



No. 14-062064-00010-0000

Fecha: 2015-08-14 17:02:47

Tra. 11 PATENTE IYII

Act. 523 RESPUESTA

Dep. 2020 DIR. NUEVASC

Eve: 379 FASE NACIONAL IYII

Folios: 10

Señor
SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES
E. _____ S. _____ D. _____

Trámite: 11
Evento: 379
Actuación: 523

Re: PI.-RESPIVERT LIMITED.-Solicitud de Patente de Invención en Fase Nacional PCT para "1-PIRAZOLIL-3-(4-((2-ANILINOPIRIMIDIN-4-IL)OXI)NAFTALEN-1-IL) UREAS COMO INHIBIDORES DE P38 MAP CINASA".-Clase C07D 403/12.-Expediente número 14-062.064.-

1. Me refiero al auto dictado por ese Despacho notificado por fijación en lista de 26 de Mayo de 2015.

2. Con el fin de responder a las objeciones expuestas por el Señor Examinador bajo los acápites de claridad de las reivindicaciones y nivel inventivo, me permito presentar los siguientes argumentos técnicos y las siguientes modificaciones en el capítulo reivindicatorio de la solicitud de patente en cuestión, por medio de lo cual se superan completamente dichas objeciones.

3. MODIFICACIÓN DEL CAPÍTULO REIVINDICATORIO.

Ahora bien, me permito manifestar que es deseo del solicitante presentar un **capítulo reivindicatorio modificado**, que reemplaza al actualmente presentado, con el propósito de superar las objeciones presentadas como parte del concepto técnico realizado por ese Despacho.

En conexión con el mencionado **capítulo reivindicatorio modificado**, me permito resaltar que éste no constituye de ninguna manera una ampliación al alcance de la solicitud, tal como fue originalmente presentada, toda vez que las reivindicaciones aquí presentadas definen de forma precisa y limitada los compuestos 1-pirazolil-3-(4-((2-anilino pirimidin-4-il)oxi)naftalen-1-il) ureas como inhibidores de P38 MAP cinasa, lo cual es el objeto de la presente invención de acuerdo con las enseñanzas de la descripción. Dichas modificaciones se exponen a continuación:

Nueva Reivindicación	Soporte
1-5	Corresponden a las reivindicaciones 1-3, 5 y 7 actualmente presentadas.
6	Corresponde a la reivindicación 8 actualmente presentada, en donde se ha modificado su dependencia de acuerdo a las nuevas reivindicaciones 1-5.

De acuerdo a lo anterior, me permito señalar que las reivindicaciones **4, 6 y 9** del Capítulo Reivindicatorio originalmente presentado fueron **eliminadas** del documento modificado.

De esta forma, **el capítulo reivindicatorio modificado queda constituido por 6 reivindicaciones**, las cuales se refieren de manera más clara y concisa a los compuestos 1-pirazolil-3-(4-((2-anilino pirimidin-4-il)oxi)naftalen-1-il) ureas como inhibidores de P38 MAP cinasa, que son objeto de la presente solicitud, y que cuentan con pleno sustento en las enseñanzas de la descripción.

4. CLARIDAD DEL CAPÍTULO REIVINDICATORIO.

Ahora bien, con respecto a la claridad del capítulo reivindicatorio, el señor Examinador afirma lo siguiente:

- ✓ "Las reivindicaciones deben definir la materia a proteger por sus características técnicas esenciales, en el caso de las reivindicaciones 4 y 6 las expresiones "sustancialmente como se muestra en la Figura 1" y "sustancialmente como se muestra en la Figura 2" hacen referencia a dibujos, lo cual no es aceptable. Ahora bien en el caso de la forma cristalina reclamada esta debe caracterizarse por sus parámetros fisicoquímicos como **1.)** El patrón de difracción de Rayos X en mono cristal, que es específico de cada polimorfo **y/o 2.)** El patrón de difracción de Rayos X en polvo (DRXP), el cual debe presentar por lo menos 20 picos correspondientes a las intensidades de los haces difractados o a los espacios interplanares $dhkl$ según los índices de Miller (hkl) medidos de acuerdo con el Angulo de difracción de Bragg 2θ en el intervalo más representativo comprendido entre 5° hasta 90° . **y/o 3.)** Las espectroscopias Raman e IR. **y/o 4.)** La espectroscopia RMN-C **y/o 5.)** Los métodos de análisis térmico: TGA, DTA y DSC. Se sugiere al solicitante incluirla dentro de alcance del capítulo reivindicatorio. Lo anterior no supone ampliación de la solicitud ya que se encuentra divulgado en la descripción inicial."

