1) y SB203582 (P2), mostradas abajo, han sido
usaclas como la plantilla para la mayorIa de inhibidores de
20 p38. Publicaciones recientes (Lee et al. 2000
Immunopharmacology 47:185-201) ha descrito los inhibidores
de p138 (P3 -P6) mostrados abajo. Notable entre estos
inhibidores, estÆ la potencia y selectividad relativamente
alta descrita para el compuesto P4 (p38 EC50 = 0.19 nM) y
25 la inhibiciÆn de infracciôn accionada por angiogØnesis por

SB 220025 (P6) 1

Los dos inhibidores p38 reportados par estar en
desarrollo c1inico son HEP689 (P7) y VX-745 (P8). El VX-745
est& segün se informa, en ensayos Fase II para artritis
5 reumatoide. La actividad anti- inflamatoria tópica potente,

10

15

25

ha sido descrita par HRP689, ci segin se inforrna, ha entrado a desarrollo cilnico para expiorar su potencial como agente tôpico para ci tratamiento de psoriasis y otros trastornos de la piel.

F

2IIINj S’111110

N) N1
P1 SK&F 86002

P4

P2XN; SB 203580
P3 X = CH; L-167307

P5 RWJ 68354

5

F

S

INT

H

P6 X = H, Y = CH; HEP 689 (SB 235699) P8 VX-745
P7XHN2,YN; SB 220025

10 Discusión adicional de varios inhibidores de p38 se puede encontrar en Boehm et al. 2000 Exp Opin Ther Pat 10:25-37; y Salituro et al. 1999 Curr Med Chem 6:807-823. Inhibidores p38 preferidos descritos en este
documento, son derivados de pirfenidona y anÆlogos que
15 exhiben baja potencia de inhibiciôn de p38 mientras, de manera sorprendente, todavIa tienen un efecto terapØutico relativamente alto (par ejemplo, para modular un sistema SAPK), como un resultado de tal inhibición. Preferiblemente, los inhibidores p38 de las modalidades
20 presentan EC50 en el intervalo de aproximadamente 1 iM y aproximadamente 1000 pM, preferiblemente, aproximadamente
50 pM hasta aproximadamente 650 pM para la inhibiciOn de la p38 MAPK.

25

DERIVADOS Y ANALOGOS DE PIRFENIDONA

La pirfenidona (5-meti1-1-feni1-2- (1H)-piridona)
misma, es un compuesto conocido y sus efectos
farrnacoldgicos son descritos, por ejemplo, en la Solicitud
5 de Patente Japonesa KOKM (disponible) Nos. 87677/1974 y
1284338/1976. Patente Estadounidense No. 3,839,346, publicada en Oct. 1, 1974; Patente Estadounidense No. 3,974,281, publicada en Agosto. 10, 1976; Patente
Estadounidense No. 4,042,699, publicada en Agosto 16, 1977;
10 y Patente Estadounidense No. 4,052,509, publicada en Oct.
4, 1977, las cuales todas estÆn por este medio, incorporadas por referencia en sus totalidades, descrIben mtodos para la manufactura de 5-metil-1-fenil-2-(1H)- piridona y su uso como un agente anti-inflamatorio.
15 La pirfeniclona y derivados de la misma, son
cornponentes ütiles para modular un sistema de protelna cinasa activado por estrØs (SAPK).
El tØrmino "aiquilo" usado en este documento, se
ref iere a un radical de cadena recta o ramificada de uno a
20 diez Ætomos de carbono, que incluye, pero no se limita a,
metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo,
terc-butilo, n-hexi10 y similares.
El tØrmino "alLquenilo" usado en este documento,
se refiere a radical de cadena recta o ramificada,
25 monovalente, para formar dos a diez ªtomos que coritienen un

doble enlace de carbono que incluye, pero no se limita a, 1-propenulo, 2-propenilo, 2-metil-1-propenilo, 1-butenilo, 2-butenilo y similares.
El tØrmino "halôgeno", usado en este documento,
5 se refiere a flüor, cloro, bromo o yodo.
El tØrmino "haloalquilo" usado en este documento,
se refiere a uno o mÆs grupos halógeno adjuntados con un radical aiquilo.
El tØrmino "nitroalquilo", como se usa en este
10 documento, se refiere a uno o mÆs grupos nitro adjuntados
con un radical aiquilo.
El tØrmino "tioalquilo", como se usa en este
documento, se refiere a uno o mÆs grupos tio adjuntados con
un radical aiquilo.
15 El tØrmino "hidroxialqui lo", como se usa en este
documento, se refiere a uno o mÆs grupos hidroxi adjuntados
con un radical aiquilo.
El tØrmino "alcoxi", como se usa en este
documento, se refiere a radical aiquilo de cadena recta o
20 ramificada, covalentemente unido a la molØcula original a
travØs de un enlace -0-. Ejemplos de grupos alcoxi incluyen, pero no se limitan a, metoxi, etoxi, propoxi, isopropoxi, butoxi, n-butoxi, sec-butoxi, t-butoxi y similares.
25 El tdrmino "alcoxialquilo", como se usa en este

/ 3

documento, se refiere a uno o mâs grupos alcoxi adjuntados
a un radical alquilo.
El tØrmino "carboxi", como se usa en este
documento, se refiere a -COOH opcionalmente adjuntado a un
5 grupo aiquilo. Ejemplos de grupos carboxi incluyen, pero no
se limitan a, COOR, -CH2COOH, -CH2CH2COOH, -CH(COOH) (CH3), y

similares.

El trmino "alcoxicarbonilo", se refiere a -(CO)-
0-aiquilo. Ejemplos de grupos alcoxicarbonilo incluyen,
10 pero no se limitan a, grupo metoxicarbonilo, grupo
etoxicarbonilo, grupo propoxicarbonilo y similares.
Los carbohidratos son polihidroxi aldehIdos o
cetonas, 0 sustancias que proporcioflan tales compuestos despuØs de la hiclrólisis. Los carbohidratos comprenden los
15 elementos carbono (C), hidrógeno (H) y oxIgeno (0), con una
relación de hidrógeno dos veces aquella de la de carbono y oxigeno.
En su forma bÆsica, los carbohidratos son
azücares simples o monosacâridos. Estos azücares simples
20 pueden combinarse entre si para formar mâs complejos de
carbohidratos. La combinación de dos azücares simples es un
disacÆrido. Los carbohidratos que consisten de dos a diez azücares simples son ilamados olisacØridos, y aquellos con
un nümero mÆs grande son ilamados polisacÆridos.
25 El tØrmino "urónido", se refiere a un

/3(2

monosacârido que tiene un grupo carboxilo (-COOH) en el carbono que no es parte del anillo. El nombre urónido retiene la raiz del monosacÆrido, pero el sufijo de azilicar
- osa, se cambia a -urônido. Pot ejemplo, la estructura de
5 glucurónido corresponde a glucosa.
Como se usa en este documento, un radical indica
especies con un electrÆn no apareado, ünico, de manera ta
que las especies que contienen el radical, pueden ser covalentemente unidas a otras especies. Pot lo tanto, en
10 este contexto, un radical no es necesariamente un radical
libre. Sin embargo, un radical indica una porción especifica de una molØcula mÆs grande. El tØrmino "radical" puede set usado de manera intercambiable con el tØrmino "grupo".
15 Como se usa en este documento, el grupo
sustituido se deriva de la estructura original no
sustituida en la cual, ha existido un cambio de uno o mÆs
Ætomos de hidrØgeno pot otro âtomo o grupo. Cuando se sustituye, el(los) grupo(s) sustituyente(s) es(son) uno o
20 mâs grupo(s) individualmente e independientemente
seleccionados de aiquilo C1 -CO, cicloalquilo CI -CIO,
arilo fusionado, heterociclilo, heteroarilo, hidroxi,
alcoxi C1 -C.10, ariboxi, mercapto, alquiltio C1 -0O3 ariltio,
ciano, halôgeno, carbonilo, tiocarbonilo, alcoxicarbonilo
25 C1 -C10, nitro, silibo, trihalometansulfonilo,

trifluorometilo y amino, que incluyen grupos amino mono y di-sustituidos, y los derivados protegidos de los mismos. Los grupos pi-otectores que pueden format los derivados protegidos de los sustituyentes anteriores, Se conocen pot
5 aquellos de habilidad en la tØcnica y se pueden encontrar
en referencias tales como en Greene and Wuts Protective Groups in Organic Synthesis; John Wiley and Sons: New York, 1999. En donde un sustituyente es descrito como "opcionalmente sustituido", tal sustituyente puede set
10 sustituido con los sustituyentes anteriores.
El tØrmino "purificado", se refiere a un
compuesto el cual ha sido separado de otros compuestos, de manera tal que comprende al menos, 95 de la sustancia medida cuando se somete a ensayo.
15 Los Ætomos de carbono asimtricos pueden estar presentes en los compuestos descritos en este documento. Todos lo isômeros, que incluyen diasterÆmeros y enantiómeros, asI como tambiØn las mezclas de los mismos, estÆn propuestos para estar incluidos en el alcance del
20 compuesto mencionado. En ciertos casos, los compuestos pueden existir en formas tautomØricas. Todas las formas tautomØricas estÆn propuestas para estar incluidas en el alcance del compuesto mencionado. Del mismo modo, cuando
los compuestos contienen un grupo alguenilo o aiquenileno,
25 existe la posibilidad de formas isomØricas cis y trans de

los compuestos. Ambos isÆmeros cis y trans, asI coma tambiØn las mezclas de los isômeros cis y trans, estÆn contempladas. De este modo, la reterencia en este documento
a un compuesto incluye todas las [ormas isomØricas
5 mencionadas anteriormente a menos que el contexto lo dicte
claramente de otro modo.
Varias formas estân incluidas en las modalidades,
incluyendo polimorfos, solvatos, hidratos, confórmeros, sales y derivados de profÆrmacos. Un polimorfo es una
10 composición que tiene la misma formula qulmica, pero una
diferente estructura. Un solvato es una composiciOn formada
par solvataciOn (la combinaciOn de las molculas solventes
con molculas de jones del soluto) - Un hidrato es un compuesto formado por una incorporaciOn de agua. Un
15 confOrmero es una estructura que es un isOmero
conformacional. El isomerismo conformacional es el fenOmeno
de molØculas con la misma fOrmula estructural pero diferentes conformaciones (confOrmeros) de Ætomos alrededor
de un enlace de rotaciOn. Las sales de los compuestos
20 pueden ser preparadas par mØtodos conocidos por aquellos
expertos en la tØcnica. Por ejemplo, sales de compuestos pueden ser preparadas haciendo reaccionar la base a Æcido apropiado con un equivalente estequiomØtrico del compuesto.
Un profÆrmaco es un compuesto que se somete a
25 biotransformaciOn (conversiOn quImica), antes de exhibir

139

sus efectos farmacológicos. Par ejemplo, un profârmaco puede de este modo, ser revisado coma un fªrmaco que contiene grupos protectores especializados usados en una manera temporal para alterar a eliminar propiedades
5 indeseables en la molØcula original. De este modo, la
ref erencia en este documento a un compuesto, incluye todas
las formas mencionadas anteriormente, a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo.
Los compuestos descritos abajo, son empleados en
10 los mØtodos descritos en este documento. En una modalidad,
un compuesto como se describe abajo, exhibe un EC() en el intervalo de aproximadamente 1 jiM hasta aproximadamente 1000 pM por inhibición de p38 MAPK.
Una modalidad proporciona una familia de
15 compuestos representados par el siguiente qØnero (GØnero
Ia)
X4 X5 R, R2
X3*MR3
X2 X10 R4
20 Genera Ia;

en donde

R2, R3 y R4 son seleccionados
independientemente del grupo que consiste de H, aiquilo
25 C -C10, alquilo C1 -C10 sustituido, aiquenilo C1 -0O3

haloalquilo C1 -0O3 nitroalquilo C1CO3 t–oalqtiilo C1 -C,
hidroxialquilo CC0, alcoxi C1 -0O3 fenilo, fenhlo
sustituido, halØgeno, hidroxilo, alcoxialquilo C -C107
carboxi C1 -C10, alcoxicarbonilo C1 -Co, COurOnido, CO -
5 monosacÆrido, CO-oligosacÆrido y CO-polisacÆrido; y
X, X2, X3, X4 y X son seleccionados independientemente del grupo que consiste de H, halógeno, alcoxi e hidroxi.

Otra inodalidad proporciona una familia de
10 compuestos representados por el siguiente gØnero (GØnero
Ib)

15

R2

X3--&N;
0 R

GØnero Ib;

en donde

X3 se selecciona del grupo que consiste de H,
halógeno, alcoxi C -C10, y OH;
20 R2 se selecciona del grupo que consiste de H,
halôgeno, aiquilo C1 -C10, aiquilo C -C10
hidroxialquilo C -0O3 alcoxialquilo C1 -C10, carboxi C -C1.
alcoxicarbonilo C1 -C10, CO-urOnido, CO-monosacÆrido, CO-
oligosacârido y CO-polisacÆrido; y
25 R4 se selecciona del grupo que consiste de H,

en donde

X3 se selecciona del grupo que consiste de H, OH

Y OCH3;

R2 se selecciona del grupo que consiste de H,
5 CH20H, COOH, CO-Glucorónido, Br, CH.3, y CH20CH3; y
R4 se selecciona del grupo que consiste de H y
OH, con la condición. de que cuando X,3 es OH, entonces R2 no

es CH3.

Otra modalidad proporciona una familia de
10 compuestos representada por los siguientes subgneros (SubgØnero III):

X3OØR2

15 SubgØnero III;

en donde

X3 se selecciona del grupo que consiste de H, F y
OH; y
20 R2 se selecciona del grupo que consiste de H, Br,
CH2F, CHF2, y CF3.
Otra modalidad proporciona una familia de
compuestos representados par el siguiente subgØnero (SubgØnero IV)

X3-0N;)/

SubgØnero IV;

en clonde X3 se selecciona del grupo que consiste
de H, halôgeno, alcoxi C -0O3 OH, aiquilo C1 -C10, aiquilo
C1 -C10 sustituido, aiquenilo C1 -C10, haloalquilo C1 -C10,
nitroalquilo CC]o, tioalquilo C1 -C1, hidroxialquilo C -0O3
10 fenilo, fenilo sustituido, alcoxialguilo C1 -C10, carboxi C1 -
C10, alcoxicarbonilo C1 -C10, CO-urónido, CO-monosacrido, CO-oliqosacÆrido y CO-polisacÆrido.
Otra modalidad proporciona una familia de
compuestos representada por el siguiente subgØnero
15 (SubgØnero V):

CF X3---ON

SubgØnero V;
20

en donde X3 se selecciona del grupo que consiste
de H, halógerio, alcoxi C1 -0O3 aiquilo C1 -0O3 aiquilo C -C
sustituido, alqueriilo C1 -C10, haloalquilo C1 -C10,
nitroalquilo C-Cio, tioalquilo C -C, hidroxialquilo C3 -0O3
25 fenilo, fenilo sustituido, alcoxialquilo C1 -C, carboxi C1-

C10, alcoxicarbonhlo CC1O, CO-urÆnido, CO-monoscârido, co-oligosacÆrido y CO-polisacÆrido.
Otra modalidad proporciona una familia de compuestos representada por el siguierite gØnero (GØnero
5 VI):

X3Ar
z R4

GØnero VI;
10
en donde
Ar es piridinilo o fenilo;
Z es 0 u S;
X3 es H, F, Cl, OH, CH3 U OCH3;
15 R2 es metilo, C(=O)H, C(0)CH3, C(0)OCH3, C(=O)O-
glucosilo, fluorometilo, difluorornetilo, trifluorometilo, bromo, metilmetoxilo, metilhiclroxilo, o fenilo; y
R4 es H o hidroxilo;
con la condiciÆn de que cuando R2 es
20 trifluorometilo, Z es 0, R4 es H y Ar es fenilo, el fenilo no es solamente sustituido en la posición 4’ por H, F u OH.
El gØnero VI incluye las familias de compuestos
representados por los SubgØneros VIa y los SubgØneros VIb:

25

I

haloalquilo C -C10, nitroalquilo C1 -C1, tioalquilo C] -C10,
hidroxialguilo C -0O3 alcoxi C -C10, fenilo, fenilo
sustituido, halóqeno, hidroxilo, alcoxialquilo C1 -C10,
carboxi C1-C]Q, alcoxicarbonilo C1 -C10; y
5 R4 se selecciona del grupo que consiste de H,
halógeno y OH.
Se reconocerÆ que un compuesto particular
descrito en este documento, puede set un elemento de mÆs de
uno de los varios gneros descritos anteriormente. Los
10 compuestos descritos en este documento, son empleados para modular un sistema de proteIna cinasa activado pot estrØs (SPAK). Compuestos ejemplares de los GØneros Ia-c, Subg&ieros II -V y GØneros VI y VII que son empleados para modular un sistema de proteina cinasa activado pot estrØs
15 (SAPK), son expuestos en la Tabla I siguiente. Los compuestos 1-6 son ejemplos de compuestos de los SubgØneros
II. Los compuestos 7-12 son ejemplos de compuestos del Subgnero III. El compuesto 13 es pirfenidona, un
de un compuesto del SubgØnero II. Los compuestos 14-32 son
20 ejemplos de compuestos del GØnero VI. El compuesto 33 un ejemplo del GØnero VII.

25

Otra modalidad se dirige a compuestos purificados representados por el GØnero Ia-c, SubgØnero IT -V y/o GØneros VI y VII. El grado de pureza puede ser expresado como un porcentaje como se describe anteriormente. En
5 modalidades preferidas, los compuestos purificados representados por. el GØnero Ia-C, SubgØnero 11-V y/o GØnero
VI y VII, tienen una pureza de aproximadamente 96 o mayor,
mÆs preferiblemente aproximadamente 985. o mayor, en peso basado en el peso total de la composiciôn que comprende el
10 compuesto purificado. Por ejemplo, una modalidad proporciona el Compuesto 3 purificado (Tabla 1).
Los compuestos del GØnero Ia-C, SubgØnero 11-V
y/o GØnero VI y VII, pueden ser sintetizados usando varias reacciones. Ejemplos de sIntesis incluyen las siguientes,
15 designadas Esquemas de Reacción SintØticos 1, 2 y 3.

Esgueina de Reacci6n SintØtico 1

R1

A

xl x2
R3

20

Br

R4 R5

X4 K2C031DMF/ temp

R

X3 X4 H, aiquilo, aiquenilo,
25 nitroalquilo, tioalquilo, fenilo, fenilo oustituido,

CH2Phe, halôgeno, hidroxi, alcoxi, haloalquilo.

5

10

15

20

R1 = R2 = R3 = R4 = H, aiquilo, aiquenilo,

nitroalquilo, tioalquilo, fenilo, fenilo sustituido,

CH2Phe, halOgeno, hidroxi, alcoxi, haloalquilo.

B

HNX3

XI Xz

HN
R4

0X Cu (OAc)2 /Oxidante (TEMPO, Püldin-N.6xido,02)/base(PLTEA)ICH2
/tamces moleculares 4A)

Esquema de Reacciôn SintØtico 2

X__R2
R i R I i:TL
X=Br,t N 0

NO
H

Cut, K2CO3

R2

X3

Reacciôn Ullmann: Chem. PharmBull. 45 (4) 719-721.

25 Se obtuvieron N-aril--piridin-2--oflas objetivo, via ari1ci6n

de 2-hidroxipiridiflaS. La reacción uliLman es empleada en la preparaciôn de compuestos deseritos, excepto los anâlogos
5-bromo y compuesto 33, los cuales son proporcionados pot
ejemplo, pot esquema de reacción sintØtico 3.
5 Una mezcla de 2-hidroxipiridina (1 mmol), yoduro
a bromuro de arilo (2 mmol), Cul (0.1-0.5 mmol) y carbonato
de potasio anhidro (1 mmol) en DMF (3 ml), se agitaron
durante la noche a 135°C baja una atmÆsfera de argon. La
mezcla de reacciOn de color profundo, se tomO en acetato de
10 etilo y 10% de hidrOxido de amino. La capa orgÆnica se lavO
can salmuera y se secO sabre sulfato de magnesia. La
cromatograf Ia en columna proporcionO los compuestos
objetivos coma sOlidos blancuzcos en 25-60% de rendimiento.

15 Esquema de Reaccióxi SintØtico 3

HO
R1
HO’°

RI

N?-ao Cu(OAc)2, 02, Pi

R2

20 Se puede obtener N-aril--2-pirridOflas

40 objetivo via arilaciOn de 2-hidroxipiridinas con Æcidos
borOnicos (Tetrahedron Lett., 42 (2001) 3415-3418). La ruta
de Æcido borOnico es empleada en la preparaciOn de los compuestos descritos. Una mezcla de 2-hidroxipiridifla (5
25 mmol), ªcido arilborOnico (10 mmol), acetato de cobre(II)

(0.5-i mmci1), piridina (10 mmol) y tamices moleculares 4
(0.5-1 g) en diclorometano (25 ml), se agitaron por 24-28
horas a temperatura ambiente abierta al aire. La mezcla de reacción se lavó con bicarbonato de sodic saturado con RDTA
5 y la fase orgânica se secô sobre sulfato de sodio. Las N-
aril-2--pirridonas objetivo, se aislaron por cromatografla
en columna como sólidos blancos en 85-100% de rendimiento.
Como derivados de pirfenidona, los compuestos del
Genera Ia-C, SubgØnero II -V Y/o Genera VI y VII, tambin
10 pueden set sintetizados pot cualquiera de las reacciones
convencionales conocidas en la tØcnica, basadas en los esquemas sintØticos conocidos pot pirfenidona, tales coma aquellos descritos en las Patentes Estadounidenses Nos.
3,839,346; 3,974,281; 4,042,699; y 4,052,509, todas estÆn
15 por este metho, expresamente incorporadas pot referenda en
su totalidad.
Los materiales de partida descritos en este
documento, son cornercialmente disponibles, son conocidos, a
pueden set preparados pot mØtodos conocidos en la tØcnica.
20 Adicionalmente, los materiales de partida no descritos en
este docurnento, son comercialmente disponibles, son
conocidos, o pueden ser preparados pot mØtodos conocidos en
la tØcnica.
Los materiales de partida pueden tener los
25 sustituyentes apropiados para finalmente, dat los productos

deseados con los sus’iLuyentes corresporidientes. Alternativarnente, los sustituyentes pueden ser agregados en cualguier punto de sIntesis para finairnente, dar los productos deseados con los susl:ituyentes correspondientes.
S Los esquemas de reaccidn sintØticos 1-3, muestran mØtodos que pueden ser usados para preparar compuestos de
los GØneros Ia-c, SubgØnero II -V y/o Genera VI y VII. Uno
de habilidades en la tØcnica, apreciarÆ que un nümero de diferentes esquemas de reacciÆn sintØticos, pueden ser
10 usados para sintetizar los compuestos del Genera Ia-c, SubgØnero 11-V y/o Genera VI y VII. AdemÆs, uno de habilidades en la tŒcnica, entenderA que un nümero de diferentes solventes, agentes de acoplamiento y candiciones
de reaccidn, pueden ser usados en las reacciones de
15 sintesis para praporcionar resultados comparables.
Un experto en la tØcnica apreciarÆ las
variaciones en la secuencia y ademâs, reconocerÆ variaciones en las condiciones de reacciôn apropiadas a partir de reacciones anÆlogas mostradas o de otro modo
20 conocidas, las cuales pueden ser apropiadamente usadas en
el proceso anterior para hacer los compuestos de GØnero Ia-
c, SnbgØnero II -V y/o GCnero VI y VII.
En los procesos descritos en este documento para
la preparacidn de los compuestos de GØnero Ia-c, SubgØnero
25 II -V y/o Genera y VII, el uso de grupos protectores es

en general, bien reconocido por aquellos expertos en la tØcnica de quimica orgÆnica, y por consiguiente, el uso de grupos protectores apropiados puede en algunos cases, estar implicado por Jos procesos de Jos esquemas aqul, aunque
5 tales grupos pueden no ser expresamente ilustrados. La introducciôn y remocidn de tales grupos protectores adecuados, es bien conocida en la tØcnica de quimica orgÆnica; vØase por ejemplo, T. W. Greene, "Protective Groups in Organic Synthesis", Wiley (New York), 1999. Los
10 productos de las reacciones descritas en este documento,
pueden ser aislados per methos convencionales como extraccidn, destilación, crornatografla y similares.
por ejemplo, sales farmacuticamente
aceptables de Jos compuestos del Gnero Ia-c, Subgnero II -
15 V y/o Gnero VI y VII, pueden ser preparadas haciendo
reaccionar la base o Æcido apropiado conunequivalente estequiomdtricodelos.compuestos.De manera similar, los derivados farmacØuticamente aceptables (per ejemplo, Østeres), metabolitos, hidratos, solvatos y profÆrmaeos de
20 Jos compuestos del GØnero Ia-c, SubgØneroIl-V y/o Genera

(par ejemplo, par una transformaciÆn metabólica tal como desaminación, desaiqul lación, des -esteri ficaciÆn y similares), para proporcionar un compuesto activo. Un "profârmaco farmacØuticamente aceptable", sigxiifica un
5 compuesto el cual es dentro del alcance del criteria medico
sano, adecuado para uso farmacØutico en un paciente sin toxicidad indebida, irritaciÆn, respuesta alØrgica y
similares, y efectivo para el uso propuesto, que incluye,
un ester farmacØuticamente aceptable, asi coma tambiØn una
10 forma zwiteriónica, en donde sea posible, de los compuestos
de las modalidades. Ejemplos de tipos de profÆrmacos farmacØuticamente aceptables se describen en T.. Higuchi
and V. Stella, Pro -drugs as Novel Delivery Systems, Vol. 14
of the A.C.S. Symposium Series, and in Edward B. Roche,
15 ed., Bioreversible Carriers in Drug Design, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987, ambos
de los cualLes estÆn con ella, expresamente incorporados par referencia en su totalidad.
Los compuestos y composiciones descritos en este
20 documento, pueden tamblØn incluir metabolitos. Coma se usa
en este documento, el termino "metabolito", significa un praducto de metabolismo de un compuesto de las modalidades
o una sal, anÆlogo a derivado del mismo, farmacØuticamente
aceptable, que exhibe una actividad similar in vitro a in
25 vivo en un compuesto de las modalidades. Los compuestos y

composiciones descritos en este documento, pueden tamblØn incluir hjdratos y solvatos. Como se usa en este documento,
el tØ:rmino "solvato", se refiere a un complejo formado pot
un soluto (aqul, un compuesto del GØnero Ia-c, Subgdnero
5 TI -V y/o GØnero VI y VII), y un solvente. Tales solventes
para propdsitos de las modalidades, preferiblemente no deben interferir con la actividad biológica del soluto. Los
solventes pueden, pot medio del ejemplo, set aqua, etanol o
Æcido actico. En vista de lo mencionado anteriormente, la
10 referenda aqul a un compuesto o gØnero particular de
compuestos, serÆ entendido pot incluir las varias formas
descritas anteriormerite, incluyendo, sales, Østeres, profârmacos, metabolitos y solvatos de los mismos, farmacuticamente aceptables, a menos que se declare de
15 otro modo.

Mtodos para inhibir la cinasa p38 Mp
En una modalidad, se proporcionan mØtodos para
modular un sistema SAPK, in vitro o in vivo. Los mØtodos
20 incluyen, coritactar una concentradidn que modula el SAPK de

40 un compuesto con al menos, un p38 MAPK (pot ejemplo,
contactando el compuesto con una cØlula o tejido que
contiene al menos, una p38 MAPK), en donde el compuesto
tiene una relativamente baja poteucia pot inhibicidn de al
25 menos, una p38 MAPK, que corresponde a una concentraciOn

inhibitoria relativamente elevada, para inhibición de al
menos, una p38 MAPK por el compuesto.
"Contactar una cØlula", se refiere a una
coiidiciOn en la cual, un compuesto u otra composiciôn de
5 materia, estÆ en contacto directo con una cØlula o tejido,
a estÆ suficientemente cerrado para inducir un efecto biológico deseado en una clula a tejido. Par ejemplo, poner en contacto una cØlula o tejido que contienc p38 MPAK con un compuesto, se puede conducir en cualquier manera que
10 permita una interacciôn entre p38 MAPK y el compuesto,
resultando en el efecto biológico deseado en una cØlula. Poner en contacto una cØlula a tejido, se puede realizar,
por ejemplo, par intermezclado o administraciOn de un compuesto (tal coma un compuesto del Genera Ia-c, SubgØnero
15 IT -V y/o GØnero VI y VII, y/o una sal, ester, profÆrmaco
y/o intermediario del mismo, y/o una composición farmacØutica que comprende uno a mÆs de los mencionados anteriormente)
Alternativamente, poner en contacto una cØlula o
20 tejido, se puede realizar introduciendo un compuesto en una
manera tal que el compuesto serÆ dirigido, directamente o indirectamente, a una cØlula a tejido que contierie p38 MPAK. Poner en contacto una cØlula a tejido, puede ser realizado baja condiciones de manera tal que el compuesto
25 se enlaza al menos, a una p38 MAPK. Tales condiciones

pueden incluir proximidad del compuesto y p38-que contiene
la cØlula o tejido, pH, temperatura, o cualquier condiciôn
que afecta el enlace de un compuesto a p38 MAPK.
En ciertas modalidades, la cØlula es contactada
5 con el compuesto in vitro; en otras modalidades, là cØlula
es contactada con el compuesto in viva.
Cuando la cØlula es contactada in viva, la
concentración efectiva (EC) de un compuesto, es una concentración que resulta en una reducciÆn de un punto
10 final especificado por un porcentaje objetivo (par ejemplo,
50%, 40%, 30%, 20%, 10%), con relacidn a la maxima
reducción observable del punto final especificado, par tal Scompuesto. Tal punto final puede ser una respuesta fisiológica, por ejemplo, reduccidn en la sangre u otra
15 concentración de fluido corporal de TNFc. Por ejemplo,
EC50, EC40, EC30, EC20, y EC10, son determinados como concentraciones que resultan en reducciones en la
concentración de TNFcix del suero, por 50%, 40%, 30%, 20% y
10%, respect ivamente, con relación a la maxima reducciOn
20 observable en una curva de respuesta de dosis.
Cuando la cØlula es puesta en contacto in vitro,
excepto en un ensayo a base de cØlula, la concentraciÆn efectiva (EC) es una concentraciÆn que resulta en una reducciÆn en la actividad del objetivo especificado por un
25 porcentaje dada (por ejemplo, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%). Por

ejemplo, EC50, EC40, EC0, EC20, y EC10, son determinados como
concentraciones que resultan en reduccione.s en la actividad del objetivo especificado, por 50%, 40%, 30%, 20% y 10%, respectivamente, en una curva de respuesta de dosis. Cuando
5 la inhibiciÆn completa de un objetivo especificado no se
obtiene, la concentración efectiva (EC) de un compuesto, es
una concentración que resulta en una reducción de una actividad objetivo por un porcentaje dado (por ejemplo,
50%, 40%, 309k, 20%, 10%), con relaciôn a la maxima
10 reducciÆn de la actividad objetivo de tal compuesto.
Cuando la clula es contactada in vitro, en un
ensayo a base de cØlula, la concentración efectiva (EC) de
un compuesto, es una concentraciÆn que resulta en una reducciôn de un punto final especificado por un porcentaje
15 objetivo (por ejemplo, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%), con relación a la maxima reducción observable del punto final especificado por tal compuesto. Tal punto final puede ser
una respuesta celular, por ejemplo, reducción en la secreción de TNFcx como se determina por la concentraciØn de
20 TNFc en un medio celular. Por ejemplo, EC0, EC40, EC30,
EC20, y EC10, son determinados como concentraciones que
resultan en reducciones en la concentraciôn de TNFc por
50%, 40%, 30%, 20% y 109., respectivarnente, con relaciôn a
la maxima reducciôn observable en una curva de respuesta de
25 dosis.

/G3

El EC50 del compuesto que modula el sistema SPAR,
estâ preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 1
pM hasta aproximadamente 1000 PM, niÆs preferiblemente aproximadamente 50 pM hasta aproximadamente 650 pM por
5 inhibiciôn de al menos, una p38 MAPK. Dc este modo, par
ejemplo, la modulación del sistema SAPK, puede involucrar
contactar un compuesto (par ejemplo, un compuesto del
CØnero Ia-c, SubgØnero II -V y/o GØnero VI y VII), con al
menos una p38 MAPK en una concentración que es menor que un
10 EC40, preferiblemente, menos de EC30, mÆs preferiblemente,
menos de EC20, aün preferiblemente, menos de EC10 par
inhibiciôn de al menos una p38 MAPK par ci compuesto, coma
se determina en una curva de respuesta de dosis in viva.
En ciertas modalidades, ci compuesto se
15 proporciona en la forma de una composición farmacØutica,
junta con un portador farmacØuticamente aceptable.

Selecciôn de una biblioteca de compuestos para inhibidores
p38 de baja potencia
20 En otro aspecto, se proporciona un mØtodo para identificar un compuesto farmacØuticamente activo, par
ejemplo, para determinar si un compuesto es potencialniente
ü til coma un agente terapØutico, par ejemplo, para la
prevenciôn o tratamiento de una condiciÆn inflamatoria (tal
25 coma condición asociada con citocina o p38). El mØtodo

/? y

incluye, someter a ensaya, una pluralidad de compuestos par
inhibición de al menos, una p38 MAPK y seleccionar un
compuesto el cual exhibe una relativamente baja potencia para inhibir a p38 MAPK. Preferiblemente, un EC0 de tal
5 compuesto inhibidor p38 de baja potencia, estÆ en el intervalo de aproximadamente 1 pM hasta aproximadamente 1000 pM, preferiblemente, aproximadamente 50 p.M hasta aproximadamente 650 pM par inhibición de al menos, un p38 MAPK. La pluralidad de compuestos a ser ensayados es
10 preferiblemente seleccionada de una biblioteca de compuestos potenciales. El ensayo de la pluralidad de compuestos a partir de la biblioteca, se puede conducir en varias formas. Par ejemplo, en algunas modalidades, los mØtodos ademÆs comprenden, poner en contacto al menos una
15 p38 MAPK con la pluralidad de compuestos, y determinar si
los compuestos inhiben la actividad de citocinas. Una p38 MAPK es preferiblemente seleccionada del grupo que consiste
de p38c, p38, p38y y p388. En modalidades preferidas, la
etapa de contacto toma lugar in vitro; en ciertas modalidades
20 preferidas, la etapa de contacto comprende, poner en contacto
una cØlula que comprende p38 MAPK can el compuesto.
En ai3n otra modalidad, se proporcionan mØtodos
para inhibir la actividad de p38 MAPK en una cØlula, in
vitro a in viva. En general, tales mØtodos incluyen, poner
25 en contacto una cØlula que contiene al menos una p38 MAPK

con una cantidad efectiva que inhibe p38 de un compuesto (par ejemplo, un compuesto del GØnero Ia-c, SubgØnero 11-V y/o GØnero VI y VII), baja condiciones de inanera tal que la actividad p38 en la cØlula es inhibida. Ejernplos de tales
5 mØtodos se proporcionan en la sección de EJEMPLOS siguiente. El compuesto preferiblemente, exhibe un EC50 en
el intervalo de aproximadamente 1 pM hasta aproximadamente
100 pM, preferiblemente aproximadamente 50 pM hasta aproximadamente 650 pM por inhibición de al menos, una p38
10 MAPK. El contacta de al menos una p38 MAPK con el compuesto, es preferiblemente conducido en una concentraciôn que modula el sistema SAPK que es menos de EC30, preferiblemente, menos de EC20, mÆs preferiblemente, menos de EC10 par inhibición de al menos, una p38 MAPK por
15 el compuesto.
Los mØtodos in viva, incluyen par ejemplo,
introducir en un grupo de animales, oralmente a par inyección, un compuesto de interØs (par ejemplo, un compuesto del Genera Ia-c, SubgCnero II -V y/o Genera VI y
20 VII) en varias concentraciones. DespuØs de la iritroducción
del compuesto, el lipopolisacÆrido es adrninistrado intravenosamente. Los niveles de TNFcx del suero, son medidos y comparados con aquellos de los animales de control. Los compuestos preferidos inhiben la liberaciÆn de
25 TNFc, de este modo, reduciendo los niveles de TNFc en las

muestras de sangre de los animales probados. El compuesto preferiblemente exhibe un EC5) en el intervalo de aproximadamente 1 iM haste aproximadamente 1000 preferiblernente, aproximadamente 50 iM haste aproximadamente
5 650 pM pot inhibición de la liberación de TNFc.
El mØtodo para identificar un compuesto farrnacŒuticarnenteactivo, puede edemas, incluir determiner una toxicidad de mamifero del compuesto seleccionado. Tales mØtodos son en general, conocidos pot aqueliLos expertos en
10 la tØcnica. El mØtodo para identificar un compuesto farmacØuticamente activo, tambiØn puede incluir administrar
el compuesto seleccionado en un sujeto de prueba, ya sea en conjunto con la deterrninación de toxicidad del mamIfero o pot otras razones. En una modalidad, el sujeto de prueba
15 tiene o estÆ en riesgo de tener una condición inflamatoria.
Preferiblemente, el sujeto de prueba es un mamIfero y puede

set un humano.

MØtodos de tratamiento y/o prevención
20 Otra modalidad proporciona mØtodos para tratar o prevenir estados de enfermedad, par ejemplo, condiciôn(es) inflamatoria(s) y/o condiciôn(es) fibrótica(s). Los mØtodos
incluyen, identificar un sujeto en riesgo de a que tienen
al menos, una condiciôn seleccionada de una condiciôn
25 inflamatoria y una condiciôn fibrótica y administrar un

/64

compuesto al sujeto, en una cantidad efectiva para tratar o prevenir la condiciôn inflamatoria y/o cond–ciôn fibrótica.
En modalidades preferidas, el compuesto exhibe un EC0 en
ci intervalo de aproximadamente 1 pM hasta aproximadamente
5 1000 pM, preferiblemente, aproximadamente 50 pM hasta aproximadamente 650 pM por inhibición de al menos, una p38 MAPK. En modalidades preferidas, la cantidad efectiva produce una concentraciôn de fluido corporal, sangre o suero u otra, que es menor que aquella de un EC50, o,
10 preferiblemente, un EC20, o mÆs preferiblemente, un EC10 por
inhibición de p38 MAPK por el compuesto- En modalidades preferidas, ci compuesto exhibe un EC50 en ci intervalo de aproximadamente 1 pM hasta aproximadamente 1000 MM, preferiblemente aproximadamente 50 pM hasta aproximadamente
15 650 pM por inhibición de la secreción de TNFc. En otras
modalidades preferidas, la cantidad efectiva produce una concentración de fluido en la sangre, o suero u otro corporal, que es menor que un EC30, o preferiblemente, un EC20, o mÆs preferiblemente, un EC15, o mÆs preferiblemente,
20 un EC10 por inhibición de liberación de TNFcx estimulado por
LPS, en un fluido corporal por el compuesto. La cantidad efectiva es preferiblemente aproximadamente 70% o menos,
mÆs preferiblemente menos de aproximadamente 50%, de una cantidad que causa un efecto colateral indeseable en ci
25 sujeto, tal como, pero no limitado a, somnoiencia, nÆuseas,

sIntomas de fro, trastorno gastrointestinal y salpulliäo por fotosensibilidad. El compuesto usado para el tratamiento o prevenciÆn, es preferiblemente un compuesto del GØnero Ia-c, SubgØnero II -V y/o GØnero VI y VII.
5 Los mØtodos para identificar un sujeto en riesgo
o que tiene una condición inflamatoria, son conocidos por aquellos expertos en la tØcnica. Ejemplos de condiciones inflamatorias que pueden ser tratadas o prevenidas por los mØtodos descritos en este documento incluyen, condiciones
10 asociadas con p38, por ejemplo, condiciones asociadas con
actividad de citocina alterada, condiciones asociadas con modulación de un sistema SAPK, enfermedad autoinmune y enfermedad asociada con inflamacidn aguda y crónica. La citocina (o citocinas), es(son) preferiblemente,
15 seleccionadas del grupo que consiste de, pero no se limita
a, IL -10, IL -6, IL -8 y TNF-a. En una modalidad, el compuesto usado para tratar o prevenir la condiciôn inflamatoria es un compuesto que inhibe una cinasa en la trayectoria de seuIalización de SAPK. Ejemplos de compuestos
20 preferidos incluyen, el compuesto del GØnero Ia-c, SubgØnero II -V y/c GØnero VI y VII.
El tØrmino "condiciôn asociada a p-3811, significa
una enfermedad u otra condiciôn delLetØrea en la cual, la trayectoria de seæalización de cinasa p38 MAP estÆ
25 implicada, sea directamente o indirectamente. Ejemplos de

condiciones asociadas con p38 incluyen, condiciones causadas por desregulación o sobreexpresiÆn de IL -1, TNF-
cx, IL -6 o IL -8, que resulta de niveles sostenidos,
prolongados, mejorados o elevados, de actividad de p138.
5 Tales condiciones incluyen sin limitaciOn, enfermedad inflamatoria, enfermedad autoinmune, enfermedades fibrOticas, trastornos Oseos destructivos, trastornos proliferativos, enfermedades infecciosas, enfermedades neurodegenerativas, alergias, isquemla por reperfusión en
10 apoplejIa, ataques cardiacos, trastornos angiogØnicos,
hipoxia de órgano, hiperplasia vascular, hipertrof Ia
cardiaca, agregacióri de plaquetas inducida por trombina, y
condiciones asociadas con trayectorias de prostaglandina o ciclooxigenasa, por ejemplo, condiciones que involucrari la
15 endoperóxido sintasa de prostaglandina. Una condiciôn asociada con p38 que incluye, cualquier condición asociada con, o methada por una isoforma de p30.
Una ’condiciOn fibrótica", "condiciOn fibroproliferativa", "enfermedad fibrótica", "enfermedad
20 fibroproliferativa", "trastorno fibrótico", y "trastorno fibroproliferativo", son usados intercambiablemente para referirse a una condic–ón, enfermedad o trastorno, que es caracterizado por proliferación disregulada o actividad de fibroblastos y/o acumulaciÆn excesiva o patolOgica de
25 tejido colagenoso. Tipicamente, cualquiera de tal

I °

enfermedad, trastorno condiciOn, es receptiva al
tratamiento por administración de un compuesto que tiene actividad anti-fibrOtica. Los trastornos fibróticos incluyen pero no se limitan a, fibrosis pulmonar, que
5 incluye, fibrosis pulmonar idiopÆtica (IPF), y fibrosis pulmonar a partir de una etiologia conocida, fibrosis hepÆtica, y fibrosis renal. Otras condiciones fibrdticas ejemplares incluyen, fibrosis müsculo esqueleto, fibrosis
cardiaca, adhesiones post -quirürgicas, escleroderma,
10 glaucoma y lesiones de la piel, tales coma queloides.
El tØrmino ’sistema de modulación SAPK",
significa incrementar o reducir la actividad del sistema de proteina cinasa activado por estrØs, par ejemplo, inhibiendo la actividad p38, sea in vitro o in viva. En
15 ciertas modalidades, el sistema SAPK es modulado cunado la
actividad p38 en una cØlula, es inhIbida par aproximadamente 50%, preferiblemente, por aproximadamente 40%, mªs preferiblemente, par aproximadamente 30%, aün mÆs preferiblemente, por aproximadamente 200-., a aün mÆs
20 preferiblemente, par aproximadamente 10%, comparado con la
actividad p38 de una cØlula de control no tratada.
Una condiciôn asociada con la actividad de
citocina alterada coma se usa en este documento, se refiere
a una condicidn en la cual, la actividad de citocina es
25 alterada comparada con un estado no enfermo. Esto incluye,

pero no se limita a, condiciones causadas par sobreproducción a desregulaciOn de IL -13, TNF-a, IL -6 a IL -
8, que resulta de niveles sostenidos, prolongados, mejorados a elevados, de activiclad de citocina, la cual
5 puede estar asociada con la actividad p38. Tales condiciones incluyen sin limitaciôn, enfermedad inflamatoria, enfermedad autoinmune, enfermedades fibróticas, trastornos óseos destructivos, trastornos proliferativos, enfermedades irifecciosas, enfermedades
10 neurodegenerativas, alergias, isquernia par reperfusión en
apoplejIa, ataques cardiacos, trastornos angiogØnicos,
hipoxia de órgano, hiperplasia vascular, hipertrof Ia
cardiaca, agregaciôn de plaquetas inducida par trornbina, y
condiciones asociadas con trayectorias de prostaglandina o
15 ciclooxigenasa, por ejemplo, condiciones que involucran la
endoperóxido sintasa de prostaglandina. Una condición asociada con citocina, puede incluir cualguier condición
asociada con, o mediada por IL -1 (particularmente IL -1),
TNFa, IL -6 IL -B, o cualguier otra citocina la cual puede
20 ser regulada por p38. En modalidades preferidas, la condiciôn asociada con citocina, es uria condición asociada

con TNFa.

Los mØtodos descritos en este documento, tambiØn
pueden ser usados para tratar enfermedades autoinmunes y
25 enfermedades asociadas con una inflarnación aguda y crdnica.