"La reivindicación 9 no está sustentada en la descripción porque en ella se reclama (...) un producto de combinación que comprende: (A) un compuesto de la fórmula (I) de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7; y (B) otro agente terapéutico...", sin embargo en el capítulo descriptivo no existen ejemplos de un producto de combinación."

Respecto al anterior señalamiento, me permito resaltar que, tal y como se mencionó en el numeral 3 del presente memorial, las reivindicaciones 4, 6 y 9 han sido eliminadas del capítulo reivindicatorio modificado. Por lo tanto, amablemente solicito que la objeción a este respecto sea retirada.

Con base en lo anterior, me permito resaltar que teniendo en cuenta las modificaciones hechas al capítulo reivindicatorio, el nuevo capítulo reivindicatorio presenta información puntual y limitada que define la presente invención además de estar plenamente soportada por la memoria descriptiva de esta aplicación.

Además de lo anterior, me permito manifestar dicho nuevo capítulo reivindicatorio define de manera precisa las características de un compuesto de la fórmula (I), mencionando los picos representativos del patrón de difracción de Rayos X de la forma sólida cristalina aquí reclamada.

En vista de lo anterior, resulta evidente que la materia reclamada es clara y concisa y que además las reivindicaciones ahora presentadas en el nuevo capítulo reivindicatorio incorporan elementos esenciales que deben ser tomados en consideración al realizar la evaluación de la solicitud. Por todo lo anterior, amablemente me permito solicitar a ese Despacho que las objeciones a este respecto sean retiradas.

5. NIVEL INVENTIVO.

Finalmente, el Señor Examinador considera que la materia reclamada en las reivindicaciones 1, 8 y reivindicaciones dependientes carecerían de altura inventiva con respecto a las enseñanzas de los documentos **MX2011006219 (D1)** y **WO2003072569 (D2)**.

En conexión con lo anterior, el Señor Examinador establece que el documento D1 se considera el estado de la técnica cercano a la materia reclamada definida en las reivindicaciones 1 y 8 porque divulga compuestos derivados de la N-(4-(4-(3-(3-terc-butil-1-p-tolil-1H-pirazol-5-ilureido)naftalen-1-iloxi)pirimidin-2-il)-amida inhibidores de las cinasas activadas por nitrógeno p38 subtipos alfa y gamma, el TNF- α y la ICAM1 (Págs. 199 a 205, Ejs. 65 a 70, documento D1), y composiciones farmacéuticas de dicho compuesto ((Pág. 235, reivindicación 15, Documento D1).

Así entonces, el Señor Examinador establece que la diferencia entre la materia reclamada, definida en las reivindicaciones 1 y 8 y los compuestos y composiciones farmacéuticas divulgados en el documento D1 consiste en que la solicitud define que el principio activo en las composiciones farmacéuticas presenta como sustituyente en la posición 2 del anillo pirimidínico corresponde a un grupo fenilamina mientras que el documento D1 revela un grupo carbamoilo sustituido.

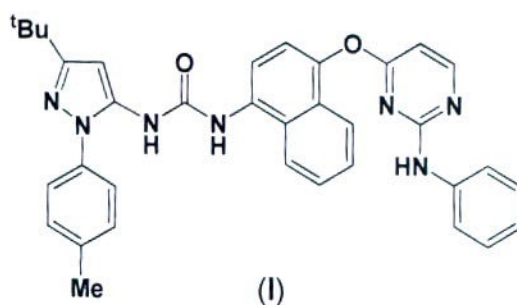
Por lo tanto, el Señor Examinador afirma que el efecto que logra el remplazar el sustituyente en la posición 2 de anillo pirimidínico de los derivados de la N-(4-(4-(3-(3-terc-butil-1-p-tolil-1H-pirazol-5-ilureido)naftalen-1-iloxi)pirimidin-2-il)-amina inhibidores de las cinasas activadas por nitrógeno p38 subtipos alfa y gamma es obtener compuestos inhibidores simultáneos de las quinasas p38 MAPK α , c-Src, Syk sin que presente actividad en contra GSK3 α .

Sin embargo, el Señor Examinador manifiesta que el documento D2 divulga compuestos derivados de la N-(4-(4-(3-(3-tercbutil-1-p-tolil-1H-pirazol-5-ilureido)naftalen-1-iloxi)pirimidin-2-il)-amina y composiciones farmacéuticas que comprenden este compuesto, que presentan actividad inhibitoria contra el TNF- α y la IL-1, de donde una persona del oficio normalmente versada en la materia concluiría sin dificultad que los derivados de la N-(4-(4-(3-(3-terc-butil-1-p-tolil-1H-pirazol-5-ilureido)naftalen-1-iloxi)pirimidin-2-il)-amina independiente del sustituyente en la posición 2 de anillo pirimidínico son inhibidores simultáneos de las cinasas p38 MAPK α , c-Src, Syk sin que presente actividad en contra de GSK3 α .