Estas enfermedades incluyen, pero no se limitan a: enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), s-indrome obliterante de bronquiolitis, fibrosis de aloinjerto crÆnica, fibrosis pulmonar inflamatoria (IPF), artritis
5 reumatoide; espondilitis reumatoide; osteoartritis; gota, otras condiciones artrIticas; sepsis, choque sØptico; choque endotôxico; sepsis gram-negativa; sindrome de choque tóxico; sindrome de dolor miofacial (MPS); Shigelosis; asma; sindrome de angustia respiratoria en adulto;
10 enfermedad del intestino inflamatorio; enfermedad de Crohn;
psoriasis; eczema; colitis ulcerativa; nefritis glomerular; escieroderma; tiroiditis crónica; enfermedad de Grave; enfermedad de Ormond; gastritis autoinmune; miastenia gravis; anemia hemolitica autoinmune, neutropenia
15 autoinmune; trombocitopenia; fibrosis pancreÆtica; fibrosis
hepÆtica que incluye hepatitis activa crónica; enfermedad renal aguda y crônica; fibrosis renal; sindrome del intestino irritable; piresis; restenosis; malaria cerebral; lesion isquØmica y apoplejia; trauma neural; enfermedad de
20 Alzheimer; enfermedad de Huntington; enfermedad de
Parkinson; dolor agudo y crOnico; alergias, que incluyen,
rinitis alØrgica y conjuntivitis alØrgica; hipertrofia cardiaca; insuficiencia cardiaca crOnica; sindrome coronaric agudo; caquexia; malaria; lepra; leishmaniasis;
25 enfermedad de Lyme; sindrome de Reiter; sinoviitis aguda;

fl3

degeneración muscular, bursitis; tendonitis; tenosinoviitis; sIndrome de disco invertebrado prolapsados, herniados o rotos; osteopetrosis; trombosis; silicosis; sarcosis pulmonar; enfermedad de resorpciOn Æsea, tales
S como osteoporosis o trastornos ôseos relacionados con
mieloma multiple; cancer, que incluye pero no se limita a,
carcinoma de mama metastâsico, carcinoma colorectal,
melanoma maligno, cancer gâstrico y cancer de pulmôn de
cØlulas no pequeæas; reacciÆn de injerto contra hospedero;
10 y enfermedades autoinmunes, tales como, escierosis mæltiple, lupus y fibromialgia; SIDA y otras enfermedades virales, tales coma Herpes zoster, herpes simple I a II,
virus de la influenza, SIndrome Respiratorio Agudo Severo
(SARS) y citomegalovirus; y diabetes mellitus. Ademâs, los
15 mØtodos de las modalidacles pueden ser usados para tratar trastornos proliferativos (que incluyen, hiperplasias tanto
benignas coma malignas), que incluyen, leucemia mielógena,
leucemia mielógena crónica, sarcoma Kaposi, melanoma
metastâsico, mieloma multiple, cancer de mama, que incluye,
20 carcinoma de mama metastÆsico; carcinoma colorectal; melanoma maligno; cancer gâstrico; cancer de pulmón de cØlulas no peque–ias (NSCLC); metastasis Æsea, y similares; trastornos de dolor, que incluyen, dolor neuromuscular, dolor de cabeza, dolor par cancer, dolor dental y dolor por
25 artritis; trastornos angiogØnicos que incluyen,

angiogØnesis de tumor sOlido, neovascularizacióri ocular y hemangioma infantil; condiciones asociadas con las trayectorias de seæalización de ciclooxigenasa y lipooxigenasa, que incluyen, condiciones asociadas con
5 endoperOxido sintasa-2 de prostaglandina (que incluye, edema, fiebre, analgesia, y dolor) hipoxia de órgano; agregaciôn de plaquetas inducida por trombina, ademÆs, los mØtodos descritos en este documento, pueden ser empleados para el tratamiento de enfermedades protozoarias en
10 animales, que incluyen mamiferos.
Un sujeto puede incluir una o mÆs cØlula so
tejidos, u organismos. Un sujeto preferido es un mamIfero.
Un mamifero puede incluir cualquier mamIfero. Como un ejemplo no limitante, los mamIferos preferidos incluyen,
15 ganado vacuno, cerdos, ovejas, cabras, caballos, camellos,
büfalos, gatos, perros, ratas, ratones y humanos. tin sujeto
mamIfero altamente preferido es un humano. E1(los) compuesto(s) puederi ser administrados al sujeto via cualquier ruta de suministro de fÆrmaco conocida en la
20 tØcnica. Las rutas de administración ejemplares especIficas
incluyen, oral, ocular, rectal, bucal, tópica, nasal, oftâlmica, subcutªnea, intramuscular, intravenosa (holo e infusion), intracerebral, transdŒrmica y pulmonar.
Los tOrminos "cantidad terapØuticamente efectiva"
25 y "cantidad profildcticarnente efectiva", como se usa en

este documento, se ref ieren a una cantidad de un compuesto sufic.iente para tratar, aliviar o prevenir la enfermedacl o condición identificada, o exhibir un efecto terapØutico, profilÆctico o inhibitorio detectable. El efecto puede ser
5 detectado mediante, por ejemplo, los ensayos descritos en
los siguientes ejemplos. La cantidad efectiva precisa para
un sujeto, dependerÆ del peso corporal del sujeto, edad y salud; la naturaleza y magnitud de la condiciOn; y el terapŒutico o combinaciôn de teraputicos seleccionados
10 para administración. Las cantidades terapØuticamente y profilÆcticamente efectivas para una situación dada, pueden
ser determinadas por experimentación de rutina que estÆ dentro de la habilidad y juicio del especialista. Preferiblemente, la cantidad activa del compuesto de las
15 modalidades, produce una concentraciôn de sangre o suero u
otro fluido corporal, que es menor que una EC30, EC20, o EC10, por inhibiciôn de cinasa p38 MAPK.
Por cualquier compuesto, la cantidad terapØuticamente o profilÆcticamente efectiva, puede ser
20 estimada inicialmente ya sea en ensayos de cultivo celular,
por ejemplo, de cØlulas neoplÆsicas, o en modelos animales, usualmente ratas, ratones, conejos, perros o cerdos. El modelo animal tamblØn puede ser usado para determinar el intervalo de concentración apropiada y ruta de
25 adm–nistración. Tal información puede entonces, ser usada

para determinar dosis ütiles y rutas para administración en

humanos.

La eficacia terapØutica/profilÆctica y toxicidad,
pueden ser determinados por procedimientos farmacØuticos
5 estÆndares en cultivos celulares o animales experiiuentales,
por ejemplo, ED50 (la dosis teraputicamente efectiva en 50% de la población) y LD50 (la dosis letal al 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicoS
y teraputicos, es el indice terapØutico, y puede ser
10 expresado como la relaciôn ED50/LD50. Las composiciones farmacuticas que exhiben grandes indices teraputicos, son preferidas. Sin embargo, las composiciones farmacØuticas que exhiben indices terapØuticos estrechos, estân tamblØn dentro del alcance de las modalidades. Los datos obtenidos
15 a partir de los ensayos de cultivo y estudios de animales,
pueden ser usados en la formulación de un intervalo de dosificaciones para uso humano. La dosificación contenida
en tales composiciones, estÆ preferiblemente, dentro de un intervalo de concentraciones de circulación que incluyen,
20 un ED50 con poca 0 ninguna toxicidad. La dosificación puede
variar dentro de este intervalo, dependiendo de la forma de dosificación empleada, sensibilidad del paciente, y la ruta
de administraciôn.

Mâs especificamente, las concentraciones de
25 plasma maxima (CMaX), pueden variar desde aproximadamente 65

pM hasta aproximadamente 115 pM, o aproximadamente 75 pM hasta aproximadamente 105 pM, o aproximadamente 85 pM hasta aproximadamente 95 pM, o aproximadamente 85 pM hasta aproximadamente 90 pM, dependiendo de la ruta de
5 administraciôn. Se proporcionan en la literatura, gulas a
dosificaciones y mØtodos de suministro particulares, y estÆn en general, disponibles a practicantes en la tcnica.
En general, la dosis estarÆ en el intervalo de aproximadamente 100 mg/dIa hasta aproximadamente 10 g/dia,
10 o aproximadamente 200 mg hasta aproximadamente 5 g/dIa, o
aproximadamente 400 mg hasta aproximadamente 3 g/dIa, o aproximadamente 500 mg hasta aproximadamente 2 g/dIa, en dosis ünicas, divididas o continuas para un paciente que pesa entre aproximadamente 40 hasta aproximadamente 100 kg
15 (en el cual, las dosis pueden ser ajustadas para pacientes
arriba 0 abajo de su intervalo en peso, particularmente niflos por debajo de 40 kgs). En general, la dosis estarª en
el intervalo de aproximadamente 25 mg/kg hasta aproximadamente 300 mg/kg de peso corporal por dIa.
20 La dosificaciÆn exacta serÆ determinada por el
especialista, en vista de los factores relacionados con el
sujeto, que requiere el tratamiento. La dosificación y administraciôn, son ajustados para proporcionar niveles suficientes del(los) agente(s) activo(s) o mantener el
25 efecto deseado. Factores los cuales pueden ser tomados en

cuenta incluyen, la scveridad del estado de enfermedad, salud general del sujeto, edad, peso y gØnero del sujeto, dieta, tiempo y frecuencia de administración,
combinaciOn(es) de fÆrmaco(s), sensibilidades de reacciÆn y
5 tolerancia/respueSta a terapia. Las composiciones
farmacológicas de acciOn prolongada, pueden ser
administradas dos veces al dia, una vez al dia, una vez
cada dos dias, tres veces por semana, dos veces por semana,
cada 3 a 4 dias, o cada semana, dependiendo de la vida
10 media y velocidad de separaciÆn de la formulación particular. Por ejemplo, en una modalidad, una composición farrnacØutica contiene una cantidad de un compuesto corno se describe en este documento, que es seleccionada para administración a un paciente en un programa seleccionado
15 de: dos veces al dia, una vez al dia, una vez cada dos
dias, tres veces por semana, dos veces por semana y una vez
por semana.

Se apreciarÆ, que ci tratamiento como se describe
en este documento, incluye prevenir una enfermedad, aliviar
20 sIntomas, reducir el progreso de la enfermedad, invertir el
daflo, o curar una enfermedad.
En un aspecto, tratar una condiclØn inflamatoria
resulta en un incremento en el tiempo de supervivencia promedio de una poblaciOn de sujetos tratados, en
25 comparaciÆn con una poblaciÆn de sujetos no tratados.

Preferibiemente, ci tiempo de supervivencia promedio es incrementado par mÆs de aproximadamente 30 dias; mds preferiblemente, par mâs de aproximadamente 60 dias; mÆs preferiblemente, par mÆs de aproximadamente 90 dias; a.n
5 mÆs preferiblemente, por rnÆs de aproximadamente 120 dias.
Un incremento en el tiempo de supervivencia de una poblaciôn, puede ser medido par cualquier media reproducible. En un aspecto preferido, un incremento en el tiempo de supervivencia de una población puede ser medido,
10 par ejemplo, calculanda par una población, la longitud promedio de supervivencia, despuØs de iniciación del tratamiento con un compuesto activo. En atro aspecto preferido, un incremento en el tiempo de supervivencia promedio de una poblacion, tarnbiØn puede ser medido, pot
15 ejemplo, calculando par una población, la longitud promedio
de la supervivencia despuØs de la terminación de una primera ronda de tratamiento con un compuesto activo.
En otto aspecto, tratar una condición
inflamatoria resulta en un decremento en la velocidad de
20 martalidad de una población de sujetos tratadas, en comparaci6n con una pablaciôn de sujetos que reciben portador solo. En atro aspecto, tratar una condiciôn inflamataria, resulta en un decremento en la reiac–ôn de mortalidad de una población de sujetos tratados en
25 camparaciôn can una población no tratada. En un aspecto

)g 0

adicional, tratar una condicidn inflamatoria resulta en una
reducción en la relación de mortalidad de una población de sujetos tratados, en comparación con una poblaciÆn que recibe monoterapia con un fÆrrnaco que no es un compuesto de
5 las modalidades, o una sal, metabolito, anÆlogo o derivado
del mismo farmacØuticamente aceptable. Preferiblemente, la
relación de mortalidad se reduce pot mÆs de aproximadamente
2%; mâs preferiblemente, pot mâs de aproximadamente 5%; mÆs preferiblemente, por mÆs de aproximadamente 10%; y
10 mayormente preferible, pot mªs de aproximadamente 25%. En
un aspecto preferido, una reducción en la relaciôn de mortalidad de una pobiación de sujetos no tratados, puede
set medida pot cualguier medlo reproducible. En otto aspecto preferido, una reducción en la relaciôn de
15 mortalidad de una poblaciôn, puede set medida pot ejemplo,
calculando para una población, el nümero promedio de muertes relacionadas con la enfermedad pot unidad de tiempo, despuŒs del iniclo del tratamiento con un compuesto activo. En otto aspecto preferido, una reduccidn en la
20 relación de mortalidad de una poblaciôn, tamblØn se puede
medir, pot ejernplo, calculando pot una poblaciôn, ci nümero promedio de muertes relacionadas con la enfermedad por
unidad de tiernpo, despuØs de la terminación de una primera
ronda de tratamiento con un compuesto activo.
25 En otto aspecto, tratar una condicidn

inflamatoria resuiLta en un decremento en velocidad de crecimiento de un tumor. Preferiblemente, despuØs del tratamiento, la velocidad de crecimiento del tumor es reducida pot al menos, aproximadamente 5% con relacidn
5 a/niimero antes del tratamiento; mâs preferiblemente, la velocidad de crecimiento del tumor se reduce pot al menos, aproximadamente 10%; mÆs preferiblemente, se reduce pot al menos, aproximadamente 20%; mÆs preferiblemente, se reduce pot al menos aproximadamente 300-.; mâs preferiblemente, se
10 reduce pot al menos, aproximadamente 40%; inÆs preferiblemente, se reduce por al menos, aproximadamente 50%; an mâs preferiblemente, se reduce pot al menos, 60%;
y mÆs preferiblemente, se reduce pot al menos aproximadamente 75%. La velocidad de crecimiento del tumor
15 puede set medida pot cualquier medio reproducible de medición. En un aspecto preferido, la velocidad de crecimiento del tumor es medida de conformidad con un camblo en el diÆmetro del tumor pot unidad de tiempo.
En otto aspecto, tratar una condición
20. inflamatoria, resulta en una reducción en la relación de proliferación celular. Preferiblemente, despuØs del tratamiento, la relación de proliferación celular se reduce pot al menos, aproximadamente 5%; ms preferiblemente por
al menos aproximadamente 10%; mâs preferiblemente, por al
25 menos aproximadamente 20%; mâs preferiblemente, pot al

\9’J7

menos aproximadamente 30%; mÆs preferiblemente, par al menos aproximadamente 40%; mÆs preferiblemente, por al
menos aproximadamente 50%; aün mÆs preferiblemente, por al
menos aproximadamente 60%; y mÆs preferiblemente, par al
5 menos aproximadamente 7558. La relación de proliferaciôn celular puede ser medida par cualguier media reproducible
de mediciôn En un aspecto preferido, la relación de proliferación celular es medida, par ejempla, midiendo el ruimero de cØlulas en division en una muestra de tejido par
10 unidad de tiempo.
En otro aspecto, el tratamiento de una candiciOn
inflamatoria resulta en una reducciOn en la proporciOn de cØlulas de proliferaciOn. Preferiblemente, despuØs del tratamiento, la proporciOn de cØlulas de praliferaciOn, se
15 reduce por al menos 5%; mÆs preferiblemente, par al menos
aproximadamente 10%; mae preferiblemente, par al menos aproximadamente 20%; mÆs preferiblemente, par al menos aproximadamente 30%; mÆs preferiblemente, par al menos aproximadamente 40%; mÆs preferiblemente, par al menos
20 aproximadamente 50%; aün mae preferiblemente, par al menos
aproximadamente 60%; y mayormente preferible, par al menos, aproximadamente 75%. La praporciOn de cØlulas de proliferaciOn puede ser medida por cualquier media reproducible de mediciOn. En un aspecto preferido, la
25 praparciOn de cØlulas de praliferaciOn es medida, par

ejemplo, cuantificando el nilmero de cØlulas de division, con relaciOn al nümero de cØlulas sin divisiOn en una muestra de tejido. En otro aspecto preferido, la proporciOn de cOlulas de proliferaciOn es equivalente al Indice
5 mitOtico.

En otro aspecto, tratar una condiciOn
inflamatoria resulta en una reducciOn en tamaæo de un area
o zona de proliferaciOn celular. Preferiblemente, despuØs del tratamiento, el tama?io de un area o zona de
10 proliferaciOn celular, se reduce por al menos, 5% con relaciOn a su tamaæo antes del tratamiento; mØs preferiblemente, se reduce por al menos, aproximadamente 10%; mÆs preferiblemente, se reduce por al menos, aproximadamente 20%; mÆs preferiblemente, se reduce por al
15 menos, aproximadamente 30%; mÆs preferiblemente, se reduce
por al menos, aproximadamente 40%; mÆs preferiblemente, se
reduce por al menos aproximadamente 50%; aün mâs preferiblemente, se reduce por al menos, aproximadamente
6096;, y mayormente preferible, se reduce por al menos,
20 aproximadamente 75%. El tamafio de un area o zona de

40 proliferaciOn celular, puede ser rnedido por cualquier medio
reproducible de mediciOn. En un aspecto preferido, el
tamaæo de un area o zona de proliferaciOn celular, puede
ser medido coma, un didmetro o amplitud de un area o zona de
25 proliferaciOn celular.

yf

Los mØtodos descritos en este documento, pueden
incluir identificar un sujeto en necesidad del tratamiento.
En una modalidad preferida, los mØtodos incluyen identificar un mamifero en necesidad del tratamiento. En
5 una modalidad muy preferida, los mØtodos incluyen identificar un humano en necesidad del tratamiento. Identificación de un sujeto en necesidad del tratamiento puede ser acompaæada por cualquier medio, que indica un sujeto el cual puede beneficiarse del tratamiento. Por
10 ejemplo, identificar un sujeto en necesidad del tratamiento puede ocurrir por diagnosis clInica, prueba de laboratorio
o cualquier otro medios conocido por un experto en la tØcnica, que incluye cualquier combinación de medios de

identificación.
15 Como se describe en este documento, los compuestos descritos en este documento, pueden ser formulados en composiciones farmacØuticas, si se deseas, y
pueden ser administrados por cualquier ruta que perrnite el tratamiento de la enfermedad o condición. Una ruta
20 preferida de administración es administración oral. La

46 administración puede tomar la forma de administración de
dois ünica, o el compuesto de las modalidades puede ser administrado durante un periodo de tiempo, ya sea en dosis
dividida o en una formulaciÆn de liberaciôn continua o
25 mØtodo de administraciôn (por ejemplo, una bomba). Sin

embargo, los compuestos de las modalidades se administran ci sujeto, las cantidades de compuesta administrado y la ruta de administraciôn escogida, debe ser seleccionada para permitir tratamienta eficaz de la condiciân de enfermedad.
5 Los mtodos de las madalidades tambiØn incluyen el usa de un campuesto a compuestas coma se describe en este documento junta con uno a mÆs agentes terapØuticos adicionales para el tratamienta de las condiciones de enfermedad. Asi, par ejemplo, la combinaciÆn de
10 ingredientes activos pueden ser: (1) co-formulados y administrados a suministradas simultâneamente en una formulación combinada; (2) suministrado por alteraciôn o en paralelo coma formulaciones separadas; a (3) par cualquier otro regimen de terapia de cambinación conocido en la
15 tØcnica. Cuando se suministra en terapia de alternancia,
los metodos descritos en este docurnento, puede comprende administrar a suministrar las ingredientes activos en forma secuencia, por ejemplo, en solución separada, emulsion, suspension, tabletas, pildoras a câpsulas, a par diferentes
20 inyeccianes en jeringas separadas. En general, durante la
terapia de alternancia, una dasificación efectiva de cada ingrediente activo es administrada en forma secuencial, es decir, en forma serial, mientras que en terapia simultdnea, dosificacianes efectivas de dos a mÆs ingredientes activos
25 son administradas juntas. TambiØn se pueden usar varies

secuencias de terapia de combinaciÆn intermitente.
Se contemplan pruebas de diaqnóstico corno parte
de los mØtodos descritos en este documento. Por ejemplo, se puede tomar una muestra de biopsia del tejido de un sujeto
5 que sufre de una condiciôn inflamatoria, per ejemplo, una
condición asociada a p38 o asociada a citocina. La muestra
para biopsia se puede probar para determinar el nivel de actividad de p38 (o niveles de citosina) presente en la
muestra; la muestra puede eritonces ser puesta en contacto
10 con un compuesto seleccionado de las modalidacles, y la
actividad p38 (o niveles de citocina) medida para determinar si el compuesto tiene el efecto deseado (par
ejemplo, inhibiciôn de actividad p38 o citocina con un EC50
en el intervalo de aproximadamente 100 pM y aproximadamente
15 1000 pM, preferiblemente aproximadamente 50 pM hasta aproximadamente 650 pM) - Tal prueba puede ser usada para determinar si el tratamiento con tal compuesto es similarmente efectivo en el sujeto. Alternativamente, la muestra puede estar en contacto con un compuesto etiquetado
20 (per ejemplo, un compuesto etiquetado fluorescentemente, o
un compuesto etiquetado radloactivamente) y la muestra entonces examinada y la sefa1 fluoreseente o radioactiva detectada para determinar la distribución de p38 en la muestra de tejido. TambiØn se pueden usar muestras de
25 biopsia repetidas tomadas durante el curse del tratamiento,

para estudiar la eficacia del tratamiento. Otras pruebas para diagnôstico que usa los compuestos descritos en este documento serÆn aparentes a uno de experiencia ordinaria en
la tØcnica en vista de las ensefanzas de esta
5 especificaciôn.
Asi, por ejemplo, una modalidad proporciona
mtodos para determinar la presencia, ubicación o cantidad,
o cualquier combinac–ón de estos para la protelna p38 en una cØlula o muestra de tejido. Los mØtodos incluyen: a)
10 poner en contacto la muestra celular o de tejido con un
compuesto de la modalidad, bajo condiciones tales que el
compuesto puede unirse a al menos una p38 MAPK; y b)
determinar la presencia, ubicaciôn o cantidad, o cualquier
combinación de estos, del compuesto en la muestra celular 0
15 de tejido, con ello determinar la presencia, ubicación o
cantidad, o cualquier combinación de estos, de al menos una
p38 MAPK en la muestra celular o de tejido. Determinar la
presencia, ubicación o cantidad, o cualquier combinación de
estos, del compuesto en la muestra celular o de tejido,
20 puede ser conducida por cualquier medio que revela la
presencia, ubicación o cantidad, o cualquier combinacidn de
estos, del compuesto en la cØlula o tejido. Por ejemplo, como se describe previamente, se pueden usar rnØtodos de etiquetado radioactivo o fluorescente. SerÆn aparentes a un
25 experto en la tØcnica, mØtodos adicionales para determinar

la presencia, ubicaciôn a cantidad, a cualquier combinaciôn

fl

de estos, del compuesto.
Otra modalidad proporciona mØtodos Para
determinar: (1) si un compuesto sera’ un agente teraputico
5 ütii Para ci tratamiento de un sujeto que sufre de una
condición inflamatoria, o (2) la severidad de la enfermedad
a (3) el curso de la enfermedad durante el tratamiento con
un agente que modifica la enfermedad. Los mØtodos incluyen:
a) obtener una muestra celular a de tejido del sujeto
10 antes, durante y despuŒs de la terminación del tratamiento
con un compuesto coma se describe en este documento u otro agente que modifica la enfermedad; b) poner en contacto la muestra con ci compuesto; y c) determinar la cantidad del
compuesto que se una a la muestra, en donde la union a p38
15 MAPK par el compuesto se relaciona a la cantidad de p138
MAPK en la muestra.

Muestras especificas de enfermedades contempladas oara ser tratadas por los compuestos y mØtodos descritos en este
20 documento

La enfermedad pulmonar obstructiva crOnica (COPD)
se caracteriza par un proceso infiamatorio crOnico en el puimOn, que incluye (1) nümero incrementado de cØlulas
inflamatorias (cØlulas neutrOfilas, macrOfagas y SD8 T) en
25 las vIas respiratorias y parOnquima, (2) expresiOn de

quimocina y citocina inflamatoria incrementada, y (3) nümero incrementado de proteasas (elastasas, catepsinas y metaloproteinasas de matriz, MMP) La prodticción y acciôn de muchos de los mediadores potenciales de in–lamaciôn de
5 vIas respiratorias se cree ser dependientes en la MAPK inducida por estrØs o cascada cinasa p38. Varios reportes soportan la asociaciÆn de activaciÆn de cinasa p38 con plØtora de eventos pulmonares: la expresión molØcula 1 de adhesiÆn intracelular inducida por LPS- y TNF-a en cØlulas
10 endoteliales microvasculares, activaciôn MMP-9,
estimulación inducida por hipoxia de cØlulas arteriales pulmonares, expresión IL -8 inducida por hiperosmolaridad en cØlulas epiteliales bronquiales y trÆfico y supervivencia
de eosinófilo iritensificado
15 Trifilieff et al. (2005 Brit J Pharmacol 144:1002-10) reporta que CGH2466, un agonista del receptor adenosina cotnbinado, p38 MAPK e inhibidor tipo 4 de
fosfodiesterasa muestran actividades anti- inflamatorias in
vitro e in vivo potentes en enfermedades tales como asma y
20 COPD. Underwood et al. (2000 Am J Physiol Lung Cell Mol
Physiol 279: L895 -L902) demuestra que en inhibidor p38 MAPK potente y selectivo, SB239063, reduce la producciôn de citocina proinflamatoria, que incluye IL -Ill, TNF-, IL -6, e
IL -B, las cuales estÆn enlazadas a fibrosis de vias
25 respiratorias debido a su capacidad para regular la

? qo

proliferación de fibroblastos y producción de matriz; que conduce a trÆfico y activaciÆn de neutrófIlo disminuido en
el pulmón. Anteriormente, el mismo compuesto se encuentra
que es capaz de alterar respuestas asociadas con fibrosis
5 crónIca inducida por bleomicina. Esta actividad inhibitoria
es selectiva para las isoformas c y (3 del p38. Los compuestos y mØtodos descritos en este documento son ütiles
en el tratamiento de COPD.