Consecuentemente, el Señor examinador acierta que la persona normalmente versada en la técnica se sentiría motivada en remplazar el principio activo en las composiciones divulgadas en el documento D1 por un principio activo caracterizado porque presenta un átomo de nitrógeno no sustituido en la posición 3 del anillo pirazolo[4,3-d]pirimidina de los compuestos divulgados en el documento D1 para obtener inhibidores simultáneos de las cinasas p38 MAPK α , c-Src, Syk sin que presente actividad en contra de GSK3 α de la manera que lo sugiere el documento D2 y de esta manera llegar así al objeto de las reivindicaciones 1 y 8 de la solicitud. Por lo cual se consideran obvias.

En conexión con el anterior señalamiento, el Señor Examinador de igual manera menciona que las reivindicaciones dependientes 2 a 7, no mencionan características inventivas adicionales, por lo que tampoco pueden ser consideradas inventivas.

En respuesta a lo anterior, me permito resaltar que el nuevo capítulo reivindicatorio se centra en reclamar compuestos de fórmula (I):



En conexión con lo anterior, me permito resaltar que como bien lo estableció el Señor Examinador, la diferencia entre el compuesto de fórmula (I) y los ejemplos 65-70 del documento D1 es que el compuesto I tiene un grupo fenilamino como sustituyente en la posición 2 del anillo de pirimidina, mientras que los compuestos divulgados en el documento D1 se caracterizan por tener un grupo NH-C(O)-Q en esta posición, donde Q hace referencia a un sustituyente específico.

Además de lo anterior, me permito resaltar que al igual que la anterior diferencia, el efecto de reemplazar un sustituyente en la posición 2 del anillo de pirimidina es que el compuesto (I) de la presente solicitud actúa como inhibidor de p38 MAPK α , c-Src y Syk cinasas pero no tiene actividad contra GSK3 α . Asimismo, me permito manifestar que la actividad inhibidora GSK3 α es un factor significativo que aumenta la probabilidad de que un inhibidor de cinasa promueva la formación de micronúcleos.

Por lo tanto, me permito resaltar que con base en los datos contenidos en la página 69 del documento D2, los compuestos de los Ejemplos 6 y 9, inhiben la producción de TNF en células THP1 con un valor de IC_{50} de menos de $10\mu\text{M}$.

Además de esto, me permito resaltar que la diferencia estructural entre los compuestos de esta anterioridad y el compuesto de la presente invención es que el anillo de pirimidina de los Ejemplos 6 y 9 del documento D2 está sustituido con un grupo alquilamina sustituido, mientras que el anillo de pirimidina del compuesto de la presente invención está sustituido con un grupo anilina (N -fenil).

Así entonces, me permito manifestar que con el fin de demostrar que esta sustitución de anilina no es una selección arbitraria, anexo al presente memorial se encuentra la traducción simple al castellano del Reporte experimental desarrollado por el solicitante de la presente invención en relación con el análisis comparativo realizado frente a las enseñanzas del documento D2, donde dicho documento está dirigido a un estudio comparativo de las propiedades del compuesto reivindicado ("compuesto I") con los compuestos de los Ejemplos 6 y 9 del documento D2 ("compuesto 2" y "compuesto 3"), así como con 1-(5-tert-butil-2-p-tolil-2H-pirazol-3-il)-3-(4-{2-[(tiofen-2-ilmetil)-amino]-pirimidin-4-iloxi}-naftaleno-1-il)-urea ("Compuesto 4"), que se muestra en la tabla en la página 24 del documento D2 y que tiene la siguiente estructura:

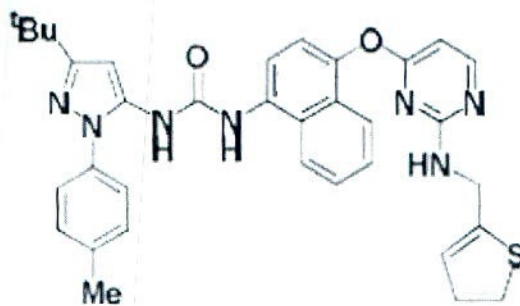


Figura 1. Compuesto 4 del documento D2

Teniendo en cuenta lo anterior, amablemente me dirijo al Señor Examinador en que las conclusiones del reporte establecen lo siguiente:

"Los resultados presentados en este documento demuestran que, de los cuatro compuestos estudiados, sólo la aminopirimidina sustituida por N-fenilo de la presente invención, el compuesto 1, inhibió la actividad de la quinasa Syk en un grado medible. El derivado tetrahidrofurano descrito anteriormente, el compuesto 3 demostró ser aproximadamente 5-10 veces más débil en su capacidad para inhibir la liberación inducida por LPS de IL-8 a partir de células U937 de tipo macrófagos diferenciadas con PMA, en comparación con los compuestos 1, 2 y 4. Sin embargo, el compuesto de la presente invención, el compuesto 1, fue el único mostrar actividades inhibitoras potentes y dependientes de dosis contra los CPE inducidos por rinovirus en células MRC5, y en contra de la liberación de especies reactivas de oxígeno inducida por zimosan a partir de células U937 tratadas previamente con IFN γ . Estas características diferenciadoras del perfil celular de compuesto 1 son altamente significativas en el contexto de la intervención de la enfermedad en condiciones inflamatorias."

Así entonces, me permito manifestar q ese Despacho que los resultados presentados en el informe muestran que, contrario a la afirmación del Señor Examinador, no todos los derivados de N-(4- (4- (3- (3-terc-butil-1-p-tolil-1H-pirazol-5- ilureido) naftalen-1-iloxi) pirimidin-2-il) -amina son inhibidores de la MAPKa p38, c-Src y Syk cinasas.

Por lo mismo, me permito manifestar que el sustituyente anilina del compuesto I de la presente invención conduce a la inhibición significativamente más potente de la quinasa Syk y, además, el compuesto I se caracteriza por tener mejoradas propiedades anti-inflamatorias, así como un efecto adicional de inhibir los efectos citopáticos de rinovirus humano en comparación con los compuestos divulgados por la anterioridad D2.

Por lo tanto, me permito resaltar que teniendo en cuenta las propiedades claramente mejoradas del compuesto I de la presente invención en relación con los compuestos 2, 3 y 4 es claro que la presente invención es inventiva.

Finalmente, me permito sintetizar los anteriores argumentos en:

- ❖ Los compuestos del documento D1 exhiben actividad inhibidora contra p38 MAPK α , c-Src y Syk quinasas y también contra GSK3 α quinasa.
- ❖ Los compuestos del documento D2 exhiben actividad inhibidora contra p38 MAPK α y c-Src quinasa, pero no contra Syk quinasa.
- ❖ Ninguna combinación de las anterioridades D1 y D2 permitiría a la persona experta en la materia obtener un compuesto que muestra actividad inhibidora contra p38 MAPK α , c-Src y Syk quinasas pero no contra GSK3 α quinasa.

Visto lo anterior, es absolutamente evidente que una persona normalmente versada en la materia **no se sentiría motivada a combinar las enseñanzas del documento D1 con las divulgadas por el documento D2 para obtener compuestos y composiciones farmacéuticas tal y como se presentan en esta solicitud.**

En consecuencia, atentamente me permito manifestar ante ese Despacho que la materia del nuevo capítulo reivindicatorio y sus respectivas reivindicaciones dependientes presentan un inequívoco carácter inventivo frente a las enseñanzas de los documentos D1 y D2, cumpliendo por lo tanto a cabalidad con los requisitos de patentabilidad establecidos en el artículo 18 de la Decisión 486 de 2000.

6. **CONCLUSIÓN**

Para finalizar, me permito reiterar que el capítulo reivindicatorio modificado presentado junto con este memorial es totalmente claro y conciso al definir compuestos 1-pirazolil-3-(4-((2-anilinopirimidin-4-il)oxi)naftalen-1-il) ureas como inhibidores de P38 MAP cinasa y están plenamente soportados dentro del texto de la descripción, cumpliendo así con lo exigido por la mencionada Decisión Andina 486 de 2000.

Por otro lado, en virtud de los argumentos discutidos con respecto a los documentos citados, se estableció de manera incontrovertible que los compuestos 1-pirazolil-3-(4-((2-anilinopirimidin-4-il)oxi)naftalen-1-il) ureas como inhibidores de P38 MAP cinasa, lo cual es objeto de la solicitud en estudio, no puede ser anticipado y de ninguna manera resultaría evidente a partir de las enseñanzas de los documentos D1 y D2, demostrando irrefutablemente la patentabilidad de la presente solicitud.

7. Anexo al presente memorial, me permito presentar:

- i) Copia de las páginas **64** y **65** que corresponden al **capítulo reivindicatorio modificado**, tal como se discutió en el presente memorial, constituido por **6 reivindicaciones**; y
- ii) La traducción simple al castellano del Reporte experimental desarrollado por el solicitante de la presente invención en relación con el análisis comparativo realizado frente a las enseñanzas del documento D2.