10 Fibrosis Pulmonar

La fibrosis pulmonar tarnbiŒn ilarnada fibrosis
pulmonar idiopÆtica (IPF), fibrosis pulmonar difusa intersticial, fibrosis pulmonar inflamatoria o alveolitis
fibrosa, es un trastorno inflamatorio del pulmón y un grupo
15 heterogØneo de condiciones caracterizadas par formación anormal de tejido fibroso entre el alveolo causada por alveolitis, que comprende una infiltración celular inflamatoria en el septo alveolar con fibrosis resultante.
Los efectos de IPF son crónicos, progresivos y a menudo
20 fatales. Se ha detnostrado la activaciOn de p38 MAPK en el
pulmón del pacierite con fibrosis pulmonar. Un nümero de investigaciones al rededor de fibrosis pulmonar han
indicado que la expresiôn sostenida u aumentada de algunas
citocinas en el pulmón, son relevarites para el ingreso de
25 cØlulas inflamatorias y acumulación de componerites de

matriz extracelular, segudo por remodelacion de la arquitectura del pulmón. En particular, las citocinas proinflamatorias tales como TNF-c e interleucina IL- 13 se
ha demostrado que juegan un papel principal en la formación
5 de neutnonitis y fibrosis pulmonar. Ademâs, las citocinas
profibróticas tales como TGF- y CTGF tambiØn juegan
papeles criticos en la patogØnesis de fibrosis pulmonar.
Matsuoka et al. (2002 Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol
283: L103 -L112) ha demostrado que in inhibidor p138, FR -
10 167653, mejoran la fibrosis pulmonar inducida por murina
bleomicina. AdemÆs, la pirfenidona (5-metil-1-fenhl-2-(1H)-
piridona), un compuesto con efectos anti -inflamatorios,
antioxidantes y antifibrOticos combinados, se encuentra ser efectivo en modelos experimentales de fibrosis pulmonar,
15 asi como en estudios clinicos (Raghu et al. 1999 Am J
Respir Crit Care Med 159: 1061-1069; Nagai et al. 2002
Intern Med 41: 1118-1123; Gahi et al. 2002 Mol Genet Metab
76: 234-242; Azuma et al. 2002 Am J Respir Crit Care Med 165: A729). Los compuestos y mØtodos descritos en este
20 documento son ütiles en el tratamiento de fibrosis pulmonar, tal como IPF.

Bronquiolitia obliterante y Smndrome de Bronquiolitis obliterante

25 La bronquiolitis obliterante, y su condición

10)2

clinica correlacionada, sIndrome de bronguiolitis obliterante, se caracterizan pot obstrucciôn de la trayectoria pulmonar via obliteraciôn de vias respiratorias pequefias pulmonares. En bronquiolitis obliterante, el
5 examen patológico, caracteristicamente encuentra lesiones,
las cuales obstruyen u oblitera las vias respiratorias pequefias en el pulmón. Estas lesiones son tejido fibromixoide granular y tejido endurecido submucosal denso.
El progreso de las lesiones a partir de inflamaciôn
10 prolongada, anormal o aberrante de estructura epitelial y
la localizada epitelial de las vias respiratorias pequeIas, mediadas pot citocinas proinflamatorias, tales como TNF-cix y resulta en fibroproliferación excesiva. La obliteración de vias respiratorias peque?ias pulmonares, progresivamente
15 conduce a obstrucción de flujo de aire, caracterizado pot
declive progresivo en volumen respiratorio forzado en un segundo (FEV1), y es a menudo acompai.iado pot infecciones recurrentes del tracto respiratorio inferior y colonizaciôn
de tejido pulmonar pot microorganismos patogØnicos.
20 Efectos del smndrome de Bronquiolitos obliterantes afecta al 5060% de pacientes que sobreviven cinco aæos despuØs de la cirugia de transpiante, y cinco aæos de supervivencia despuØs del ataque del sIndrome bronquiolitis obliterantes es inicamente 3040. Pacientes
25 de transplante de pulmón que experimentan ci sindrome de

bronquiolitis obliterante responde poco a inmunosupresiÆn aumentada. En pacientes con fibrosis pulmonar idiopÆtica,
la supervivencia despuØs del sIndrome bronquiolitis obliterante es mâs corto en pacientes con enfisema Los
5 compuestos y mØtodos descritos en este documento son ütiles en el tratamiento del sIndrome bronquiolitis obliterante.

Fibrosis de Aloinjerto crônico
La falla de Aloinjerto es una pieocupaci6n
10 profunda en el manejo de transpiante. Uno de las causas principales de falla de Aloinjerto es distunción heteróloga crØnica. Huellas de disfunción de Aloinjerto son inflamaciÆn crónica y fibrosis crônica, ambas estªn asociadas con la producción de citocinas inflamatorias y
15 factores de crecimiento. La mediación de citocina inflamatoria y factores de crecimiento, particularmente resulta en la interrupción de colÆgeno y producción de TGF,
es ütil en el tratamiento de fibrosis de aloinjerto crónica. El tØrmino ’fibrosis de aloinjerto crØnica" como
20 se usa en este documento, se pretende abarcar tanto inflamaciÆn crônica come fibrosis crØnica asociada con
fibrosis de aloinjerto crónica. Los compuestos y mØtodos
descritos en este documento, son ltiles en el tratamiento
de fibrosis aloinjerto crónica.
25

Fibrosis Renal

\CS

Irrespectiva de la naturaleza del ataque inicial,
la fibrosis renal se corisidera ser la trayectoria final comün por el cual la enfermedad del riflôn progresa a la
5 falla renal de etapa final. Stambe et al. (2004, J A, Soc
Nephrol 15:370-379) prueba un inhibidor de la forma activa (fosforilada) de p38, NC 31169, desarrollada por Scios Inc.
(San Francisco, CA) en un modelo de rata de fibrosis renal,
y reporta una reducción significante en fibrosis renal
10 valorada por volumen intestinal, deposición de colÆgeno IV
y niveles ARNm tie crecimiento tie tejido conectivo. Los compuestos y mØtodos descritos en este documento son ütiles
en el tratamiento de fibrosis renal.

15 Leiomioma
Leiomiomas uterinas o fibrosis son los tumores

pØlvicos mÆs cotnunes en la mujer, sin conocer terapias tie fÆrmaco tie acción prolongada disponibles. Las leiomiomas
son caracterizadas por proliferación incrementada y
20 fibrosis tie tejido. La pirfenidona se prueba en proliferaciôn celular y expresión tie colgeno en
del müsculo blando leiomioma y miornetrial, y se encuentra
ser un inhibidor efectivo tie proliferación celular miometrial y leiomioma (Lee et al. 1988 J Endocrinol
25 Metab 83:219-223). Los compuestos y mØtodos en este

documento, son Gtiles en el tratamiento de lelorniomas.

Fibrosis Endomiocardial
La fibrosis endomiocardial (EMF) es un trastorno
S caracterizado par ci desarrollo de cardiopatla restrictiva.
La EMF es algunas veces considerada parte de un espectro de
un proceso de enfermedad ünico que incluyen endocarditis Loftier (fibrosis endomiocardial eosinofIlica no tropical o endocarditis perietal fibroplÆsica con eosinofilia). En
10 EMF, el proceso subyacente produce fibrosis dispareja de la
superficie endocardial del corazón, que conduce a reducir
el acatamiento, fisiologla coma la superficie endomiocardial liega mÆs generalmente involucrada. La fibrosis endocardial principa].mente involucra los tractos
15 de afluencia del ventrIculo izquierdo y derecho, y puede
afectar las vÆlvulas atrioventriculares, que conduce a regurgitación tricüspide y mitral. La activaciôn MAPK se muestra par contribuir a la remodelación estructural atrial arritmogØnica en EMF. Los compuestos y mØtodos descritos en
20 este documento, son ütiles en ci tratamiento y/o prevención
de fibrosis endomiocardial.

Otras Enfermedades inflamatorias
Muchas enferrnedades autoinmunes y enfermedades
25 asociadas con inflamaciOn crónica, asi coma repuesta aguda,

[9(2

se han vinculado a activaciOn de cinasa p38 MAP y la sobre expresión o desregulaciôn de citocinas inflamatorias. Estas enfermedades incluyen, pero no se limitan a: artritis reumatoide; espondilitis reumatoide; osteoartritis; gota,
5 otras condiciones artrIticas; sepsis, golpe sØptico; golpe
endotOxico; sepsis gram-negativo, sindrome de golpe tóxico;
asma; sindrome de estrØs respiratorlo en adulto; enfermedad pulmonar obstructiva crÆnica; inflamaciôn pulmonar crónica; enfermedad inflamatoria del intestino; enfermedad de Crohn;
10 psoriasis; eczema; colitis ulcerativa; fibrosis
pancreÆtica; fibrosis hepâtica; enfermedad renal aguda y crônica; sindrome del intestino irritable; piresis; restenosis; malaria cerebral; apoplejia y lesion isquØmica; trauma neural; enfermedad de Alzheimer; enfermedad de
15 Huntington; enfermedad de Parkinson; dolor agudo y crOnico;
rinitis alØrgica; conjuntivitis alØrgica, falla de corazOn crOnica; sindrome coronario agudo; caguexia; malaria; lepra; leismaniasis; enfermedad de Lyme; sindrome de Reiter; sinovitis aguda; degeneraciOn muscular, bursitis;
20 tendonitis; tenosinovitis; sindrome del disco invertebral
herniado, roto o prolapso; osteoporosis; trombosis; cancer; restenosis; silicosis; sarcosis pulmonar; enfermedad de reabsorci6n de hueso, tal como osteoporosis; reacciOn del hospedante contra ci heterOlogo; y enfermedades auto
25 inmunes, tales como Escierosis Multiple, lupus y

fibromialgia; SIDA y otras enfermedades virales, tales como Herpes Zoter, Herpes Simple I o II, virus de la influenza
y citomegalovirus; y diabetes mellitus.
Muchos estudios han mostrado que reduciendo la
5 actividad de cinasa p38 MAP, sus activadores corriente arriba o sus efectores corriente abajo, ya sea a travs de medio gendtico o quimico, embota la respuesta inflamatoria
y previene o minimiza el daflo al tejido (vØase, por ejemplo, English, et al. 2002 Trends Pharmacol Sci 23:40-
10 45; y Dong et al. 2002 Annus Rev Immunol 20:5S-72). As!,
los inhthidores de actividad p38, los cuales tambiØn inhiben el exceso o la producciÆn de citocina no regulada,
y pueden inhibir mÆs que una citocina proinflamatoria
ü nica, pueden ser ütiles como agentes y terapØuticos anti -
15 inflamatorios. Ademâs, el nümero amplio de enfermedades
asociadas con respuestas inflamatorias asociadas con cinasa p138 MAP indican que existe una necesidaci para mØtodos efectivos para tratar estas condiciones.

20 Enfermedad Cardiovascular. La inflamaciôn y activacidn/infiltración del leucocito juega un papel principal en el inicio y progreso de enfermedades cardiovasculares, que incluyen ateroescierosis o falla cardiaca. La inhibicidn de la trayectoria de proteina
25 cinasa (MAPK) que activa al mitdgeno p38 agudo, disminuye

la lesiôn del tejido y acumulación de leucocito en lesion

5

de isquemia/repertusiófl al miocardio. Los compuestos y mtodos descritos en este documento, son ütiles para tratar
la enferrnedad cardiovascular.

Escierosis Multiple: La inflamaciOn en el sisterna
nervioso central ocurre en las enfermedades tales como escierosis multiple y conduce a disfunciôn y destrucciOn de axOn. Ambas observaciOn in vitro e in vivo han mostrado un
10 papel importante para Oxido nitrico (No) en la mediaciOn de
axonopatia inflamatoria. Las cinasas p38 MAPK se activa por exposición a NO y se muestra la inhibiciOn de seflalizaciOn p38 para conducir a efectos de supervivencia neuronal o axonal. 0CM e IGF-1 reducen la activaciOn p38 en neuronas
15 corticales expuestas a NO y mejorando la supervivencia a
axOn en cultivos expuestos a NO, un proceso depende en sefializaciOn de cinasa relacionada a la sefi.al proteIna cinasa/extracelular activada con el mitOgeno. Los compuestos y mOtodos descritos en este documento son ütiles
20 para tratar escierosis multiple.

Sin función del injerto primarlo: InflamaciOn no
especifica es asociada con la sin funciOn del injerto primario (PNF). La lesiOn de isleta inflamatoria es mediada
25 al menos parcialmente por citocinas por-inflamatorias, tal

corno interleucina-1 (IL -113) y factor -c de necrosis del
tumor (TNF- c) producido por macrôfagos residentes de
isleta. La trayectoria p138 se conoce por estar involucrada
en la producción de citocina en las cØlulas del linaje de
5 macrÆf ago de moiaocito. La inhibiciÆn de la trayectoria p38
por un inhibidor p138 quimico, IL -1p suprime a SB203580 y la
producción de TNF-c en isletas de humano expone a lipopolisacÆridos (LPS) y/o citocinas inflamatorias. A
pesar que IL -1p es predominantemente producida por
10 macrófagos residentes, las cØlulas ductales y las cØlulas
endoteliales vasculares de isleta se encuentran ser otra
fuente celular de IL -113 en isletas humanas aisladas. La
SB203580 tambiØn inhibe la expresión de sintasa de Æxido
nItrico inducible (iNOS) y ciclooxigenasa-2 (COX -2) en las
15 isletas tratadas. AdernÆs, las isletas humanas tratadas con
SB203580 por 1 horas antes del transpiante, muestran función de injerto significantemente mejorada. Los compuestos y mØtodos descritos en este documento son ütiles para mejorar la supervivencia del injerto en transpiante de
20 isletas clInicas.

Lesion renal Aguda: El cisplatino es un agente
quimioterapØutico importante, pero puede causar lesiOn
renal aguda. Parte de esta lesiOn renal aguda es mediada a
25 travØs del factor -a de necrosis de tumor (TNF-a) - El

>7O

cisplatino activa p38 MAPK e induce apoptósis en cØlulas cancerigenas. La activación Ic p38 MAPK conduce a un incremento en la producción dc TI-iF-c en lesion isquØmica y
en macrOfagos. In vitro, el cisplatino causa una activaciOn
5 dependiente de la dosis de p138 MAPK en cØlulas del conducto
proximal. La inhibiciOn de activaciOn de p138 MAPK conduce a
la ixihibiciOn de producciOn de TNF-c. In vivo, ratones
tratados con una dosis nica de cisplatino desarrollaron
severa disfunciOn renal, la cual es acompaflada por in
10 incremento en actividad p38 MAPK del riflOn y un incremento
en leucocitos de infiltraciOn. Sin embargo, los animales tratados con un inhibidor SKF86002 de p38 MAPK a lo largo
con cisplatino, muestra menos disfunciOn renal, menos lesiOn histolOgica severa y pocos leucocitos comparado con
15 animales tratados con cisplatino+vehIculo. Los compuestos y
mØtodos descritos en este documento son ütiles para prevenir la lesiOn renal aguda.

Periodontitis. La bradiquinina (BK) mediadora
20 proinflamatoria que estimula la producciOn de interleucina-
8 en fibroblastos gingivales de humano in vitro y juega un importante papel en la patognesis de varias enfermedades inflamatorias que incluyen periodontitis. El inhibidor SR 203580 de proteina cinasa (MAPK) que activa ci p38 mitOgeno
25 especIfico reduce la producciOn de IL -8 estimulada por la

combinación de BK e IL -13, asI corno la producclÆn de IL -8 que estimula IL -1. Los compuestos y rntodos descritos en este documento son ütiles para tratar o prevenir periodontitis -
5

Coinposiciones FarmacUticaS
Mientras es posible para los compuestos descritos
en este documento ser administrados solos, puede ser preferible formular los compuestos coma composiciones
10 farmacuticas. Como tal, se proporcionan en aün otro aspecto, las composiciones farmacØuticas ütiles en los mØtodos de la invenciôn. MÆs particularmente, las composiciones farmacØuticas descritas en este documento, pueden ser ütiles, inter e1ia para tratar a prevenir
15 condiciones inflamatorias, por ejemplo, condiciones asociadas con actividad p38 o actividad citocina a cualquier combinación de los mismos Una composiciÆn farmacØutica es cualquier composición que puede ser administrada in vitro a in viva a ambas a un sujeto para
20 tratar a mejorar una condición. En una rnodalidad preferida, una composiciófl farmacØutiea puede ser administrada in viva. Un sujeto puede incluir una a mâs cØlulas a tejidos,
u organismos. Un sujeto preferido es un mamitero. Un mamIfero incluye cualquier mamIfero, tal coma por medio de
25 ejemplos ni limitantes, ganado vacuno, cerdos, ovejas,

cabras, caballos, carnellos, büfalo, gato, perro, ratas, ratones y hurnanos. Un mamifero sujeto muy preferido es un

humano -

En una modalidad, las composiciones farmacØuticas
5 pueden ser formuladas con excipientes farmacØuticamente aceptables tales coma portadores, soiventes, estabilizadores, adyuvantes, diluyentes, etc., dependiendo
de la forma particular de administraclØn y forma de dosificaciôn Las composiciones farmacØuticas debe ser
10 generalmente formulada Para lograr un pH fisiológicamente compatible y cualquier intervalo de un pH de aproximadamente 3 a un pH de aproximadamente 11, preferiblernente aproximadamente pH 3 hasta aproximadamente
PH 7, dependiendo de la formulación y ruta de
15 administración. En modalidades alternativas, se puede preferir que el pH se ajusta a un intervalo de aproximadamente pH 5.0 hasta aproximadamente pH 8. particularmente, las composiciones farmacØuticas pueden comprender una cantidad terapŒuticamente o
20 profilÆcticamente efectiva de al menos un compuesto coma se describe en este documento, junto con uno a mâs excipientes aceptables. Opcionalmente, las composiciones farmacØuticas pueden comprender una combinación de los compuestos descritos en este documento, a pude incluir un segundo
25 ingrediente activo en ci tratamiento a prevenciÆn de

0$

infecciones bacterianas (por ejemplo, agentes anti bacterianos o anti-microbianos) -
Las formulaciones, por ejemplo, para administraciôn parenteral y oral, son mÆs tipicamente
S sôlidas, soluciones liquidas, emulsiones o suspensiones, mientras las formulaciones inhalables para administración pulmonar son generalmente lIquidas o polvos, con las formulaciones en polvo siendo general preferidas. Una composición farmacØutica preferida puede tarnbiØn ser
10 formulada como un sólido liofilizado que es reconstituido con un solvente fisiológicamente compatible antes de la administración. Composiciones farmacØuticas alternativas pueden ser formuladas como jarabes, cremas, ungüentos, tabletas y similares.
15 El tØrmino ’excipiente farmacØuticamente aceptable" se refiere a un excipiente para administración
de un agente farmacØutico, tal como los compuestos descritos en este documento, El trmirto se refiere a cualquier excipiente tarmacØutico que puede ser
20 administrado sin excesiva toxicidad.
Los excipientes farmacØuticamente aceptables se
determinan en parte por la composición particular a ser administrada, asI como por el mØtodo particular usado para administrar la composiciôn. Por lo tanto, existe una amplia
25 variedad de formulaciones adecuadas de composiciones

? °y

p)
farmacŒuticas (vØase, par ejemplo, Remington’s Pharmaceutical Sciences)
Tales excipientes adecuados pueden ser molØculas
portadoras que incluyen macromolŒculas grarides, lentamente
S metabolizadas tales coma proteInas, polisacâridos, Æcido polilâctico, Æcidos paliglicdlicos, aminoÆcidos polimricos, copolimeros de aminoÆcido y particulas de virus inactivos. Otros excipientes ejemplares incluyen antioxiclantes, tales como Æcido ascórbico; agentes
10 quelantes tales coma EDTA; carbohidratos tales coma dextrina, hidroxialquilcelulosa, hidroxialguilmetilcelulosa, Æcido esteÆrico; lIquidos tales como aceites, agua, sauna, glicerol y etanol; agentes humectantes o emulsificantes; sustancias amortiguadoras del
15 pH; y similares. Liposomas tambiŒn se incluyen dentro de la definición de excipientes tarmacØuticamente aceptables.
Las composiciones farmacuticas descritas en este
documento, pueden ser formuladas en cualquier forma adecuada para la administracidn del mØtodo pretendido.
20 Cuando se pretende para usa oral, por ejemplo, se pueden preparar tabletas, trociscos, grageas, suspensiones acuosas
a aceitosas, soluciones no acuosas, polvos dispersables, a
grÆnulos (que incluyen particulas micronizadas a nanoparticulas), emulsiones, cÆpsulas duras a suaves,
25 jarabes o elixires. Composiciones pretendidas para uso

0

oral, se pueden preparar de conformidad con cualquier mØtodo conocido en la tØcnica para la manufactura de composiciones farmacØuticas, y tales composiciones pueden contener uno o mÆs agentes que incluyen agentes
5 edulcorantes, agentes saborizantes, agentes colorantes y agentes preservativos, para proporcionar una preparación apetecible.
Excipientes farmacØut icamente aceptables particularmente adecuaclas para uso junto con tabletas,
10 incluye, por ejemplo, diluyentes inertes, tales como celulosas, carbonato de calcio o sodio, lactosa, fosfato de calcio o sodio; agentes desintegrantes, tales como povidona reticulada, almidØn de maIz o Æcido alginico; agentes enlazantes, tales como povidona, almidón, gelatina o
15 acacia; y agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio, Æcido esteÆrico o talco.
Las tabletas pueden ser no revestidas o pueden
ser revestidas por tØcnicas conociclas, que incluyen microencapsulación o desintegración retrasada y adsorción
20 en el tracto gastrointestinal y con ello proporcionar una acción sostenida durante un periodo prolongado. Por ejemplo, se puede emplear material tiempo retardado tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo solo o con una cera.

25 Las formulaciones para uso oral pueden tambiØn

estar presentes coma cÆpsula de gelatina dura, en donde ci ingrediente activo se mezcla con un diluyente sólido
inerte, pot ejemplo celulosa, lactosa, gosfato de calcio o
caolmn, a como cÆpsulas de gelatina suave, en donde el
5 ingrediente activo es mezclado con un media no acuoso a
aceitoso, tal coma glicerina, propilen glicol, polietilen
glicol, aceite de cacahuate, parafina liquida o aceite de

olivo.