8. En vista de lo anterior, ruego a usted proceder a estudiar nuevamente la solicitud a la luz de las modificaciones y los argumentos presentados y conceder el privilegio de patente solicitado.

Señor Superintendente,

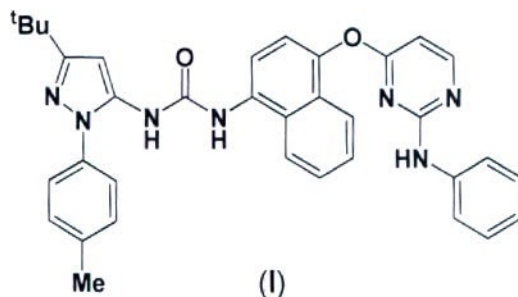


ALICIA LLOREDA RICAURTE

T.P. 53.215

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la fórmula (I)



- o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, incluyendo todos los estereoisómeros y tautómeros del mismo.
2. El compuesto de conformidad con la reivindicación 1, como la base libre.
3. El compuesto de conformidad con la reivindicación 2, como la base libre anhidra en forma sólida cristalina.
4. El compuesto de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado además porque el compuesto de la fórmula (I) como la base libre anhidra está en forma sólida cristalina que tiene un patrón de difracción de rayos X de polvo que contiene uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete picos seleccionados entre ($\pm$ 0.2) 10.3, 15.2, 17.5, 23.1, 24.6, 26.7 y 27.4 grados 2-theta.
5. El compuesto de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado además porque el compuesto de la fórmula (I) como la base libre anhidra está en forma sólida cristalina que tiene un patrón de difracción de rayos X de polvo que contiene uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho picos todos seleccionados entre ($\pm$ 0.2) 3.9, 6.1, 11.8, 14.3, 16.7, 18.3, 18.7 y 28.9 grados 2-theta.

6. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en combinación con uno o más diluyentes o portadores farmacéuticamente aceptables.

Respuesta a la Oposición presentada por Lafrancol SA - Informe comparativo

El perfil farmacológico del inhibidor de molécula pequeña de la presente invención¹, el compuesto 1 ha sido comparado en una serie de en ensayos in vitro relevantes a la enfermedad, con tres compuestos, se habían descrito anteriormente los compuestos 2-4 (Tabla 1)². La característica estructural de diferenciación del compuesto 1 a partir de estas moléculas más cercanas del arte previo es la incorporación de una anilina (N-fenil) en lugar de un grupo alquilamino sustituido, unido al C-2 del núcleo de pirimidina. Los resultados obtenidos demuestran claramente que los compuestos 2-4 poseen un perfil biológico común que es claramente diferente de aquel del compuesto 1.

Tabla 1:

Compuesto	Estructura	Nombre
1		1-(3-(tert-butil)-1-(p-tolil)-1H-pirazol-5-il)-3-((-4-(2-(fenilamino)pirimidin-4-iloxi)-1-naftalen-il)urea
2		1-(3-tert-butil-1-p-tolil-1H-pirazol-5-il)-3-((-4-(2-(ciclopropilmetilamino)pirimidin-4-iloxi)-1-naftalen-il)urea ³ .
3		1-(3-tert-butil-1-p-tolil-1H-pirazol-5-il)-3-((-4-(2-(((tetra hidrofurano-2-il) metil)amino)pirimidin-4-iloxi)-1-naftalen-il)urea ^{4,5} .
4		1-(3-tert-butil-1-p-tolil-1H-pirazol-5-il)-3-((-4-(2-(tiofen-2-ilmetilamino)pirimidin-4-iloxi)-1-naftalen-il)urea ⁶

Métodos biológicos de detección utilizados en el estudio actual

1: *Ensayos de inhibición de la Quinasa*

Los efectos inhibidores de los compuestos **1-4** en las actividades enzimáticas p38 MAPK α , cSrc y Syk se determinó utilizando los protocolos establecidos en la presente revelación¹. El porcentaje de inhibición para cada concentración se midió en relación con el control no inhibido y el 50% de las concentraciones inhibitorias (valores IC₅₀) se calculó a partir de las curvas de concentración-respuesta.

2: *Liberación de IL-8 inducida por LPS a partir de células U937 de tipo macrófago diferenciadas con PMA*

La influencia de los compuestos **1-4** en la liberación inducida de IL-8 por LPS a partir de células U937 diferenciadas con PMA se determinó utilizando los protocolos establecidos en la presente revelación¹. El porcentaje de inhibición de la liberación de IL-8 para cada concentración se determinó en relación al control no inhibido y el 50% de las concentraciones inhibitorias (valores IC₅₀) se calculó a partir de las curvas de concentración-respuesta.