En otra modalidad, las composiciones
10 farmacØuticas puede set formuladas como suspensiones, que
comprenden un compuesto de las modalidades en mezcla con al menos un excipiente farmacØuticamente aceptable, adecuado para la manufactura de una suspensión.
En aiin otra modalidad, las composiciones
15 farmacØuticas pueden set formuladas como polvos dispersantes y grânulos adecuados para la preparaciôn de
una suspension par la adiciôn de excipientes adecuados-Excipientes adecuados para usa en conexiOn con
suspensiones incluyen agentes de suspensiOn, tales como
20 carboximetilcelulosa de sodia, metilcelulosa, hidroxipropil
metilcelulasa, alginato de sodia, polivinilpirrolidana, goma de traqacanto, goma de acacia, agentes dispersantes y humectantes tal como un fosfÆtica que cc angina naturalmente (pot ejemplo, lecitina), un producto de
25 condensaciOn de un Oxido de aiquileno con un âcido graso

(pot ejemplo, esteatato de polioxietileno), un producto de condensación de ôxido de etileno con un alcohol alifÆtico
de cadena larga (pot ejemplo, heptadecaetilenoxietanol), un
producto de conderisacidn de óxido de etileno con un
5 derivado de 6ster parcial a partir de un Æciclo graso y un
anhidrido de hexitol (pot ejemplo, sorbitaxi monooleato de
polioxietileno); polisacªridos y compuestos similares a polisacÆridos (pot ejemplo, sultato de dextrano); glicoaminoglicol y compuestos similares a
10 glicosaminoglicano (pot ejemplo, ªcido hialurónico); y agentes espesantes, tales como carbómero, cera de abeja, parafina dura y alcohol cetIlico. Las suspensiones pueden tambin contener uno o mÆs preservativos tales como Æcido
actico, metil yb n-propil p-hidroxi-benzoato; uno o mÆs
15 agentes colorantes; uno o mÆs agentes saborizantes; y uno o
mÆs agentes edulcorantes, tal como sacarosa 0 sacarina.
Las composicianes farmacØuticas pueden tambin
estar en la forma de emulsiones aceite en agua. La fase
aceitosa puede set un aceite vegetal, tal como aceite de
20 olivo o aceite de mani, un aceite mineral, tal como parafina lIquida, o una mezcla de estos. Agentes emulsificantes adecuados incluyen gomas que Se originan de forma natural, tal como goma de acacia y goma de tragacanto; fosfatidos que se originan de forma natural,
25 tal como lecitina de soya, Østeres o Østeres parciales

clerivados de Æcidos yrasos, anhidriclos de hexitol, tal como monooleatos de sorbitan; y productos de condensación de estos 6steres parciales con 6xido de etilerio, tal como monooleato de polioxietilen sorbitan. La emulsion tambiOn
5 puede contener agentes edulcorantes y saborizantes. Jarabes
y elixires pueden ser formulados con agentes edulcorantes, tales como glicerol, sorbitol o sacarosa. Tales formulaciones pueden tambiØn contener un agente dernulcente,
un preservativo, un saborizante o un colorante.
10 Adicionairnente, las composiciones farmacuticas
pueden estar en la forma de una preparaciOn inyectable
estØril, tal como una emulsiOn acuosa inyectable estØril o
suspensiOn oleaginosa. Esta emulsiOn o suspensiOn puede ser formulada de conformidad con la tØcnica conocida, usando
15 aquellos agente dispersantes o humectantes y agentes de
dispersiOn, los cuales se mencionan anteriormente. La preparaciOn inyectable estØril tambiŒn puede estar en una soluciOn a suspensiOn inyectable estØril en un diluyente o solvente parenteralmente no tOxico, tal coma una soluciOn
20 en 1,2-propan--diol.
La preparaciOn inyectable estØril tambiØn se
prepara como un polvo liofilizado, Entre los vehiculos y solventes aceptables que se pueden emplear son agua, soluciOn de Ringer y soluciOn de cloruro de sodio
25 isotOnico. Ademªs, los aceites fijados estØriles pueden ser

empleados como un solvente o medio de suspension. Para este
propOsito cualquier aceite fij ado blando puede ser
empleado, incluyendo mono- o diglicØridos sintØticos. AdemØs, Æcidos graos tal como Æcido oleico puede de
5 igualmente ser usado en la preparaciOn de inyectables.
Para obtener una forma de dosis soluble en agua
adecuada de una composiciOn farmacØutica, una sal farmacØuticamente aceptable de un compuesto descrito en este documento, puede ser disuelto en una soluciOn acuosa
10 de un Æcido orgÆnico e inorgânico, tal como soluciOn 0.3M
de Æcido succinico, o mâs preferiblemente Æcido eltrico. Si
una forma de sal soluble no estÆ disponible, el compuesto
se puede disolver en un co-solverite adecuado o combinaciOn
de co-solventes. Ejetnplos de co-solventes adecuados
15 incluyen alcohol, propilen glicol, polietilen glicol 300,
polisorbato 80, glicerina y similares, en una concentraciOn que varla de aproximadamente 0 hasta aproximadamente 60%
del volumen total. En una modalidad, el compuesto activo se disuelve en DMSO y diluido con agua.
20 La composiciOn farmacOutica puede estar en la
forma de una soluciOn de una forma sauna del ingrediente
activo en un vehiculo acuoso apropiado, tal como agua o
sauna isotOnica o soluciOn de dextrosa. TamblØn contemplados son los compuestos, los cuales se ha
25 modificado por sustituciones o adiciones de porciones

quimicas o bioquimicas, las cuales se hacen mÆs adecuadas para suministro (pot ejemplo, solubilidad incremeritada, bioactividad, apetencia, reacciones adversa disminuidas., etc.), pot ejemplo pot esterificaciôn, glicosilación,
5 PEGilación, etc.
En una modalidad preferida, los compuestos
descritos en este documento pueden set formulados para administración oral en una formulaciOn a base de lipido
adecuada para compuestos de baja solubilidad. Las
10 formulaciones a base de ilpidos pueden generalmente mejorar
la biodisponibilidad oral de tales compuestos.
Como tal, una composiciôn farmacØutica preferida

40 comprende una cantidad terapØuticamente a profilÆcticamente

efectiva de un compuesto descrito en este documento, junto
15 con al menos un excipiente farmacuticamente aceptable seleccionado del grupo que consiste de Æcidos grasos de
cadena media o Østeres de propilen glicol del mismo (pot
ejemplo, Østeres de propilen glicol de Æcidos grasos comestibles tales como Æcidos grasos caprulico y cÆprico) y
20 tensoactivos farmacØuticamente aceptables tales como aceite
de ricino hidrogenado polioxil 40.
En una modalidad preferida alternativa, las ciclodextrinas se agregan como intensificadores de solubilidad acuosos. Ciclodextrinas preferidas incluyen
25 hidroxipropilo, hidroxietilo, glucosilo, maltosilo y

derivados de maltosilo de , y ’y-ciclodextrina. Un intensificador de solubilidad de ciclodextrina particularmente preferido es hidroxipropil-o--ciclodextrina (BPBC), el cual puede set’ agregado a cualguiera de las
5 composiciones descritas anteriormente pat-a mejorar adicionalmerite las caracteristicas de solubilidad acuosa de
los compuestos de la modalidad, En una modalidad, la composicion comprende aproximadamente 0.1% hasta aproximadamente 2016 de hidroxipropi1-o-ciclodextrina, mds
10 preferiblemente aproximadamente 1% hasta aproximadamente 15% de hidroxipropil-o--ciclodextrina, y aün mÆs preferiblemente de aproximadamente 2.5% hasta aproximadamente 10% de hidroxipropil-o-ciclodextrina. La cantidad de intensificador de solubilidad empleado,
15 dependerÆ de la cantidad del compuesto de las modalidades en la composiciôn.
Una composición farmacØutica contiene una
cantidad total de los ingredientes activos suficientes pat-a lograr un efecto terapØutico pretendido. MÆs
20 especificamente, en algunas modalidades, la composición farmacŒutica contiene una cantidad terapØuticamente efectiva (pot’ ejemplo, una cantidad de un compuesto que modula SAPK que es efectivo en la prevenciOn o tratarniento
de los sintomas de una enfermedad o condición inflamatoria,
25 en donde el compuesto exhibe un EC50 en el intervalo de

aproximadamente 1 pM hasta aproximadamente 1000 PM, preferiblemente aproximadamente 50 pM hasta aproximadamente
650 pM, para inhibiciôn de al menos una p38 MAPK) Las
cantidades totales del compuesto que pueden ser combinadas
5 con los materiales portadores para producir una forma de
dosificación unitaria variarÆ dependiendo del hospedante tratado y de la forma particular de administraciôn. Preferiblemente, las composiciones son formuladas para que
una dosis entre 001 a 100 mg/kg de peso corporal/dia de un
10 compuesto que modula SAPK es administrado a un paciente que
recibe las composiciones.

EJEMPLO 1

Los compuestos se seleccionan por la capacidad de
15 inhibir la fosforilación de ATF2 por cinasa p38 MAP
vitro. La capacidad de los compuestos para inhibir la fosforilación ATF2 en este ensayo in vitro se correlaciona
con la inhibiciôn de cinasa p39 MAP y expresiÆn Tifa in vivo, y es par lo tanto un indicador de potencia una
20 actividad terapŒutica potencial (Raingeaud, J. et
al. 1995 J. Biol. Chem. 270-7420-7426; Brinkman, M.N. et
al. 1999 J. Biol. Chem. 274:30882-30886; y Fuchus, S.Y. et
al. J. Biol. Chem. 27512560-12564, 2000)
Todas las cinasas y el sustrato ATF2 se adguieren
25 de Upstate (Charlottesville, VA). Las cinasas p38 MAP son

proteInas de longituci completa humanas recombinantes con
una Lusidn GST amino -terminal, expresada en y purificada de
E. coli. La ATF2 es una protelna de fusion OST que contiene
aminoªcidos 19-96 de ATF2 humanas expresadas en E. coli,
5 Todas las protelnas se someten a alicuota y se almacenan a

- 80°C.

Sc realizan los ensayos de cinasa p38 MAP usando
un amortiguador de ensayo que contiene 25 mM de HEPESI pH
7.5, 10 mM MgC12, 2 mM de DTT, 20 mM de 3-g1icerofosfato,
10 0.1 mM de Na3VO4, 40 pM ATP y 1.25 pM de ATF2, junto con 6
ng de proteIna p38a, 12 ng de proteina p383, 1.5 ng de
p38y, o 0.4 ng de JNK2c2. Los compuestos ’son serialmente
cliluidos en DMSO y se usa 2 p1 del cornpuesto de prueba a

varias concentraciones. El vehiculo control recibe
15 ünicamente DM50.

Los compuestos de prueba son pre-incubados con 20
p1 de enzima en amortiguador de cinasa (25 mM HEPES, pH
7.5, 10 mM MgC12, 2 mM DTT, 20 mM -g1icerofosfato y 0.1 mM
Na3VO4) a temperatura ambiente por 15 minutos. La reacciOn
20 se inicia pox’ adiciOn de 30 p1 de soluciOn sustrato para
proporcionar una concentraciOn final de 40 pM ATP y 1.25 pM
ATF2 en amortiguador de cinasa. Las reacciones se incubaron
pox’ 30 minutos a 37°C y se terminaron los la adiciOn de 18
p1 de 200 mM EDTA. Se usa un mOtodo de ELISA para mcdix’ la
25 fosforilaciOn de ATF2 a Thr 69. Se revisten placas de 96

T(v

cavidades muy enlazadas con 50 p1 de reacciÆn de cinasa por
1 hora a 37°C. Las placas revestidas se lavan con 200 p1 de amortiguador de lavado (25 mM Tris HC1, pH 8.3, 192 mM glicina, 0.10-. SDS y 0.05% de Tween20) tres veces. Las
5 placas despuØs se lavan tres veces con SuperBiock in TBS
(Pierce, 37535). Despus del bloqueo, las placas se incuban
con 50 p1 de anticuerpo anti-fosfo-ATF2 de conejo (Cell Signaling, 9221L, 1:500) por 30 minutos a 37°C.
Las placas se lavan tres veces con amortiguador
10 de lavado antes de la incubacidn con 50 p1 de anticuerpo de
anti-conejo de cabra conjugado con HRP (Cell Signaling,
7074, 1:500) por 30 minutos a 37°C. Las placas despus se
lavan tres veces con amortiguador de lavado antes de la incubación con 50 p1 de Ultra TMB-ELISA (Pierce, 34028) por
15 8 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, 50 p1 de
Æcido fosfórico (1 M) se agrega a las reacciones de detencidn y la absorbancia de placas se lee a 450 nm en un lector de placa SpectraMax 250.
Los compuestos inhiben la fosforilaciôn de ATF2
20 en este ensayo in vitro. Los compuestos preferidos exhiben
valores EC-90 de entre aproximadamente 1 pM y aproximadamente 1000 pM, preferiblemente aproximadamente 50
pM hasta aproximadamente 650 pM.

25

EJEMPLO 2

Los compuestos se seleccionan por la capacidad de
inhibir la liberaciOn de AFNA de cØlulas THP-1 estimulada con lipapolisacârido (LPS) in vitro. La capacidad de los
5 compuestos para inhibir la liberación de TNFa en este ensayo in vitro se carrelaciona con la inhibiciÆn de actividad p38 y TNFc, y es par 10 tanta un indicador de actividad terapØutica potencial in viva (Lee J. C. et al. 1993 Ann. N.Y. Acad. Sci. 696:149-170; y 1994 Nature
10 372:739-746)
Las cØlulas THP-1 de ATCC (T1B202) se mantienen a
370C, 5% de CO2 en media RPMI 1640 (MediaTech, Hendon), VA)
que contiene 4.5 gIl de glucosa, suplementado can 10% de suero bovino fetal, 1% de penicilina/estreptomicina y 50 pM
15 de -mercaptoetano1.
Los compuestos de prueba son inicialmente
disueltos en medio RPMI can 1% de DNSO (v/v). Los compuestos son despuØs serialmente diluidos en media PRMI para todas las diluciones subsecuentes. El ensayo se
20 realiza bajo condiciones estŒriles. Se colectan cØlulas
THP-1 a una densidad de cultivo de 6-8 x 105cØlulas/mi y
se resuspenden en el media RPMI a 106 cØlulas/ml. Sc agregan 100 p1 de cØlulas resuspendidas a cada cavidad, la cual contiene 100 p1 del compuesto de prueba. Se prepararan
25 los compuestos de prueba en dos veces la concentraciôn

final. La concentraciôn DSMO final es mªs de 0.5 (v/v) -
Las cØlulas se preincuban con el compuesto por 60 minutos a 37°C, 5% de CO2 antes de la estimulaclØn con lipopolisacÆrido (LPS) (Sigma L-2880, 4 mg/ml de solución
5 base en PBS). La concentraciÆn final LPS en cada cavidad es
10 o 30 jig/ml por TNFa y IL -113 librada, respect ivamente.
Las suspensiones celulLares control no estimuladas reciben
ü nicamente vehiculo PBS. La mezcla celular se incuba por 18
o 48 horas para TNFa e IL-iP liberada, respectivamente. Se
10 toman 150 pl del sobrenadante y se transfieren a. una placa
fresca y se almacenan a -20°C hasta anâlisis adicional. Se
miden los niveles de TNFa e IL -113 usando kits ELISA. Se usa
un luminiscente como el lector de placa. El anÆlisis se realiza por regresiOn no lineal para generar una dosis de
15 respuesta de curva. alor esla
concentraciôn del compuestode prueba que causa una disminucidn del 50% en niveles TNFa 0 IL -1P.
LOS compuestos inhiben la liberaciôn de TNF a,
IL -1 o tanto TNFa como IL -13 en este ensayo in vitro.

25

Z 0-

Tabla 2

1;2.\ /=:::

No.’ E2 ft4 Z 1NF.EC (pM) Ioxiudad3
3 -fl -CH, -fl 0 A imM
5 7 -H -H -H 0 B D
9 -OH -H -H 0

11 -F -fi -H 0 B D
8 -H -CF3 -H 0 B D
12 -F -CF3 -HO D
5 -OH -CH3 -H 0 A 1 mM
1 -ij -CH20H -H 0 B D
10 2 -H -COOH 0 C D
3 -H -gfucurónido -H 0 D
6 -H -CH20C113 -H 0 A 1 mM
4 -H -CR3 -OH 0 A > 1
14 -F -CR3 -H 0 B D
15-OCH3 -CF3 -H 0 C
16 -COCH3 -H -H 0 C D
15 10 -OH -CF3 -II 0 A D
17 -H -tenUo -H 0 C____ D
18 -H -CR3 -H S

- - H

25 VØasenota

26 -H -Br -H 0 A B
27 -OCH3 -Br -H 0 A A
20 28 -OH -CHF
29 -OH -0H02 -H 0 C D
30 -OH-Br - H0AA
31 -OCR3 -.CH2.F -H 0 A A
32 -OCH3 -CHF2 -II 0 A A
33 -H VŁase nota 5 -H
CO2CH3

’Nmero de compuesto coma se muestra en la Tabla 1
2A: 5 2,000; B: > 2,000; C: Inconcluso (par ejemplo, son datos o sin actividad observacla)
: Inconcluso (por ejemplo, sin datas o sin toxicidad
5 observada)
4compuesto 25 es coma se describe en la Tablal, nombrado el grupo arilo unido al nitrógeno 2-piridona es una porciôn N-metilpiridinio
5Compuesto 33 como se describe en la Tabla 1, nombrado un
10 grupo bromoarilo fusionado a las posiciones 5 y 6 de un anillo 2-piridona

EJEMPLO 3

Los compuestos son seleccionados par la capacidad
15 para inhibir el TNFa liberado de cØlulas mononucleares de
sangre perifØrica humana primaria (PBMC), estimuladas con lipopolisacÆridos (LPS) in vitro. La capacidad de los compuestos para inhibir el TNFa liberado en este ensayo in vitro, estâ correlacionada con la inhibiciôn de la
20 actividad p38 y es par lo tanto, un indicador de actividad
terapØntica in viva potencial (2002 Osteoarthritis & Cartilage 10:961-967; and Laufer, S.A. and Wagner, G.K. 2002 J Med. Chem. 45: 2733-2740)
Las cØlulas mononucleares de sangre perifØrica
25 humana (PBMC), son aisladas por centrifugación diferencial

?2
a travØs de un gradiente de densidad Ficoll-HyPaque de suero combinado de 3-8 donadores de sangre individuales.
Las PBMC aisladas contienen aproximadamente 10% de monocitos positivos CD -14, 90% de linfocitos y <1% de
5 granulocitos y plaquetas. Las PBMC (106/ml), son cultivadas
en placas de poliestireno y estimuladas con lipopolisacÆrido (LPS; 50 ng/ml; Sigma, St. Louis, MO), en
la presencia y ausencia del compuesto de prueba en diluciones seriales por duplicado, por 24 horas a 370C en
10 medio RPM1 GIBCOTM (Invitrogen, Carlsbad, CA), sin suero.
El nivel de TNFa en los sobrenadantes celulares es determinado ELISA usando un kit comercialmente disponible (MDS Panlabs #309700)
Los compuestos preferidos inhibe la liberación de
15 TNFcx en este ensayo con un valor EC50 de entre aproximadamente 1 PM y aproximadamente 1000 p.M, preferiblemente aproximadamente 50 PM, hasta aproximadamente 650 pM.

20 EJEMPLO 4

Los compuestos son seleccionados por la capacidad
para inhibir la liberación de TNFcx en un modelo animal in vivo (VØase por ejemplo, Griswold D. E. et al. 1993 Drugs Exp. din. Res. 19:243-248; Badger, A.M. et al. 1996 J.
25 Pharmaccl. Exp. Ther. 279:1453-1461; Dong, C. et al. 2002

Annu. Rev. Immunol. 20:55-72 (y referencias citadas aquI); Ono, K. and Han, J. 2000 Cellular Signalling 12:1-13 (y referencias citadas aqul); y Griffiths, J.B. et al. 1999 Curr. Rheumatol. Rep. 1:139-148)
5 Sin querer ser ligado por cualquier teorla particular, se cree que la inhibición de TNFo en este modelo, es debido a la inh–bición de la cinasa p138 MAP par
el compuesto.
Ratas Sprague-Dawley (0.2-0.35 kg), son
10 aleatoriamente divididas en grupos de seis a mÆs y son
dosificadas intravenosamente por infusiÆn a inyecciÆn de bob, a son dosificadas oralmente con los compuestos de prueba en una formulación adecuada en cada caso. Treinta minutos despuØs de terminar la infusion o inyecciOn del
15 bolo y 1-2 horas despuØs de la administraciOn oral, el
lipopolisacârido de E. coli/0127:B8 (0.8 mg/kg), es administrado IV. Las muestras de sangre son colectadas 1.5 horas posteriores al tratamiento con LPS. Los niveles de TNFc en el suero son determinados usando el kit ELISA de
20 Biosource (KRC3011C) y comparados con aquellos del control
tratado con vehiculo.

Los compuestos preferidos inhiben la liberaciOn
de TNFc en este ensayo in viva. Los compuestos preferidos exhiben un valor EDC50 de menos de 500 mg/kg,
25 preferiblemente, menos de 400 mg/kg, preferiblemente, menos

de 200 mg/kg, preferiblemente, menos de 100 mg/kg, mâs preferiblemente, menos de 50 mg/kg, mÆs preferiblemente, menos de 40 mg/kg, mÆs preferiblemente, menos de 30 mg/kg, mÆs preferiblemente, menos de 20 mg/kg, mÆs
5 preferiblemente, menos de 10 mg/kg.
Los mØtodos para determinar el EC50 de la
inhibición de p38 por un compuesto, incluyen cualquiera de
los mØtoclos conocidos en la tØcnica, que permiten la detecciÆn cuantitativa de cualguiera de los sustratos
10 corriente debajo de p38 MAPK como se describe anteriormente. Por lo tanto, estos mØtodos adicionalmente

15

incluyen pero no se limitan a, detecciOn de expresión de genes conocidos por ser regulados por p38 ya sea individualmente, o por arreglos de genes.

EJEMPLO 5

Se pueden usar los siguientes mØtodos para (1) un
ensayo cinasa para determinaciOn de EC50, (2) un ensayo cinasa no radiomØtrico para determinación de EC50, (3)
20 modulac–ón de inducciÆn de la expresión de TNFa, (4) una
prueba por toxicidad celular, y (5) un ensayo para probar
el efecto de compuestos en la producción de colÆgeno.

Ensayo Cinasa
25 La actividad de las isoformas de cinasa P38 P38y

’2
y P38o, es deteminada par fosforilacion de ATF-2 en la presencia de 12p -y-ATP. Se determina la incorporaciÆn de 32P
en ATF-2 en la presencia a ausencia de inhibidores. La
pirfenidona y sus derivados diferentes son prabadas por
5 inhibición de actividad de cinasa P38’y y P38c en este
ensayo bioguimico. Los compuestos son solubilizados en agua
a DM50 y probados a concentraciones diferentes de 0 a 10 mM usando el solvente apropiado para diluciones y como vehiculo de control. Las enzimas P38y y P38c se obtienen
10 coma protelna recombinante purificada y activada (Upstate,
Charlottesville, VA). La enzima activada es usada a 24.8 nM
en la reacciôn final. Las enzimas son diluidas antes de la reacción en el siguiente amortiguador (1M HEPES, pH 7.4,
500 mM DTT, 1 de Triton X-100 y 10 mg/ml de BSA) - La
15 reacciôn se realiza en la siguiente soluciÆn que es preparada como una solución base de dos partes (1H HEPES,
pH 7.4, 500 mM DTT y 1% de Triton X-100) y el ATP no radioactivo estÆ presente en la reacción a 6.25 iM ATP (Cell Signaling, Beverly, MA). Para determinar la
20 fosforilaciÆn de ATF-2, se agrega y-[32P] -ATP 300Ci/mmol a
cada reacciÆn a una concentración de 7.5 tiM. La ATF-2 (Cell Signaling, Beverly, MA), como un sustrato cinasa, se usa a
3 VIM. Coma una primera etapa en el montaje de la reacciôn enzimÆtica, la cinasa activada y el inhibidor a el vehiculo
25 de control apropiado, son agregados al amortiguador de

23

reacción e incubados pot 30 minutos a temperatura ambiente.
La reacción de cinasa es iniciada por la adiciÆn de ATF-2 y mezcla de ATP. El volumen final para cada reacción es 20 p1
y se realiza a temperatura ambiente pot 30 minutes. DespuØs
5 de 30 minutos de incubación, se agregan 80 p1 de amortiguador Laemmlie. Subsecuentemente, 20% de la reacción
se separan pot SDS-Page (BioRad, Hercules, CA), bajo condiciones de reducción DespuØs de la electrofôresis, el
gel es expuesto a una placa formadora de fosfoimagen y
10 analizada usando un formador de fosfoimagen (Storm System,
Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). La seæal obtenida es
cuantificada despuØs de la correcciôn del antecedente y calculada como porcentaje de inhibición usando la actividad
de cinasa no inhibida con el vehIculo de control como 0% de
15 inhibiciOn. La actividad de cinasa, en la presencia de diferentes concentraciones de inhibidor, es trazada usando Kaleidagraph (Synergy Software, Reading, PA), para determinar
el EC50 para cada compuesto y cinasa p138 probados.