3: *CPE inducidos por rinovirus en células MRC5.*

Se realizó una evaluación de la influencia de cada uno de los compuestos de prueba sobre los efectos citopáticos (CPE, por sus siglas en inglés) de la cepa 16 de rinovirus humano en células de fibroblastos de pulmón fetal humano MRC5, utilizando los protocolos establecidos en la presente descripción¹. El porcentaje de inhibición de CPE para cada concentración de compuesto de prueba se determinó en relación con el control no inhibido y el 50% de las concentraciones inhibitorias (valores IC₅₀) se calculó a partir de las curvas de concentración-respuesta cuando aplique. Todos los valores se muestran como la media de dos experimentos independientes.

4: *Liberación inducida por Zimosan A de especies reactivas de oxígeno (ROS) en células U937 pre tratadas con IFN γ .*

Se investigó la influencia de los compuestos 1-4 en la liberación inducida por Zimosan A de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) en células U937 pre tratadas con interferón gamma humano (IFN γ). Las células U937, una línea celular de linfoma de monocitos leucémicas humanas (ATCC, Manassas, VA), se trataron con IFN γ a una concentración final de 50 ng/mL a 37°C, bajo 5% de CO₂ durante 4 días.

Las células U937 cebadas con IFN γ se sembraron a $0,2 \times 10^6$ células/200 μ l/pozo en una placa blanca de 96 pozos, y se trataron con compuestos de ensayo durante 2 horas en RPMI 1640 (libre de rojo fenol, Life Technologies, Paisley, Reino Unido) con suero bovino fetal al 0,5%. Se suspendió nuevamente el Zimosan A (10 mg, Sigma-Aldrich Ltd, Poole, Reino Unido) de *Saccharomyces cerevisiae* en 150 mM de NaCl (1 ml) y se hirvió a 100°C durante 15 minutos. Después de la ebullición, las partículas de Zimosan A se lavaron dos veces con tampón fosfato salino de Dulbecco (DPBS) tibio (1 ml) seguido de centrifugación, y se incubaron con reactivo opsonizado BioParticlesTM (0,5 ml, Life Technologies, Paisley, Reino Unido) durante 60 min a 37°C, mientras se rotaba en un mezclador de muestras HulaMixerTM.

Después de la incubación, el Zimosan A opsonizado se lavó dos veces con DPBS tibio (1 ml), y se suspendieron nuevamente en 150 mM de NaCl (1 ml). Después, se estimularon las células con una mezcla de suspensión de partículas de Zimosan A (10 μ l), tampón de ensayo (85 l), luminol (2,5 μ l) y solución de potenciador (2,5 μ l), que eran proporcionados (aparte de la suspensión de partículas Zimosan A) en el Kit de ensayo de Anión Superóxido (Sigma-Aldrich Ltd, Poole, Reino Unido). Las placas fueron dejadas a temperatura ambiente y se midieron los niveles de quimioluminiscencia (indicando los aniones de superóxido liberado) a los 60 minutos después de la estimulación por la medición luminométrica (Varioskan® Flash, Thermo-Fisher Scientific). El porcentaje de inhibición de la liberación de ERO para cada concentración de ensayo se determinó en relación con el control no inhibido. Todos los valores se mostraron como la media $\pm$ error estándar de la media (SEM, por sus siglas en inglés) de tres experimentos independientes.

Resumen de los Resultados de la Evaluación

1: Inhibición de Quinasas

Los perfiles de las enzimas aisladas presentadas a continuación (**Tabla 2**) demuestran que las cuatro sustancias de prueba inhiben la actividad de ambas quinasas p38, MAPK α y CSRC en concentraciones nanomolares. Sin embargo, el compuesto **1** de la presente invención fue único al mostrar una actividad inhibitoria significativa frente a la quinasa Syk. Las consecuencias de esta farmacología adicional son evidentes en el perfil celular del compuesto **1** que figura a continuación, y en última instancia lo diferencia de los inhibidores conocidos de la quinasa 2-4.

Tabla 2: Comparación de las actividades inhibitoras de los compuestos 1-4 en enzimas p38 MAPKα, Src y Syk.

Compuesto de Prueba	Valores de IC ₅₀ para la Inhibición de la Enzima (nM)		
	p38 MAPKα	cSrc	Syk
1	60	22	334
2	55	180	>1780
3	16	110	>1690
4	18	136	>1660

2: Liberación de IL-8 inducida por LPS de células U937 diferenciadas de tipo macrófago

Los datos celulares resumidos a continuación (**Tabla 3**), revelan que los cuatro compuestos (examinados el mismo día) fueron capaces de inhibir la liberación de IL-8 inducido por LPS de células U937 diferenciadas (d). Sin embargo, el efecto inhibitor del derivado tetrahidrofuranilo **3** fue marcadamente inferior a los observados para el compuesto de la presente invención o los análogos de ciclopropil o tiofenil, respectivamente **2** y **4**, reportados anteriormente.

Tabla 3: Comparación de los efectos inhibitorios de los Compuestos 1-4 sobre la liberación de IL-8 estimulada por LPS de células d-U937.

	Compuesto de Prueba			
	1	2	3	4
Valor IC ₅₀ (nM)	2.2	0.53	14.2	0.93

3: CPE inducidos por Rinovirus en células MRC5.

Los resultados de un estudio de los efectos citopáticos (CPE) inducidos por infección con rinovirus humano 16 (HRV 16) se presentan más adelante (**Tabla 4**). Se hizo comparación de los efectos del tratamiento con los cuatro compuestos de prueba en células MR5, una línea celular de fibroblasto de pulmón fetal, sobre CPE mediados viralmente, en dos experimentos independientes. Estos revelaron que solo la anilino pirimidina de la presente invención, compuesto **1**, fue un inhibidor efectivo de

esta respuesta mediada viralmente. En contraste con los agentes del arte previo, los compuestos **2-4** mostraron un bajo efecto sobre los CPE inducidos por infección con HRV16.

Tabla 4: Comparación de los efectos inhibitorios de los Compuestos 1-4 sobre los efectos citopáticos inducidos por infección con HRV16 en células MRC5.

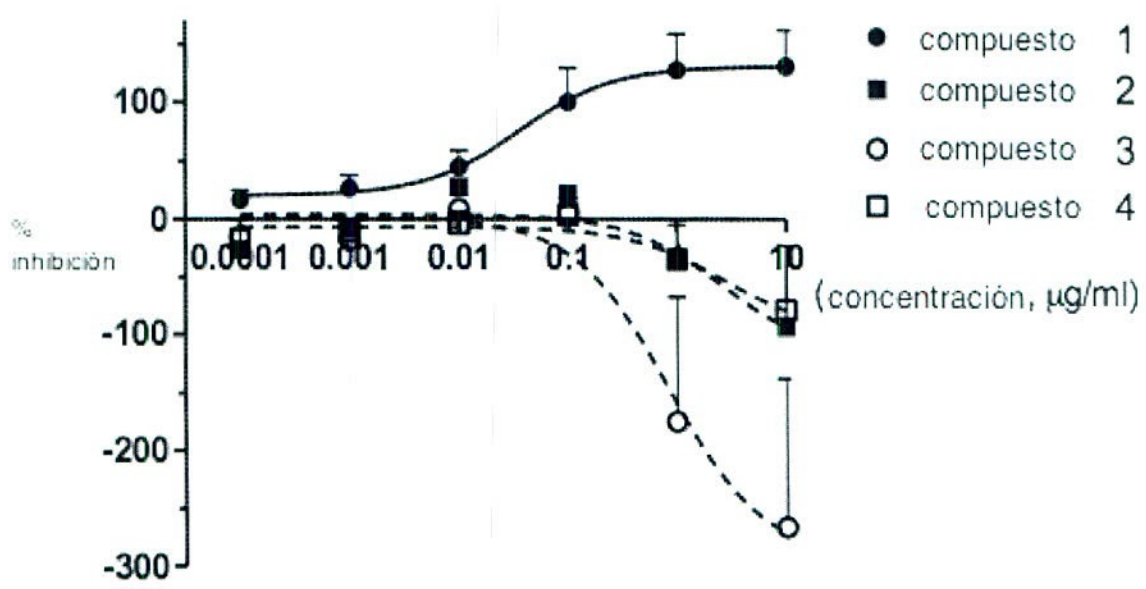
	Compuesto de Prueba				Dosis (ng/mL)
	1	2	3	4	
CPE por HRV (% Inhibición)	7.2	17.7	-40.8	9.7	0.32
	5.7	30.1	14.3	0.5	1.6
	60.0	26.4	19.3	41.0	8.0
	68.1	ND*	46.5	20.9	40
Valor IC₅₀(nM)	16.0	n/a	n/a	n/a	

*ND: No determinado debido a toxicidad celular, n/a: no aplicable

4: Liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) inducidas por Zimosan A de células U937 tratadas con IFN γ .