20 Ensavo de cinasa no radiomdtrico
tJn ensayo de cinasa no radiomtrico, alterno,
tambiØn se empleô para definir el EC50 pot inhibiciôn de
P38. En este ensayo, la cinasa p38 transfiere un fosfato de
ATP a un sus trato de pdptido EGF-R, resultando en la
25 formación de pØptido EGFR-fosforilado con la conversion

concomitante de ATP a ADP. En una reacción no acoplada, la p38 tarnbiØri hidroliza a ATP a una relación mªs lenta en la ausencia de sustrato peptIdico (Fox et al., FEBS Lett 1999), lo cual contribuye ligeramente a un consumo de ATP.
5 De este modo, la cantidad de ATP consumida es directamente
proporcional a la actividad de p138. Al final de una reaeción de cinasa, la cantidad de ATP que permanece, es determinada usando el Ensayo de Cirtasa Luminiscente Kinase-
Gb Plus (Prornega, Inc., Madison, WI). Estos reactivos usan
10 ATP residual para soportar la conversiOn enz–mAtica dependIente de ATP de luciferina de escarabajo a oxoluciferina con la producclOn concomitante de luz, la cual es detectada pot un luminOmetro.
Las reacciones de cinasa son conducidas mezclando
15 el compuesto (diluido en DM50 y amortiguador de ensayo),
con ya sea, p38c o p387, y sustrato peptIdico EGF-R (AnaSpec, Inc., San Jose, CA) en amortiguador de ensayo.
Las reacciones son entonces iniciadas por la adiciOn de ATP
y dejadas correr par 45 minutos a temperatura atnbiente. Las
20 condiciones do amortiguadores finales son: 20 mM de HEPES
(pH 7.4), 2 mM de DTT, 0.1% de Triton-X-100, 10 mM de MgC12, 10% de glicerol, 12.5 mM de p38c o p38y (Upstate, Charlottesville, VA), 50 pM de sustrato peptidico EGF-R, y
10 iM de ATP. El volumen de ensayo final es 10 p1. Se
25 realiza una reacciOn de control en la ausencia del

2

compuesto. Las reacciones de control adicional que omiten p38, son realizadas a cada concentraciOn de compuesto. Toclas las reacciones se realIzan por triplicado.
Cuarenta y cinco minutos despuØs de la iniciaciÆn
5 de la reacciOn de cinasa, la reacciôn es apagada por la
adici6n de 10 p1 de reactivo de ensayo Kinase-Glo Plus. La reacciôn de luciferasa se deja equilibrar par 15 minutas antes de ser leida en un Lector de Placa Envision Multilabel (Perkin Elmer Life and Analytical Sciences,
10 Boston, MA). Los datos son trazados coma sefial luminiscentes contra concentración de compuesto log en KaleidaGraph (Symergy Sotfware, Reading, PA). Los valores
EC son determinados ajustando los datos a la ecuaciÆn de enlace de 4-parÆmetros, usando un enlace superior ajustado
15 que es determinado a partir de las reacciones de control en
la ausencia de p38 (conforme la luminiscencia es inversamente relacionada con la actividad de cinasa)

Inhibición de inducción de TNFc

20 Se hace crecer THP-1 (ATCC, Rockville, MD) bajo condiciones regulares de cultivo de tejido coma se recomienda por el ATCC. 18 horas antes del experimento, las cØlulas son plaqueadas en un formato de 96 cavidades en medio de cultivo regular que contiene 11 de suero y 0.25 ml
25 de volumen de cultivo a una densidad de 500,000 cØlulas por

cavidad. El compuesto es agregado a cada cavidad por triplicado y el control de solvente apropiado estÆ incluid
en cada ensayo. El inhibidor p38 SB203850 a 1 11M/ml (Upstate, Waltham, MA), es incluido como un control
5 positivo en cada ensayo. Para la inducción de la expresión
de TNFa, se agregan 1 pg/mi de LPS a cada cavidad, 30 minutos posteriores a la adieión del compuesto. Despus de
una incubación de 4 horas bajo condiciones de cultivo de tejido, las clulas son sedimentadas por centrifugación (10
10 mm, 1000 rpm, centrifuga superior de mesa Beckman) y una
fracciÆn del sobrenadante libre de cØlula se colecta y emplea en una diiución de diez partes para la cuantificación en el ELISA especIfico de TNFa (R&D Systems, Minneapolis, MN). El ELISA del TNFa se realiza de
15 conformidad con las direcciones proporcionadas por el fabricante. El TNFa es detectado en pg/mi y trazado como actividad fraccional normalizada a la expresión de TNFc en
el solvente de control.

20 Pruebasde toxicidadde compuesto en un ensayo a base de cØlula
La liberación de LDH como un resultado de una
membrana celular rota, se aplica como una medida de toxicidad celular. La LDH es detectada por su actividad enzimÆtica usando un kit de diagnostico comercialmente
25 disponible (Roche Diagnostic, Cat# 1 644 793). Las cØlulas

THP-1 son usadas para determinaciÆn de toxicjdad celular pas consistencia con la expresión inducida de TNFc en ci experimento previo. Como se describe previamente para pruebas de inhibiciôn de inducciôn de TNFcx, las cØlulas son
5 cultivadas en un formato de 96 cavidades bajo 1% de suero y
condiciones de cultivo de tejido regular. Los compuestos
son agregados a diferentes concentraciones par triplicado.
El control de solvente apropiado se usa en cada ensayo. DespuØs de la adición del compuesto, las cØlulas son
10 cultivadas 18 horas bajo condiciones regulares de tejido de
cultivo. DespuØs de este periodo de incubación, ci control positivo es iniciado agregando Triton-X-100 (20-. v/v) a cØlulas no tratadas e incubadas par 10 minutos adicionales para lisis celular completa. Subsecuentemente, las cØlulas
15 son sedimentadas por centrifugación y una fracciôn del
sobrenadante se remueve y analiza par actividad de enzima LDH, de conformidad con las instrucciones del fabricante.
Los datos son tIpicamente reportados como % de toxicidad celular normalizado a las cØlulas lisadas con Triton-X-100
20 como 100% de toxicidad celular.
TambiØn se obtienen los datos de toxicidad usando
un ensayo ATP comercialmente disponible (Molecular Probes’
ATP Kit de Determinación A22066, disponible de Invitrogen)
y/o usando un ensayo MTT. Tanto ci ensayo ATP como MTT,
25 mide la cotupetencia metabØlica de la cØlula. El ensayo MTT

mide la capacidad de las cØlulas para reducir un sustrato inarcador, el cual estâ relacionado con la competencia
metabÆlica (es decir, biodisponibilida). El ensayo ATP micle
la concentraciôn celular de ATP en la presencia y ausencia
5 del compuesto. Los compuestos tôxicos conducen a actividad
metabólica reducida lo cual conduce a una reducciôn en concentración de ATP.

Ensayo para efecto de compuestos en la producción de
10 coldqeno
Se hicieron crecer cØlulas HFL-1 (ATCC,
Rockville, MD), bajo condiciones regulares de cultivo de tejido en medio completo que contiene suero de bovino fetal
al 10% (FES; Mediatech, Inc., Herndon, VA). Las cØlulas en
15 paso tempranos, se plaquearon en placas de 6 cavidades.
Cuando las cØlulas alcanzaron la confluencia, el medio se removió, las c1u1as se lavaron con PBS, y las cØlulas se mantuvieron durante la noche en medio completo que
contiene FBS al 01%. El medio entonces se reernplazó con
20 medio fresco mÆs FCS al 0.1%, 10 iiM de L-Prolina (EMD
Chemicals, Gibbstown, NJ), 20 pg/ml de Æcido ascórbico (EMD
Chemicals Gibbstown, NJ) Se agregaron compuestos para
triplicar las cavidades a una concentraciôn final de 1 mN
de soluciones base bOX en DMSO. Una hora despuØs de la
25 adición del compuesto, las cØlulas fueron tratadas con TGF-

1 (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO), a una concentración final de 10 ng/ml (25 ng en total). Tres dIas despuØs de la adicidn de TGF-, ci medio se removió, las cØlulas se lavaron con PBS y despuØs se someticron a lisis. El
5 contenido de colâgeno total de cØlulas lisadas se sometió a
ensayo con un ensayo de colÆgeno a base de tinte (Sircol Collagen Assay, Newtownabbey, Northern Ireland) y un espectrofotÆrnetro a base de placa iQuant (BioTek Insturments, Inc., Winooski, VT), con curvas estÆndares
10 apropiadas. El intervalo dinÆmico del ensayo, es definido
por cØlulas.que fueron tratadas falsamente (DMSO al 1% sin cornpuesto), en la presencia y ausencia de TGF-13. Los datos
son reportados en la Tabla 3, como el porcentaje de inhibiciôn de colÆgeno inducido por TGF-3, como se
15 determina en la siguiente ecuación:

% de inhibición = 100*[(colâgeno, falso/-i- TGF-3)-(colÆgeno, tratado/TGF-3)]/ [(colâgeno, falso/+TCF--f3) - (colÆgeno, falso/-TGF-3)I
20

25

Tabla 3

Compueato No. % de Inhibición de Sintesis
De colÆgeno estimulada por
TGF-f3
5 8 48
14 23
15 49
26 58
30 69
10
EJEMPLO 6

Preparación de 1 (4-hidroxifenhl) -5--
(trifluorometil) -2--piridona (Compuesto 10): Una mezcla de
5-(trifluorometil)-2(1H)-piridofla (815.5 mg, 5 mmol), 4-
15 yodoanisol (2.34 g, 10 mmol), Cul (952 mg, 5 mmol), K2CO3
(691 mg, 5 mmol) y DMF (5 ml), se calentó a 135°C durante
la noche. La mezcla de reacción se diluyó con 10% de amoniaco (15 ml) y se extrajo con acetato de etilo. El extracto orgÆnico se lavô con cloruro de sodio saturado, se
20 secÆ sobre sulfa.to de magnesio y evaporó. La purificación
por cromatografla en columna (305. de acetato de etilo-hexanos), proporcionó 526 mg (38.2%) de 1-(4-metoxifenil)- 5-(trifluorometil)-2-piridorla. Este compuesto (268.2 mg, 1 mmol), se trató con soluciân de BBr3 1M en diclorometano
25 (DCM, 2 ml) en DCM (5 ml) par 2 horas a 0°C. La mezcla de

reacciOn se diluyô con DCM y se lavó tres veces con aqua.
La fase orgÆnica se secô sobre sulfato de sodio y evaporô.
El residue se separÆ per cromatografia en columna (20% de acetate de etilo-DCM) para proporcionar el compuesto del
5 tItulo como un sÆlido blancuzco, 226 mg (89%). El espectro
de ’H RMN fue corisistente con la estructura del Compuesto

10.

EJEMPLO 7

10 Preparación de 1-fenil5-acetil-2-piridofla (Compuesto 16): 2-metoxi--5-acetilpiridifla (1.51 g, 10 mmol), se tratO con HC1 6N a 100C por S horas. La mezcla
de reacciôn se neutralizó con hidr6xido de sodio a pH 7 y
despuØs, se extrajo varias veces con DCM. La capa orgÆnica
15 se secó sobre sulfate de sodio, evapor6, y el residuo se
cristalizó de acetato de etilo para dar 5-acetil-2(1H)-- pirldona come un sólido blancuzco, 1.06 g (78%). Este compuesto (685.7 mg, 5 mmol), se hizo reaccionar con
yodobenceno (0.84 ml, 7.5 mmol) en la presencia de Cul (95
20 mg, 0.5 mmol) y K2CO3 (691 mg, 5 mmol) en DMF (5 ml) a
135°C durante la noche. La mezcla de reacción se diluyô con
105. de amonIaco (15 ml) y se extrajo con acetato de etilo.
El extracto orgânico se lava con cloruro de sodio saturado,
se secó sobre sulfato de magnesio y evaporó. La
25 purificación per cromatografla en columna (10% de acetate

- i.

de etilo-DCM), proporcionÆ 407 mg (38%) del compuesto objetivo como un sólido blanco. El espectro de ’H RMN fue consistente con la estructura del Compuesto 16-

5 EJEMPLO 8
Preparaciôn de 1- (4-piridinil) -5--metil--2-piridona
(Compuesto 22). El compuesto 22 se sintetizØ por condensaciÆn de 5-metil-2(1H)-piridofla (327.4 mg, 3 mmol)
con clorhidrato de 4-bromopiridifla (778 mg, 4 mmol) en la
10 presencia de Cul (60 mg, 0.3 mmol) y K2CO3 (1.36 mg, 10
mmol) en DMF (3 ml) a 135°C durante la noche. La mezcla de
reacción se diluyó con 10% de amoniaco (15 ml) y se extrajo

40 con acetato de etilo. El extracto orgÆrxico se la-v6 con

cloruro de sodio saturado, se secO sobre su1iato dc
15 magnesio y evaporó. La purificación por cromatografla en
columna (5% de MeOH-DCM), proporcionO 197 mg (35%) del
compuesto objetivo como un sôlido amarillento. El espectro
de ’H RMN fue consistente con la estructura del Compuesto

22.
20
EJEMPLO 9

Preparación de 1-fenil-5-metil-2-piridifltiofla
(Compuesto 18): Se hizo reaccionar 1-fenil-5-metil-2-piridinona (555.7 mg, 3 mmol), con reactivo Lawesson (606.7
25 mg, 1.5 mmol) en tolueno (5 ml) a 90°C. La mezcla de

.))

reacciôn se evaporó y el compuesto objetivo se aisló por cromatografia en columna (20-30% de acetato de etilo-hexano), seguido por cristalizaciôn de metil-terc-butilØter. Rendimiento 403 mg (67%) de sôlido amarillo. El
5 espectro de 1H RMN tue consistente con la estructura del
Compuesto 18.

EJEMPLO 10

Sc preparó ci Compuesto 33 de contormidad con el
10 siguiente esquema de reaccidn sintŒtico:

Br NH2

OEt 0 B OH- OEt 0 r OEt Ft H2SO4
EtO’"OEt NO

EtO’LOH DCC,
H

HO sr 2 11Bf

Br

15 Cu(OAc)2, 02, Ri

3

Compuesto 33

Una mezcla de 3,3-dietoxipropionato de etilo comercialmente disponible (9.7 ml, 50 mmol), hidróxido de
20 sodio (10M, 6 ml, 60 mmol) y agua (15 ml), se sometió a
ref lujo hasta hacerla homogŒriea (aproximadatnente 30
minutos) - DespuØs del enfriamiento a 0°C, Sc agregó Æcido
clorhidrico 6N para lievar el p11 de la solucidn a 2-3 (-10
ml) - La mezcla se extrajo con diclorometano, la fase
25 orgânica se lavô con aqua, se secó sabre sulfato de sodio,

y ci soivente se removió bajo vacIo para dar el ªcido 1, ci cual se usó sin alguna purificaciôn adicional.
A una soiuciôn del Æcido crudo 1 (aproximadamente
50 mmol) en DCM (100 ml) a 0C, se agregô secuencialmente
5 4-bromoanilina (10.3 g, 60 mmol), HOBT (675 mg, 5 mmol) y
finalmente DCC (12.4 g, 60 mmol) - La mezcla de reacción se
agitó a 0°C pot 1 hera, y despus se sometió a reflujo pot
otras 4 horas El sOlido se filtró, lo filtrado se lavó con
bicarbonato de sodio saturado, se secó sobre sulfato de
10 sodio y el solvente se removió bajo vacIo para dat la amida
2 come un sÆlido ligerarnente amarillo. Este sólido se
disolviô en Æcido sulfürico (96%, 50 ml) a 0°C. La solución
. se mantuvo a la misma temperatura par otras 3 horas y
despuØs se vertió en agua helada (500 ml) - El sólido se
15 filtró, lavó con agua, y se agitO con acetonitrilo caliente
(100 ml) - La quinolinona 3 se filtró y se secó bajo vacIo.
El rendimiento fue 10 g (910-.)
La mezcla del compuesto 3 (309 mg, 1.38 mmol),
Æcido fenilboróriico (336 mg, 2.76 mmol), Cu(OAC)2 (36 mg,
20 0.2 mmol), tamices moleculares 4a (0.3 g), piridina (0.24
ml) y DCM (10 ml), se agitaron a temperatura ambiente pot 2
dias. La mezcla de reacción se filtró a travØs de Celite,
se lavó con bicarbonato de sadie saturado con EDTA y la fase orgÆnica se secÆ sobre sulfate de sodio. El compuesto
25 33 se aisló pot cromatografia (50% de acetate de etilo-

hexano-acetato de etilo) El rendimiento fue 359 mg (85%).

EJEMPLO 11

Las propiedades de farmacocinØtica (PK) de
5 pirfenidona, anÆlogos de pirfenidona y derivados, son valoradas en ratas Sprague-Dawley canuladas duales. (yugular derecha/carÆtida izquierda) (Charles River Laboratories, Inc, Wilmington, MA). Las ratas macho que pesan aproximadamente 275-300 g, fueron administradas con una
10 dosis intravenosa (5 mg/kg) u oral (50 mg/kg via alimentación forzada), de compuesto en una formulaciôn apropiada. Las muestras de plasma fueron colectadas via cÆnulas intra-arteriales a tiempos deseados en las 24 horas despuØs de la dosificaciÆn, usanclo EDTA como un
15 anticoagulante. Se usaron tres animales para cada compuesto. Todos los experimentos se condujeron por personal entreriado, de conformidad con las lineas gulas del ComitØ de Usos y Cuidados de Animales Institucionales apropiados (TACUC).
20 Las concentraciones del compuesto se valoraron por CL -EM, usando espectrómetro de masas MDS SCIEX API 3000 (Applied Bioystems, Foster City, CA), acoplado a un Shimadzu VP CLAR (Shimadzu Corpo., Kyoto Japón), ajustado
con un cartucho C18 guard Duragel C (Peeke Scientific,
25 Redwood City, CA). Las muestras de calibración fueron

preparadas mezclando cantidades conocidas de pirfenidona, o un anÆlogo o derivado de pirfenidona, con plasma de rata.
Se creó una curva estÆndar per diluciOn serial de la muestra de calibración en la misma matriz. Ambas muestras
5 estÆndar y analitica, fueron preparadas per inyección con
la CLAR, mezclando una alicuota de muestra de plasma con 3 volümenes de acetonitrilo enfriado en hielo que contiene estÆndar interno. Las muestras entonces fueron centrifugadas. Una alicuota del sobrenadante resultante
10 entonces se mezcló con cinco volümenes de Æcido fÆrmico al
0.2% en aqua, inyectada a la CLAR, y resuelta en un gradiente de metanol (que coxitiene 0.18-0.2% de Æcido fÆrmico) - La seflal de analito integrada, se corrigió para aquellas del estÆndar interno y se comparó con la curva
15 estÆndar apropiada para definir la concentración del

analito.

Los parAmetros de farmacocinØtica mostrados en la
Tabla 4, fueron derivados usando el paquete WinNonlin
Software (Pharsight Corp. Mountain View, CA).

20

25

Tabla 4

Ruta Dosis Compuesto T112 MRTinf Clobs AtCiast E
do mg/kg hr. hr nil/hr/hg ng-hr/ml
Admin, X10

IV 5 8 13.9 20.3 0.117 30.2
19 2.96 6.26 0.142 35
26 1.62 2.4 0.691 10.3
Oral 50 8 122.4 40.5
19 191.7 54.8
26 65.8 63.9

Mientras la presente invención ha sido descrita

en algün detalle para propósitos de claridad y

10 entendimiento, un experto en la tØcnica apreciarÆ que se

pueden hacer varios cambios en la forma y detalle, sin

apartarse del alcance verdadero de la invención. Todas las

figuras, tablas, apØndices, patentes, solicitudes de

patentes y publicaciones, referidas anteriormente, estn

15 por este medio, incorporadas por referenda en su

totalidad.

El:

2

NOVEDAD DE LA INVENCION

HabiØndose descrito la presene se considera coma
novedad, y por lo tanto, se reclama como propiedad lo
5 cont.enido en las siguientes:

REIVINDICACIONES

(i) Un mØtodo para modular un sistema de
10 proteIna cinasa activado por estrØs (SAPK), caracterizado
porque comprende, poner en contacto tin compuesto con una protelna cinasa activada par mitØgeno p38 (MAPK),
en donde ci compuesto exhibe un EC50 en el
intervalo de aproximadamente 1 pM hasta aproximadamente
15 1000 tiM, par inhibición de al menos, tin p38 MAPK; y
en donde el contacto se conduce a una
concentración que modula a SAPK que es menor que tin EC50
por inhibiciôn de al menos, una p38 MAPK par el compuesto.
El mØtodo de conformidad con la
20 reivindicaciOn 1, caracterizado porque la p38 MAPK se
selecciona del grupo que consiste de p38o, p383, p387 y
p3S.
El mØtodo de conformidad con la
reivindicaciÆn 1, caracterizado porque ci contacto se
25 conduce a una concentración que modula a SAPK, que es menor

que un EC20, par inh–bición de p38 MAPK par el compuesto.
El mØtodo de conformidad con la
reivindicacidn 1, caracterizado porque el contacto se conduce a una concentración que modula el SAPK que es menor
5 que un EC10, por inhibición de p38 MAPK par el compuesto.
El mØtodo de conformidad con la
reivindicación 1, caracterizado porque los valores EC50 y
los valores EC30, son obtenidos a partir de una curva de respuesta de dosis.

10 () El mØtodo de conformidad con la reivindicaciôn 1, caracterizado porque la concentraciôn de modulación de SAPK, es efectiva para alterar el TNFc liberado en sangre completa por al menos, 15%
El mØtodo de conformidad con la
15 reivindicación 1, caracterizado porque el EC50 estâ en el
intervalo de aproximadamente 50 iM hasta aproximadamente
650 pM.
El mØtodo de conformidad con la
reivindicación 1, caracterizado porque el compuesto
20 comprende un anillo piridona.
El mØtodo de conformidad con la reivindicacidn 1, caracterizado porque el compuesto es del Genera Ia:

25

5
en donde

X4 X5 R, R2

X3*N; /

R3
X2 X10 R
GØnero Ia;

R2, R3 y R4 son seleccionados
independientemente del grupo que consiste de H, aiquilo
C1 -C10, aiquilo CI -CIO sustituido, aiquenilo C1 -C10,
10 haloalquilo C -C10, nitroalquilo C1 -C10, tioalquilo C1 -C10,
hidroxialquilo C1 -C10, alcoxi C1 -C10, tenilo, fenilo
sustituido, halógeno, hidroxilo, alcoxialquilo C1 -C10,
carboxi C1 -C10, alcoxicarbonilo C1 -C10, CO-urônido, CO-
monosacÆrido, COoligosacÆrido y CO-polisacÆrido; y
15 X1, X2, X3, X4 y X5 son seleccionados
independientemente del grupo que consiste de H, halógeno, alcoxi e hidroxi.
ci02 El mØtodo de conformidad con la reivindicaciôn 9, caracterizado porque el compuesto es Un
20 metabolito, hidrato, solvato, o profÆrmaco de un compuesto
del GØnero Ia.
’.1. El mØtodo de conformidad con la reivindicaclØn 1, caracterizado porque el compuesto es del Genera Ib:
25

R2 se selecciona del grupo que consiste de H,
CF3, CHF2, CH2F, CH20H, COON, CO-Glucurónido, Br, CH, y

CH2OCH3; y

R4 se selecciona del grupo que consiste de H, y
5 OH;
con la condición de que cuando R4 y X3 son H, R2

no es CH3

13) El mtodo de conformidad con la reivindicaciÆn 1, caracterizado porque el compuesto es del
10 Subgnero II:

X3Ø

SubgØnero II;
15 en donde
X3 se selecciona del grupo que consiste de H, OH
y OCH3;

R2 se selecciona del grupo que consiste de H,
CH20H, COON, CO-Glucorónido, Br, CH3, y CH20CH3; y
20 R4 se selecciona del grupo que consiste de H y ON, con la cond–ción de que cuando X3 es OH, entonces R2 no

es CH3.

El mØtodo de conformidad con la
reivindicaciÆn 1, caracterizado porque el compuesto es del
25 SubgØnero III:

5

OH; y

X3N

SubgØnero III;

en donde
X3 se selecciona del grupo que consiste de H, F y

R2 se selecciona del grupo que consiste de H, Br,
10 CH2F, CHF2, y CF3.
15. El mØtodo de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el compuesto es del SubgØnero IV:

X3aN;/)
15

SubgØnero IV;

en donde X3 se selecciona del grupo que consiste
de H, halógeno, alcoxi C1 -C10, OH, aiquilo C1 -C10, aiquilo
20 C1 -C10 sustituido, aiquenilo C -C10, haloalquilo C1 -Co,
nitroalquilo C1 -C10, tioalquilo C1 -C10, hidroxialquilo C1 -C10,
fenilo, fenilo sustituido, alcoxialquilo C1 -0O3 carboxi C1 -
C10, alcoxicarbonilo C1 -C10, CO-urOnido, CO-monosacÆrido, co-oligosacârido y CO-polisacÆrido.
25 16. El mØtodo de conformidad con la

X3 es H, F, Cl, OH, Cl-I3 u OCH3;
R2 es metilo, C(=O)H, C(0)CH3, C(0)OCH3, C(-O)O--
glucosilo, fluorometilo, difluorometilo, trifluorometilo, bromo, metilmetoxilo, metilhidroxilo, o fenilo; y
5 R4 es H o hidroxilo;
con la condiciOn de que cuando R2 es
trifluorometilo, Z es 0, R4 es H y Ar es fenilo, el fenilo
no es solamente sustituido en la posición 4’ por H, F u OH.
El mØtodo de conformidad con la
10 reivindicación 1, caracterizado porque el compuesto es del
GØnero VII:
Yl

. Y2 R4

Y3NO

15
Xq
GØnero VII

en donde
20 X3 es H, halógeno, alcoxi C1 -C10, y OH;
y Y, son seleccionados
independientemente del grupo que consiste de H, aiquilo
C1 -C101 alguilo Ci-Cio sustituido, aiquenilo C -C10,
haloalquilo C -C13, nitroalquilo CiC:io, tioalquilo C1 -C10,
25 hidroxialquilo C1 -C10, alcoxi C1 -C10, fenilo, fenilo

7??

sustiuido, halôgeno, hidroxilo, alcoxialquilo C1.
carboxi C1 -C10, alcoxicarbonilo C1 -C; y
R4 es H, halogeno u OH.
El mØtodo de conformidad con la
5 reiviridicaciÆn 18, caracterizado porque el compuesto Cs

BrTj

10 (20 Un mØtodo para tratar a prevenir un estado
de enfermedad en un sujeto, caracterizado porque comprende: identificar un sujeto en riesgo de a que tiene
una condición seleccionada de una coudiciôn inflamatoria y una condición fibrótica;
15 administrar un compuesto con un sujeto en una
cantidad efectiva para tratar o prevenir la condiciôn;
en donde el compuesto exhibe un EC50 en el
intervalo de aproximadamente 1 pM hasta aproximadamente
1000 pM pot inhibición de al menos, una pp38 MAPK; y
20 en donde la cantidaci efectiva produce una
concentraciôn de sangre a suero u otto fluido corporal que
es menos que un EC30 pot inhibiciôn de al menos, un p38

MAPK.
21 El mØtodo de conformidad con la
25 reivindicaciôn 20, caracterizado porque la coridiciôn se

selecciona del grupo que consiste de fibrosis, enfermedad pulmonar obstructiva crônica, fibrosis pulmonar inflamatoria, fibrosis pulmonar idiopÆtica, sindrome obliterante de bx’onquiolitis, fibrosis de aloinjerto
5 crônico; artritis reumatoide; espondilitis reumatoide; osteoartritis; gota; sepsis, choque sØptico; choque endotóxico; spsis gramnegativa; sindrome de choque tôxico; sindrome de dolor miofacial (MPS); Shigelosis; asma; sindrome de angustia respiratoria en adulto;
10 enfermedad del intestino inflamatorio; enfermedad de Crohn;
psoriasis; eczema; colitis ulcerativa; nefritis glomerular;
escleroderrna; tiroiditi crónica; enfermedad de Grave;
enfermedad de Ormond; gastritis autoinmune; miastenia gravis; anemia hemolitica autoinmune, neutropenia
15 autoinmune; trombocitopenia; fibrosis pancreÆtica;
hepatitis activa crónica; fibrosis hepÆtica; enfermedad renal; fibrosis renal; sindrome del intestino irritable; piresis; restenosis; malaria cerebral; lesiOn isqumica y apoplejia; trauma neural; enfermedad de Alzheimer;
20 enfermedad de Huntington; enfermedad de Parkinson; dolor
agudo y crOnico; alergias; hipertrofia cardiaca; insuficiencia cardiaca crOnica; sindrome coronario agudo; caquexia; malaria; lepra; leishmaniasis; enfermedad de Lyme; sindrome de Reiter; sinoviitis aguda; degeneraciOn
25 muscular, bursitis; teridonitis; tenosinoviitis; sindrome de

disco invertebrado prolapsados, herniados o rotos; osteopetrosis; trombosis; silicosis; sarcosis pulmonar; enferrnedad de resorpción Æsea; cancer; escierosis multiple, lupus; fibromialgia; SIDA; Herpes zoster, herpes simple,
5 virus de la influenza, Sindrome Respiratorio Agudo Severo
(SARS); citomegalovirus; y diabetes mellitus.
22; El metodo de conformidad con la reivindicaciOn 20, caracterizado porque la cantidad efectiva es menos de aproximadamente 50% de una cantidad
10 que causa un efecto colateral indeseable en el sujeto.
23 El mØtodo de conformidad con la reivindicación 20, caracterizado porque el compuesto inhthe
una cinasa en la trayectoria de seæalización SAPK.
4 El mØtodo de conformidad con la
15 reivindicación 20, caracterizado porque el compuesto es un
analogo de pirfenidona.
25 El rnØtodo de conformidad con la reivindicación 20, caracterizado porque el compuesto es del GØnero la:
20
X4 X5 R, R2
No/
X2 X10 R
Genera Ta;

25 en donde

R2, R3 y R4 Son seleccionados
independientemente del grupo que consiste de H, aiquilo
C1 -C10, aiquilo CLC1O sustituido, aiquenilo C1 -C101
haloalquilo Cl-Co, nitroalquilo C,. -Co, tioalquilo CCi0,
5 hidroxialquilo CI -CID, alcoxi C-001 fenilo, fenilo
sustituido, halógeno, hidroxilo, alcoxialquilo C1 -C10,
carboxi C1 -0O3 alcoxicarbonilo C -Co, CO-urônido, CO-
monosacÆrido, CO-oligosacârido y CO-polisacârido; y
X1, X2, X, X4 y X5 son seleccionados
10 independientemente del grupo que consiste de H, haidgeno,
alcoxi e hidroxi.
El mØtodo de conformidad con la
reivindicacidn 25, caracterizado porque el compuesto es un metabolito, hidrato, solvato, o profÆrmaco de un compuesto
15 del GØnero Ia.
27\ El mØtodo de conformidad con la reivindicación 20, caracterizado porque el compuesto es del GØnero Ib:

20 X3&N;/
0R4

Genera Ib;

en donde

25 X3 se selecciona del grupo que consiste de H,

halógeno, alcoxi C -C-0, y OH;
R2 se selecciona del grupo que consiste de H,
halógeno, aiquilo CLCIOI aiquilo CI-C sustituido, hidroxialquilo C1 -C10, alcoxialquilo C1 -C10, carboxi C1 -C10,
5 alcoxicarbonilo C1 -C10, CO-urônido, CO-monosacârido, 00-
oligosacªrido y C0-polisacârid.o; y
R4 se selecciona del grupo que consiste de H,
halÆgeno, y OH.
El rnØtodo de conformidad con la
10 reivindicaciOn 27, caracterizado porque el compuesto es un
metabolito, hidrato, solvato o profÆrmaco de un compuesto del G&iero lb.
29 El mØtodo de conforrnidad con la reivindicación 20, caracterizado porque el compuesto es del
15 GØnero Ic:

20

OH y OCH-;

X3N0
R4

GØnero Ic;

en doride

X3 se selecciona del grupo que consiste de H, F,

25 R2 se selecciona del grupo que consiste de H,

y OCH3;

R2 se selecciona del grupo que consiste de H,
CH20H, COOH, CO-Glucorónido, Br, CH3, y CH20CH3; y
R4 se selecciona del grupo que consiste de H y
5 OH, con la condición de que cuando X3 es OH, entonces H2 no

es CH3

33. El mØtodo de conformidad con la reivindicaciÆn 32 caracterizado porque el compuesto es un metabolito, hidrato, solvato o profÆrmaco de un compuesto
10 del SubgØnero II.
34. El rnØtodo de conformidad con la reivindicación 20, caracterizado porque el compuesto es del SubgØnero III:

15 X3N

0

en donde
MKI

Subgnero III;

X3 se selecciona del grupo que consiste de H, F
OH; y
R2 se selecciona del grupo que consiste de H, Br,
CH2F, CHF2, y CF.
25 35. El mØtodo de conformidad con la

reivindicación 34, caracterizado porque ci compuesto es un
metabolito, hidrato, solvato, o profÆrmaco de un compuesto
del Subgnero III.
36j El mtodo de conformidad con la
5 reivindicación 20, caracterizado porque ci compuesto es del
SubgØnero IV:

10

x3/Q2

SubgØnero IV;

en donde X3 se selecciona del grupo que cons–ste
de H, halógeno, alcoxi C1 -C10, OH, aiquilo C1 -C10, aiquilo
Scl-clo sustituido, aiquenilo C1 -C10, haloalquilo C1 -C10,
nitroalquilo C -C10, tioalquilo C1 -C10, hidroxialquilo C1 -C10,
15 fenilo, fenilo sustituido, alcoxialquilo C1-C1o, carboxi Ci-
C10, alcoxicarbonilo C1 -C10, CO-urónido, CO-monosacÆrido,
CO-o1igosacrido y CO-polisacdrido.
37. El mtodo de conformidad con la
reivindicación 36, caracterizado porque el compuesto es un
20 metabolito, hidrato, solvato o prof Ærmaco de un compuesto
del SubgØnero IV.
[38 El mØtodo de conformidad con la reivindicación 20, caracterizado porque el compuesto es del SubgØnero V:
25

CF3

X3 ł

SubgØnero V;
5

en donde X3 se selecciona del grupo gue consiste
de 1-i, halôgeno, alcoxi C1 -C, alguilo C1 -C10, alquilo C1 -C10
sustituido, aiquenilo C1 -C101 haloalquilo
nitroalquilo C1 -C10, tioalquilo C1 -C10, hidroxialquilo C1 -C10,
10 fenilo, fenilo sustituido, alcoxialquilo C1 -C10, carboxi C1 -
C10, alcoxicarbonilo C1 -C10, CO-urónido, CO-monosacArido,
CO-oligosacÆrido y CO-polisacÆrido.
S39 . El mØtodo de conformidad con la
reivindicación 38, caracterizado porque el compuesto es un
15 metabolito, hidrato, solvato a profârmaco de un compuesto
del Subgnero V.
El rnØtodo de conformidad con la
reivindicación 20, caracterizado porque el compuesto es del
Gnero VI:
20

X3_--Ar__rjjIZ
R4

Genera VI;

25 en donde

Ar es piridinilo o fenilo;
Z es 0 u S f

-

X3 es H, F, Cl, OH, CR3 U OCH3;
R2 es metilo, C(=O)H, C(=O)CH3, C(=O)OCH:, C(0)O
5 glucosilo, fluorometilo, difluorometilo, trifluorometilo, bromo, metilmetoxilo, metilhidroxilo, o fenilo,- y
R4 es H o hidroxilo;
con la condición de que cuando R2 es
trifluorometilo, Z es 0, R4 es H y Ar es fenilo, el fenilo
10 no es solamente sustituido en la posición 4’ por H, F u OH.
El mtodo de conformidad con la
reivindicación 40, caracterizado porque el compuesto es un
Smetabolito, hicirato, solvato o profrmaco de un compuesto
del Subgnero VI.
15 42 El mØtodo de conformidad con la
reivindicación 40, caracterizado porque el compuesto se selecciona de los compuestos 14 a 32 como sigue:

Nürnero Compuesto
20 de Compuesto

. 14 F___Nj?

15 CH3-0N

25

Y
Y

5

Yl

GŒneo VII

en donde X3 es H, halØgeno, alcoxi C -C10 u OH;
Y2, Y2, Y3 y Y4 son seleccionados independienternente del
10 grupo que consiste de H, aiquilo C1 -C10, aiquilo CI -C1_0
sustituido, aiquenilo ClCIo, haloalquilo
nitroalquilo C1 -C10, tioalquilo C -C10, hidroxialquilo C1 -0O3
alcoxi C1 -0O3 fenilo, fenilo sustituido, halógeno, hidroxilo, alcoxialquilo C1-001 carboxi CI-C1O,
15 alcoxicarbonilo C1 -C10; y
R4 es H, halógeno u 01-I.
44\. El mØtoclo de conformidad con la reivindicaciOn 43, caracterizado porque el compuesto es un
metabolito, hidrato, solvato, 0 profÆrmaco de un compuesto
20 del GØnero VII.
El mØtodo de conformidad con la
reivindicación 44, caracterizado porque el compuesto es:
Br

25

46 Un mØtodo para identificar Un compuesto
farmacØuticamente activo, caracterizado porque comprende:
proporcionar una biblioteca de compuestos;
ensayar una pluralidad de compuestos a partir de
5 la biblioteca por inhibicidn de al menos, una p38 MAPK; y
seleccionar al menos un compuesto a partir de la
pluralidad de compuestos, en donde el compuesto seleccionado exhibe un EC50 en el intervalo de aproximadamente 1 iM hasta aproximadamente 1000 i.1M por
10 inhibicidn de al menos una p38 MAPK.
47. Un mØtodo para identificar un compuesto
farmacØuticamente activo, caracterizado porque comprende:
proporcionar una biblioteca de compuestos;
someter a ensayo una pluralidad de compuestos a
15 partir de la biblioteca para inhibicidn de la secrecidn de
TNFx en un fluido corporal in vivo; y
seleccionar al menos un compuesto a partir de la
pluralidad de compuestos, en donde el compuesto seleccionado exhibe un EC53 en el intervalo de
20 aproximadamente 1 pil hasta aproximadamente 1000 11M por inhibición de la secrecidn de TNFa en un fluido corporal in

48. Un mØtodo para identificar un compuesto
farmacØuticamente activo, caracterizado porque comprende:
25 proporcionar una biblioteca de compuestos;

someter a ensayo una pluralidad de compuestos a
partir de la biblioteca par irihibiciôn de la secreciôn de TNFo par cŒlulas cultivadas in vitro; y
seleccionar al menos, un compuesto a partir de la
5 pluralidad de compuestos, en donde ci compuesto seleccionado exhibe un EC50 en el intervalo de aproximadamente 1 M hasta aproximadamente 1000 pM por inhibiciôn de la secreciôn de TNFc par cØlulas cultivadas
in vitro.

10 p49. Un mØtodo para identificar un compuesto farmacŒuticamente activo, caracterizado porque comprende: proporcionar una biblioteca de compuestos;
someter a ensayo una pluralidad de compuestos a
partir de la biblioteca pot inhibición de la secreciOn de
15 TNFo en un fluido corporal in vivo; y
seleccionar al menos, un compuesto a partir de la
pluralidad de compuestos, en donde el compuesto seleccionado exhthe un EC50 en el intervalo de aproximadamente 1 TIM hasta aproximadamente 1000 pM pot
20 inhibición de la secreción de TNFa pot cdlulas cultivadas in vitro.
50. Un mØtodo para identificar un compuesto
farmacØuticamente activo, caracterizado porque comprende:

proporcionar una biblioteca de compuestos.- ompuestos;25
25 someter a ensayo una pluralidad de compuestos a

partir de la biblioteca para inhibici6n. de la secreciÆn de TNFx por cØlulas cultivadas in vitro; y
seleccionar al menos, un compuesto de la
pluralidad de compuestos, en donde el compuesto
5 seleccionado exhibe un EC50 en el intervalo de aproximadamente 1 pM hasta aproximadamente 1000 pM por inhibiciÆn de la secrecidn de TNFo en un fluido corporal in
vi vo -

j51. El mØtodo de conformidad con cualquiera de
10 las reivindicaciones 47-50, caracterizado porque adems comprende, determinar una toxicidad de mamifero del compuesto seleccionado.
52. El mØtodo de conformidad con cualquiera de
las reivindicaciones 47-50, caracterizado porque ademÆs
15 comprende, administrar el compuesto seleccionado a un sujeto de prueba.
53. El mØtodo de conformidad con la reivindicación 52, caracterizado porque el sujeto de prueba tiene, o estÆ en riesgo de tener una condiciOn
20 inflamatoria.
54. El mØtodo de conformidad con cualquiera de
las reivindicaciones 47-50, caracterizado porque la p38 MAPK se selecciona del grupo que consiste de p38c, p38, p38y, y p38.
25 55. El mØtodo de conformidad con la

reivindicación 46, caracterizado porque el EC50 se obtiene
a partir de una curva de respuesta de dosis.
56. El mØtodo de conformidad con la reivindicaciôn 46, caracterizado porque el EC50 està en ci
5 intervalo de aproximadamente 50 pM hasta aproximadamente
650 pM.
57. El mŒtodo de conformidad con la reivindicaciôn 47, caracterizado porque el EC50 se obtiene
a partir de una curva de respuesta de dosis.
10 58. El mØtodo de conformidad con la reivindicación 47, caracterizado porque ci EC50 estÆ en ci intervalo de aproximadamente 50 pM hasta aproximadamente
650 pM.
Un compuesto, caracterizado porque tiene la
15 formula del SubgØnero III:

X3Ø

SubgOnero III;
20
en donde

X3 se selecciona a partir del grupo que consiste de H, F y OH;
R2 se selecciona del grupo que consiste de H y
25 CF3; y

61. El compuesto de conformidad con la reivindicación 59, caracterizado porque tiene un EC5() en el intervalo de aproximadamente 1 pM hasta aproximadamente 1000 pM por inhthicidn de p38 MAPK.
5 62. El compuesto de conformidad con la
reivindicaciÆn 61, caracterizado porque tiene un EC50 en el intervalo de aproximadamente 50 pM hasta aproximadamente
650 pM.
63. El compuesto de conformidad con la
10 reivindicación 61, caracterizado porque tiene un EC50 en el
intervalo de aproximadamente 1 pM hasta aproximadamente 1000 pM por inhibición de la secrecidn de TNFa en un fluido corporal in vivo.
64. El compuesto de conformidad con la
15 reivindicacidn 61, caracterizado porque tiene un EC50 en el
intervalo de aproximadamente 1 pM hasta aproximadamente 1000 pM por inhibicidn de la secreción de TNFa por c1ulas cultivadas in vitro.
. . 65. Un compuesto, caracterizado porque tiene la
20 formula del GØnero VI:

X3ArØ
Z R4

Gnero VI;
25

2C29

en donde
Ar es piridinilo ofenilo;
Z es 0 U Si
X3 es H, F, Cl, OH, C143 u OCH3;
5 R2 es metilLo, C(0)H, C(=O)CH3, C(0)OCH3, C(0)O-
glucosilo, fluorometilo, difluorometilo, trifluorometilo, bromo, metilmetoxilo, metilhidroxilo, a fenilo; y
R4 es H o hidroxilo;
con la condicióri de que cuando R2 es
10 trifluorometilo, Z es 0, R4 es H y Ar es fenilo, el fenilo no es solamente sustituido en la posición 4’ par H, F u OH;
en donde el compuesto exhibe un EC50 en el
intervalo de aproximadamente 1 p11 hasta aproximadamente 1000 pM por inhibición de p38 MAPK; a una sal, ester,
15 solvato a profªrmaco del compuesto, farmacØuticamente acept able.
66. El mØtodo de conformidad con la reivindicaciôn 66, caracterizado porque el compuesto se selecciona de los compuestos 14 a 32 como sigue:
20 Nmero Compuesto
de Compuesto

14 FN

25

15 CH3-0N

1000 pM por inhibiciÆn de al menos una p30 MAPK.
68. El compuesto de conforrnidad con la reivindicación 61, caracterizado porque tiene un ECo en el intervalo de aproximadamente 50 pM hasta aproximadamente
5 650 pM.
69. El compuesto de coriformidad con la reivindicación 67, caracterizado porque tiene un EC50 en el intervalo de aproximadamente 1 pM hasta aproximadamente 1000 pM por inhibición de la secreciÆn de TNFo en un fluido
10 corporal in vivo.
70. El compuesto de conforrnidad con la reivindicaciôn 67, caracterizado porque tiene un EC50 en el intervalo de aproximadamente 1 pM hasta aproximadamente 1000 pM por inhibición de. la secreción de TNFx por cØlulas
15 cultivadas in vitro.
Un compuesto, caracterizado porque tiene la
fOrmula del GØnero VII:
Yl
Y2
’R4
Y3.)(aNIO
20
Y4

L)

GØnero VII

25 en donde

X3 es H, halôgeno, alcoxi. u OH;
y Y4 son seleccionados
independientemente del grupo que consiste de H, aiquilo
Ci-Clu, aiquilo C.-00 sustituido, alguenilo C1 -C10,
5 haloalquilo C -C10, nitroalquilo C1 -C10. tioalquilo C1 -C10,
hidroxialquilo C1 -C10, alcoxi C1 -C10, fenilo, fenilo
sustituido, halôgeno, hidroxilo, alcoxialquilo C -C10,
carboxi C -0O3 alcoxicarbonilo C1 -C10; y
R4 es H, halÆgeno u OR; y
10 en donde el compuesto exhibe un EC50 en el
intervalo de aproximadamente 1 4M hasta aproximadamente 1000 pM por inhibiciôn de p38 MAPK; o una sal, ester, solvato o profÆrmaco del compuesto farmacØuticamente aceptable.
15 72. El compuesto de conformidad con la
reivindicación 71, caracterizado porque tiene un EC50 en el intervalo de aproximadamente 1 pM hasta aproximadamente 1000 pM por inhthiciôn de al menos una p38 MAPK.
73. El compuesto de conformidad con la
20 reivindicaciOn 71, caracterizado porque tiene un EC50 en el
intervalo de aproximadamente 50 pM hasta aproximadamente
650 pM.
74. El compuesto de conformidad con la reivindicación 71, caracterizado porque tiene un EC50 en el
25 intervalo de aproximadamente 1 pM hasta aproximadamente

1000 pM por inhibición de la secreción de TNFc> en un fluido corporal in vivo.
75. El compuesto de conformidad con la reivindicaciÆn 71, caracterizado porque tiene un EC50 en el
5 intervalo de aproximadamente 1 pM hasta aproximadamente 1000 pM por inhibición de la secreción de TNFc por cØlulas cultivadas in vitro.

76. El compuesto de conformidad con la reivindicación 71, caracterizado porque el compuesto tiene
10 la formula:

15 77. El compuesto de conformidad con la
reivindicación 71, caracterizado porque tiene un EC50 en ci intervalo de aproximadamente 1 pM hasta aproximadamente 1000 pM pot’ irihibición de al menos una p38 MAPK.
78. El compuesto de conformidad con la
20 reivindicación 71, caracterizado porque tiene un E050 en el
intervalo de aproximadamente 50 pM hasta aproximadamente
650 pM.
79. El compuesto de conformidad con la reivindicaciOn 71, caracterizado porque tiene un EC0 en el
25 intervalo de aproximadamente 1 pM hasta aproximadamente

1000 M par inhibición de la sccreciôn de TNFc en un fluido corporal in vivo.
80. El compuesto de conformidad can la
reivindicaciôn 71, caracterizado porque tiene un EC50 en ci
5 iritervalo de aproximadamente 1 pM hasta aproximadamente
1000 pM par inhibición de la secreción de TNFa par cØlulas

cultivadas in vitro.

81. Una composiciÆn farmacØutica, caracterizada
porque comprende ci compuesto de conformidad con la
10 reivindicación 59 y un excipierite farmacØuticamente
aceptable.
82. Una composición farmacØutica, caracterizada
porque comprende ci compuesto de conformidad con la reivindicación 65 y un excipiente farntacØuticamente
15 aceptable.
83. Una composición farmacØutica, caracterizada
porque comprende el compuesto de conformidad con la reivindicación 71 y un excipiente farmacØuticamente aceptable.
20 84. La composiciÆn farmacØutica de conformidad
con la reivindicación 81, caracterizada porque la composición contiene una cantidad de dicho compuesto que Sc
selecciona para administraciôn a un paciente en un
programa seleccionado de: dos veces al dIa, una vez al dia,
25 una vez cada dos dias, tres veces a la semana, dos veces a

la semana y una vez a la semana.
85. La composicôn farmacuL–ca de conformidad
con la reivindicación 82, caracterizada porque la composición contiene una cantidad de dicho compuesto que se
5 selecciona para administración en un paciente, en un
programa seleccionado de: dos veces al dia, una vez al dia,

- 1

una vez cada dos dias, tres veces a la semana, dos veces a
la semana y una vez a la semana.
86. La composiciÆn farmacØutica de conformidad
10 con la x’eivindicaciôn 83, caracterizada porque la composiciôn contiene una cantidad de dicho compuesto que se selecciona para administraciôn en un paciente, en un
programa seleccionado de: dos veces al dia, una vez al dia,
una vez cada dos dias, tres veces a la semana, dos veces a
15 la semana y una vez a la semana.
87. El mØtodo de conformidad con la

reivindicación 20, caracterizada porque dicho compuesto se ()
administra a dicho sujeto en un programa seleccionado de:
dos veces al dia, una vez al dia, una vez cada dos dias,
20 tres veces a la semana, dos veces a la semana y una vez a
la semana.
88. El mØtodo de conformidad con la reivindicación 21, caracterizada porque dicho compuesto se administra a dicho sujeto en un programa seleccionado de:
25 dos veces al dia, una vez al dia, una vez cada dos dias,

EstrŒs CeI&1av

(lesm’n de ADPII cIor, gofpe osr,’6bco)1 Age.?tes Exâgeos (a’/.somicTh,?rsemkG NA., LPS)
E.sin/o Ambie.t’/
Pwo de cirrn,

IŒrgern’s ;.J.......

FIG. I
Tknicd ---5.--..-.
AI t 4? r io r 1/ S. 1(P.J(rz1fl7Ir-ll’\

ciziasi /
\ Ciniisi I-... ...---..... I . . --
44r r j10 K2’3 <M I 4tC1P ’.. -- I
 5.. .1 I -- .- ... - -- --

_________ ET lip -k

- porción Au -rich

2/7

1

0,20.2

P1rEC50 = 503 iM
5 OH EC50 = 684 IiM
COOH EC50 = 1053 pM
5 Økr mtiIico EC = 1107.tM 3 OH EC50 = 1454 IN
40HEC50= 174 g

10 100 1000 iO

Cornpuesto (pM)

FIG. 2

1

0.2

S

P1rEC50 = 462.tM
5 OH EC50= 1059 j..M
GOON EG0 = 986 jjM
5 Øtir mtI1ico EC50 1743 tiM, 3 OH EC50 = 1496.tM
4 OH EC50 = 288 pM

10 100 1000 104 Compuesto (pM)

FIG. 3

P38a P38y
40R 288 g 174 MM

(>N

50H

P38a p3_BY J5 5COOH
462 MM

5 CR3 Øter
Pr

P38a P38
3011 1496 MM 1454 MM

P38a
1059 PM
986 MM
1743 MM

684 MM
1053 JIM
1107 MM

FIG. 4

12
I

I:::
0.4

0,2
0

200 400 600 800 1000 1200 1400 1500 7800?UOO Compuesto (pM)

FIG. 5

Pir1
A--- 50H
- - c- 5GOQH
- - A- 5 glucuronido
 . -30H
A 40H

 *Ana!ogo (ótr dirn’t!iico

[I:

E 5-Gfucoronido
- 0 5-hidrox
3-ihidroxi
Plrfenidona

0 100 250 SOt) fbU
Cornpuesto (PM)

rjIjIJL.............

I -

LII
MON

Jit1iI1ILII1IJ 1.... 0 250 500 750 1000

Cornpuesto (1iM)

FIGS 6

10

wl

’71

1.60

?50

H40

r3oi
20

L10 OR

2000

L0

z 2y

S

J Pit fenidona
05-metil-eter

U 7UU 250 aUG 750

Cornpuesto(.iM)

FIG. 6

(contin uación)

1000 2000

35

30

25

203()
15

10

5

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

Applicanfs or agents file reference
see form PCTJISAi220

PCT

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

(PCT Rule 43bis.1)

(day/month’j’ear) see form PCTISA210 (second sheet)

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

tniernationl apphcation NoInternational filing dote (dayitnonth4’ear) T Priority date (day/monthyear) PCTAJS2006,O1 7988 j.05.2006 2005

International Patent Clsiflca1iori (IPO) or both national classification and IPC
INV, A61 K31/44 A61 K31/4412 A61 K31/4704 A61 1‘9/00 A61 Fill 1,00A61P13t12 A61 P29/00 A61 P43/00

Applicani
INTERMUNE, INC.

t This opinion contains indications relating to the following items:

. BoxNo. I Basis of the opinion
0 Box No. II Priority
Box No. Ill Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
Box No. IV Lack of unity of invention
ED Box No V Reasoned statement under Rule 43bi.s.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial
applicability, citations and explanations supporting such statement
Box No. VI Certain documents cited

1111 Box No. VII Certain defects in the international application
D Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a
written opinion of the International Preliminary Examining Authority (IPEA") except that this does not apply where
the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notifed the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority
will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the PEA, the applicant is invited to
submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCTASA220 or before the expiration of 22 months from the priority date,
whichever expires later.

For further options, see Form PCT4SA.220

For further details, see notes to Form PCTSA220

Name and mailing address of the ISA: Dale of completion of Authorized Officer
this opinion

jEuropeanPatiOfficeseeform -80298 Munich Taylor, Mark PCTISA,210 TeL +49 89 2399 - 0 Ix: 523656 epmu d

Fax: +49 89 2399 - 445 Telephone No. +4989 2399-8406

Form (PCTfSA237) (Cover Sheet) (April 2005)

Wilt I I N UtINIOII Ur I I1 International application No.
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY PCTAJS200601 7988

Box No. I Basis of the opinion
1. With regard to the language, this opinion has been established on the basis of:
the international application in the language in which it was filed
LI a translation of the international application into, which is the language of a translation furnished for the
purposes of international search (Rules 123(a) and 23.1 (b)).
2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
a. type of material:
El a sequence listing
table(s) related to the sequence listing
b. format of material:
on paper
LI in electronic form
C time of fiting,furnishing:
LI contained in the international application as filed
LI filed together with the international application in electronic form.
LI furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

3. 0 In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto
has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as tiled, as
appropriate, were furnished.
4. Additional comments:

Form PCTISA!237 (April 2005)

VV1II I I tN Ot-iriiuN UI- lilt
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCTAJS2006iO1 7988

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

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

LII the entire international application

claims Nos. 910. 20-23, 25,26 87-92

because:

the said international application, or the said claims Nos. 1-8, 9, 10. 20-23, 25.26, 87-92 relate to the
following subject matter which does not require an international search

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):

El the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion
could be formed (specify):

FJ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos. j
11-18, 20-24__27-333,5-92

D a meaningful opinion could not he formed without the sequence listing; the applicant did not, within the
prescribed time limit:

El furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not availablb... e International Searching
Authority in a form and manner acceptable to it

C2 furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C
of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching
Authority in a form and manner acceptable to it.

0 pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an
invitation under Rules l3 ter. 1(a) or (b).

O a meaningful opinion could not be formed without the tables related to the sequence listings; the applicant
did not, within the prescribed time limit, furnish such tables in electronic form complying with the technical requirements provided for in Annex C-b/s of the Administrative Instructions, and such tables were not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

0 the tables related to the nucleotide andkr amino acid sequence listing, if in electronic form only, do not
comply with the technical requirements provided for in Annex C-b/s of the Administrative Instructions.

0 See Supplemental Box for further details

Form PCTASA237 (April 2005)

10

W11111, ti’ ui-iriur or i "t International application No. INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY PCTIUS2006i01 7988

Box No. IV Lack of unity of invention
1 In response to the invitation (Form PCTitSAt206) to pay additional fees, the applicant has, within the applicable time limit:
D paid additional fees
O paid additional fees under protest and, whore applicable, the protest tee
paid additional fees under protest but the applicable protest fee was not paid
not paid additional fees

2,0 This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose not to invite the applicant to pay additional fees.
3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rule 13.1, 13.2 and 13.3 is

0 complied with
not complied with for the following reasons:
see-separate sheet
4. Consequently, this report has been established in respect of the following parts of the international application:
LI all parts.
tl the parts relating to claims Nos. jo.2023.25,26,87-92

Box No. V Reasoned statement under Rule 43b1si(a)(i) with regard to novelty, inventive step or
- industrial applicability; Citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)

Inventive Step (IS)

Industrial applicability (IA)

2 Citations and explanations
see sejarate sheet

Yes: Claims
No: Claims 1-8, 9, 10, 20-225.26. 87.92
Yes: Claims
No: Claims j00-225.2.87-92
Yes: Claims
No: Claims 1J0-27

Form PCTSA! 237 (April 2005)

iR)

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY (SEPARATE SHEI

Cited Prior Art
Dl: Hepatology 2003, 38, 495
D2: W003/068230
D3: GB-A-1 458 049
04: US-A-4 052 509

nternationaI application No

PCT/US2006/01 7988

05: US-A-3 974 281
D6: W02005/000818
07: WO 2004/105684

Section HI

1. Claims 1-8, 9, 10, 2023, 25,26 and 87-92 relate 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 with respect to the industrial applicability of the subject-matter of these claims (Art. 34(4)(a)(1) PCT).

Section IV

2. This Authority considers that there are 12 inventions covered by the claims indicated
in the International Search Report (ISR) The reasons for which the inventions are
not so linked as to form a single general inventive concept, as required by Rule 13.1 PCT, are also given on Form PCT/ISA/210.

Since the Applicant has not paid further fees relating to the other groups of (claimed) inventions, the search was restricted to the first (claimed) invention mentioned in the claims. This Opinion is similarly restricted to the said first (claimed) invention.

Section V

3. Claims 1-8, 9, 10, 20-23, 25,26 and 87-92 do not meet the requirements of Art. 33(2)
PCT because their subject-matter is not novel over the disclosures of D1 -D7. See, in particular, the passages cited in the ISA.

4. Not being novel, the subject-matter of claims 1-8, 9, 10, 20-23, 25,26 and 87-92 do
not meet the requirements of Art. 33(3) PCT.

5. For the assessment of the present claims 1-8,9, 10, 20-23, 25,26 and 87-92 on the
question whether they are industrially applicable, no unified criteria exist in the POT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognize as industrially applicable the

Form PCi.15N237 SEpra1e She) (Oheol 1) EPO-April 2005)

INTMU006VPC

1/4
PCT REQUEST
Original (for SUBMISSION)

0 For receiving Office use Only
0-1 International Application No.

0-2 Iloternational Filing Dale

of receiving Office and "PCT
hOflal Application

0-4 Form PCTJRO/10I PCT Request

0-4-1 Prepared Using PCT-SAFE [EASY mode]
Version 3.51,001.176 MT/FOP 20069101/0.20,4rc..7
0-5 Petition
The undersigned requests that the
present international application be
processed according to the Patent
Cooperation Treaty

0-6 Receiving Office (specified bythe United States Patent and Trademark applicant) Office (USPTO) (RO/US)
0-7 Applicant’s or agent’s file reference IN’rInJ. 00 6VPC
Title of Invention METHOD OF MODULATING STRESS -ACTIVATED
PROTEIN KINASE SYSTEM
II Applicant

H -I This person is applicant only
11-2 Applicant for all designated States except US
11-4 Name INTERNUNE, INC.
0-5 Address 3280 Bayshore Boulevard
Brisbane, California 94005
United States of America
11-6 State of nationality
11-7 State of residence YJ
lU-i Applicant and/or inventor

Ill-i-i This person IS applicant and inventor
111-1-2 Applicant for US only
111-1-4 Name (LAST. First) BLATT, Lawrence, M.
Ill-i-S Address 10 Shoreview
San Francisco, California 94121 United States of America
Ill-I-S State of nationality
111-1-7 State of residence

INTMU.006VPC

PCT REQUEST

111-2 Applicant end/or inventor
111-2-1 This person is
111-2-2 Applicant for
111-2-4 Name (LAST First)
111-2-5 Adthess

111-2-6 tate of nationality
111-2-7 I’Stale of residence
111-3 Applicant and/or inventor
111.3-1 This person is
111-3-2 Applicant for
11-3-4 Name (LAST. First)
111-3-5 Address

M-3-6
111-3-7
111-4
111-4-1

Slate of nationality
Slate of residence
Applicant andfor inventor
This person is
111-4-2 Applicant for
111-4-4 Name (LAST. First)
1114-5 AddresS

111-4-6 State of nationality
111-4.7 State of residence

IV-1 Agent or common representative; or
address for correspondence
The person identified below is hareby/
has been appointed to act on behalf of
the applicant(s) before the competent
International Authorities as:
IV-1-1 Name (LAST, First)
IV-1-2 Address

IV.-1-3 Telephone No,
IV-1--4 Facsimile No.
IV-1-5 e-mail
IV- 1-6Agents registration No.

214

Original (for SUBMISSION)

applicant and inventor
US only
SEIWERT, Scott, D.
828 Rockaway Beach Avenue Pacifica, California 94044 United States of America
US

applicant and inventor
US only
BEIGELMAN, Leonid
991 E. Grant Fl.
San Mateo, California 94402 United States of America

S

applicant and inventor
175 only
RADHAKRI SHNAN, Ramachandran 40623 Palatino Street
Fremont, California 94539
United States of America
US

gent

MALLON, Joseph
2040 Main Street
14th Floor
Irvine, California 92614
United States of America
619-235--8550
949-760-9502
Instructions@kmob.com 39,287

NTMUMO6VPC

PCT REQUEST

314

Original (for SUBMISSION)

V DESIGNATIONS

V-I The filing of this request constitutes
under Rule 49(a), the designation of
all Contracting States bound by the
PCT on the international fitig date,
for the grant of every kind of
protection available and, where
applicable, for the grant of both
regional and national patents.

VI-I Priority claim of earlier national
application

VI-1-1 Filing date 10 May 2005 (10.05. 2005)
VI-1-2 Number 60/679,471
Vt-1-3 Country US

V1-2 Priority claim of earlier national
application

Vl-2-1 Filing date 01 November 2005 (01.11.2005)

VI-2-2 Number 60/732,230
VI-2-3 Country

VI-3 Priority document request

The receiving Office is requested to VI -1, VI -2

prepare and transmit to the International
Bureau a certified copy of the earlier
application(s) identified above as
tern(s):

VII-I International Searching Authority European Patent Office (EFO) (ISA/EP) Chosen
VIII Declarations Number of delarslions

VIII-I Declaration as to the identity of the
inventor

VIII-2 Declaration as to the applicants
entitlement, as at the international filing
date, to apply for and be granted a
patent
VIII-3 Declaration as to the applicants
entitlement, as at the international filing
date, to claim the priority of the earlier
application
VIII-4 Declaration of inventorship (only for the
purposes of the designation of the
United Stales of America)
VIII-5 Declaration as to non -prejudicial
disclosures or exceptions to lack of
novelty

NTMU.006V1-C

PCT REQUEST

TX
IX -1
IX-2
IX-3
IX-4
TX-5
IX-7

heck list

c-quest (including dcc rticrc els

ma

4/4

Original (for SUBMISSION)

number of sheets
4
67
24
1
6
102
. ccomparlying Items paper docurnen

ee calculation sheet -
CT-SAFE physical media

igure of the drawings which should 5
ccompany the abstract

anguage of filing of the international EngLisb pplication
ignature of applicant, agent or
.ommon representative

?M"
X-1-1 Name (LAST, First) MALLON, Joseph
X-1-2 Name of signatory
X-1-3 Capacity

FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

lCcTronic tiIe((attached

10-I Date of actual receipt of the
purported international application
10-2 Drawings:
10-2-1 Received
10-2-2 Not received

10-3 Corrected date of actual receipt due
to later but timely received papers or
drawings completing the purported
international application
10-4 Date of timely receipt of the required
corrections under PCT Article 111 (2)
10-5 International Searching Authority iSA/EP
10-6 Transmittal of search copy delayed
u nti l search lee is paid

FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

S 111 of receipt of the record copy

jhe International Bureau___

PATENT COOPERATION TREATY PCTIUS2006I01 7988

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT To.

RIN-LAURES, Lily NOTIFICATION OF THE RECORDING Marshall, Gerstein Borun LLP
OF A CHANGE 233 South Wacker Drive
6300 Sears Tower

(PCT Rule 92bis.1 and Chicago, IL 60606-6357
Administrative Instructions, Section 422) ETATS-UNIS DAMERIQUE

Date of mailing daw’nnth3’ear
02 October 2007 (02.10.2007)

Applicant or agent’s file reference
30481/30016 PCT IMPORTANT NOTIFICATION

TnkrnatioOal application No Intonational filing date ((loy/month/year)
PCT/US20061017988 09 May 2006 (09.05.2006)

1. The ibilowing indications appeared on record concerning:

0 the applicant [] the inventor the agent El the common representative
Name and Address State of Nationality State of Residence
MALLON, Joseph
2040 Main Street
14thFloor
Irvine, California 92614

Telephone
619-235-8550

No-a14th

United States of America Facsimile No-
949-760-9502

Teleprinter No,

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

the person El the name the address E1 the nationality the residence
Name and Address State olNationality State of Residence
RIN-LAURES, Lily

Marshall Gerstein Borun LLP Telephone No.

233 South Wacker Drive

6300 Sears Tower 312-474-6300
Chicago, IL 60606-6357 Facsimile No.
United States of America 312-474-0448

Teleprinter No.

3. Further observations, if necessary:
A new agent has been appointed, as indicated in Box 2. The new agents file reference is 30481/30016 PCT

4- A COPY of this notification has been sent to:
the receiving Office the designated Offices concerned

the International Searching Authority [J the elected Offices concerned
0 the International Preliminary Examining Authority other: MALLON, Joseph

The International Bureau of WIPO Authorized officer
34. ehcmin des Colombettes

1211 Geneva 20, Switzerland Ruby Serge
c-mail pt04.pct0qwip0.i1it
Facsimile No. +41 22338 89 95 Telephone No. +41 22 338 74 04
Forni l-’U iIii3/it)t, (t)cloI:tcr 2Ut))

PATENT COOPERATION TREATY PGT/US2006/01 7988

Ll

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR. TRANSMITTAL
OF PRTOPJTY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions. Section 411)

Date of mailing (daj./tnonthvear)
18 August 2006 (18.08.2006)

FT0111 the INTERNATIONAL BUREAU

TO

MALLON, Joseph
2040 Main Street
14th Floor

Irvine, California 92614
ETATSUNlS DAMERIQUE

Applicants or agent’s file reference iMPORtANT NOTIFICATION INTMU.006VPC
International application No. International filing date (day/inon!hvea’)
PCT/U520061017988 1 09 May 2006 (09.05.2006)
intentaOonal publication date (c/av/month/year) Priority date fdoy/n,onth/yeclr)
Not yet published 10 May 2005 (10.05-2005)

[Applicant
INTERMUNE, INC. et al

4. By means of this form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to
all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR’, in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau
in compliance with Rule 17.1(a) or (b).

2. (If applicable) The letters "NW’ appearing in the right-hand column denote a priority document which, ttn the date nfmailing of .thi.L.Eorw, had not yet been received by the International Bureau under Rule 17.1(a) or (h). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the
circumstances.

(Ifapplicable)An asterisk (*) appearing next to a dale of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or b) (the priority document was received alter the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even, though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17. 1(a) or (h), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as the priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry
into the national phase, to fuinisli the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

I ErmtlltL.delme Priority ApplicaliQ11 No
10 May 2005 (10.05.2005)
01 November 2005 (01.11,2005)

60/679,471
60/732,230

Cotiniry or_regional Office
or PC’[receiving Office

us
us

Date. of receipt
a!’ priority document

14 July 2006 (14.07.2006)
14 July 2006 (14.07.2006)

The hiteniational Bureau of W11’O Authorized officer
34, chernin des Colomnhcttes
1211 Geneva 20, Switzerland Athina NickItas-Etlenne

Facsimile No. +41 22 338 82 70

Facsimile No. +41 22 338 89 95

Telephone No. +:tl 22 338 94 43
IC

0

PATENT COOPERATION TREATY WO 2006/122154 PCT/US2006/017988

CORRECTED VERSION

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING MALLON, Joseph
SUBMISSION OR TRANSMITTAL 2040 Main Street
OF PRIORITY DOCUMENT 14th Floor
Irvine, California 92614
ETATS-UNIS D1AMERIQUE
(PCT Administrative instructions, Section 411)

Date of mailing (doy/nonth.)eor
31 August 2007 (31.08.2007)

Applicant’s or agents file reference
INTMU.006VPC IMPORTANT NOTIFICATION

International application No. International filing dale (doy/month/yeus)
PCTIUS2006/01 7988 09 May 2006 (09.05.2006)

International publication date iday/montIs/yea) Priority dale day/month/year
16 November 2006 (16.11.2006) 10 May 2005 (10.05.2005)

Applicant
INTERMUNE INC. et at

1. By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority
documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the international Bureau of the priority document(s) relating to
all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by
an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).

2. (if applicable) The letters NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which, n&1heAte..oLmailin
ntihJn= had not yet been received by the International Bureau under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 171(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant tInts to subsnit the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned helore giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the
circumstances.

3. (if applicable)An asterisk () appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted
or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17,1(a) or (b) (the priority docmneiit was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17:1(1))). Even though the priority document was not furnished in coinphiaiice with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as the priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned beibre giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable wider the circumstances.

Priority application No Country os reoinnsil Office Dale of receipt
ia PC:T reeeivin Office of priority document

10 May 2006 (1005.2005) 60/679,471 US 14 July 2006 (14.07.2006)
01 November 2005 (01.11.2005) 60/732,230 US 14 July 2006 (14.07.2006)

The International Bureau of WIPO Authorized ollicer
34 chemin des Colomhettcs

1211 Geneva 20, Switzerland Tholle Peter
e-mail pt04.pctwipo.int
Facsimile No. ’t-41 22 338 89 95 Telephone No. +41 22 338 74 04

ton).] i’t. 1/Iti/)U’l (UciOt)er zouD)

*4

OF

3

SUPERINTENDENCA DE INDUSTRA Y
COMERCONo.

07-117657- -00000-0(110

1

IIIIJIIUIllhIIIIIIiIIIIiiIIiIIIIIIIIIIII
Fecha: [ndustr.ia y Cornercio
PALNEfliI Fve: 378 FASLNACR3N4L: SUP E RNTE ND E NCA 41, SENACRD Foos. 299

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMJSION A TRAMITE
PCT

PATENTE DE INVENCION MODELO DE UTILIDAD [

+ ndicaciOn de que se solicita la concesión de una patente
Datos de identificaciOn del solicitante o de la persona que presenta Ia solicitud.4-
DescripciOn de lanvenciOn [4
Dibujos de ser estos pernentes
Comprobante de pago de las tasas establecidas

COMPLETA I

DISE7JO INDUSTRIAL

INCOMPLETA

+ IndicaciOn de que se solicita el registro de DiseæoIndustrial [I
Datos de identIficación del solicitante o de la persona que presenta la socitud [I RepresentaciOn grÆfica y fotogrÆfica del Diseæo industrial a muestra del material que incorpora el d3setSo
Comprobante de pago de las tasas establecidas [3

COMPLETA ’1

ESQUEMADETRAZADO [3

INCOMPLETA [3

lndicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado 1
Datos de identificación del solicitante a de Ia persona que presenta la salicitud [I
RepresentaciOn grfica del esquema trazado [3
+ Comprobante de pago de las tasas establecidas

COMPLETA [3

Fir a Responsabie

INCOMPLETA { 1

Fecha Carrera 13 No. 27-00 Pso 5, 7 y 10
Crnmtnr R7 OR 411

REPUBLICA DE COLOMBIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCXO

Bogota,
2020

Doctor (a)
RODRIGUEZ 1) ALEMAN DILIA MARIA

REFERENCIA Radicaci6n No. Solicitud internacional
Fecha iniclo fase naciona:
TrÆmite
Evento
Actuación
Of icio No.

7 117657
PCT/U82006/017988
10/12/2007
11
378
430

1673S

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artIculo 38 de
la Decision 486 de la ComisiOn de la Comunidad Andina, artIculo 27 del Tratado de
CooperaciOn en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular
Unica de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comimica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesiOn del
derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisi6n 486.

2. La solicitud no contiene el poder debidainente otorgado, con el lieno de los
requisites exigidos por los artIculos 63 y subsiguientes del COdigo de
Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberA presentar el documento que acredita la
existencia y representaciOn legal de la sociedad solicitante, cuando Østa fuere
persona juridica.

En curnplimiento de lo dispuesto per el artIculo 39 de la DecisiOn 486, se le
requiere para que dentro del tØrmino de dos meses siguientes a la fecha de
notificaciOn del presente of icio, complete los requisites anteriormente enunciados.
En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se
corisiderarÆ abandonada y perderÆ su prelaciOn.

Notifiquese el presente oficio conforme a lo
e), del capitulo quinto el Itulo primero de

ALIX CARNENZA gP DES DE VERGEL
Jefe de la d7si6n de Nuevas Creaciones

dispuesto en el numeral 5.2, literal
la Circular Unica No.10 de 2001.

El anterior requerimiento fue notificado por fijaciOn en lista de fecha______________
adpall