El estrés oxidativo es un componente fisiopatológico importante de enfermedades de las vías respiratorias tales como el asma y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), que causan morbilidad y mortalidad⁷ significativos. La liberación de especies reactivas de oxígeno es un mecanismo dependiente de quinasa Syk⁸. Los resultados de un estudio para comparar el efecto de las cuatro sustancias de prueba sobre la liberación inducida de ROS por zimosan a partir de células U937 tratadas previamente con IFN γ , en tres experimentos independientes, se presentan a continuación (**Figura 1**). Es claramente evidente que sólo la anilino pirimidina de la presente invención, el compuesto **1**, era un eficaz inhibidor de esta respuesta bioquímica. En contraste, los agentes del arte previo, los compuestos **2-4**, mostraron un bajo efecto o no mostraron efecto o exacerbaron la respuesta inflamatoria inducida.

Figura 1: Liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) inducida por Zimosan en células U937 tratadas con IFN γ .



Discusión y Conclusiones

Los resultados presentados en este documento demuestran que, de los cuatro compuestos estudiados, sólo la aminopirimidina sustituida por N-fenilo de la presente invención, el compuesto 1, inhibió la actividad de la quinasa Syk en un grado medible. El derivado tetrahidrofuranilo descrito anteriormente, el compuesto 3 demostró ser aproximadamente 5-10 veces más débil en su capacidad para inhibir la liberación inducida por LPS de IL-8 a partir de células U937 de tipo macrófagos diferenciadas con PMA, en comparación con los compuestos 1, 2 y 4. Sin embargo, el compuesto de la presente invención, el compuesto 1, fue el único mostrar actividades inhibitoras potentes y dependientes de dosis contra los CPE inducidos por rinovirus en células MRC5, y en contra de la liberación de especies reactivas de oxígeno inducida por zimosan a partir de células U937 tratadas previamente con IFN γ . Estas características diferenciadoras del perfil celular de compuesto 1 son altamente significativas en el contexto de la intervención de la enfermedad en condiciones inflamatorias.

Es de gran relevancia para el presente estudio que la literatura implica un papel para la señalización a través de quinasa Syk después de la exposición de las células a rinovirus⁹. Este también parece ser el caso para la liberación de especies reactivas del oxígeno desde los macrófagos⁸. El papel de la infección por rinovirus y de la producción de especies reactivas de oxígeno en las manifestaciones clínicas de las enfermedades respiratorias crónicas junto con las diferencias observadas para los perfiles farmacológicos de los compuestos de prueba comparados en el presente documento, proporcionan una fuerte evidencia de que el compuesto de la presente

invención, el compuesto **1**, tiene un perfil farmacológico distinto y superior como un fármaco anti-inflamatorio potencial frente a los compuestos de la técnica anterior, **2-4**.

Referencias y Notas:

1. Ito, K.; Charron, C.E.; King-Underwood, J.; Onions, S.T.; Longshaw, A.I.; Broeckx, R.; Filliers, W.; Copmans, A. 1-Pirazolyl-3-(4-((2-anilinopirimidin-4-il)oxi)naftalen-1-il) ureas as p38 MAP Kinase Inhibitors. PCT/GB2012/052445, WO 2013/050757, 2013.
2. Cirillo, P.F.; Regan, J.R.; Hammach, A. 1,4-Disubstituted Benzofused Cycloalkyl Urea Compounds Useful in Treating Cytokine Mediated Diseases. PCT/US03/07268, WO 03/072569, 2003. [**D2**]
3. Este compuesto se llama 1-(5-*tert*-butil-2-*p*-tolil-2*H*-pirazol-3-il)-3-{4-[2-(ciclopropilmetil-amino)-pirimidin-4-iloxi]naftalen-1-il}-urea en **D2** y es el Ejemplo 6 del documento y también el segundo compuesto listado de la página 24.
4. Este compuesto se llama: 1-(5-*tert*-butil-2-*p*-tolil-2*H*-pirazol-3-il)-3-(4-{2-[(tetrahydrofuran-2-ilmetil)-amino]-pirimidin-4-iloxi}-naftalen-1-il)-urea en **D2**. La preparación de los dos enantiómeros solos se describe en el Ejemplo 9 del documento.
5. El compuesto utilizado en el presente estudio se preparó como el racemato. Este es el tercer compuesto cotizada en la página 24 de la D1.
6. Este compuesto se llama: 1-(5-*tert*-butil-2-*p*-tolil-2*H*-pirazol-3-il)-3-(4-{2-[(tiofen-2-ilmetil)-amino]-pirimidin-4-iloxi}-naftalen-1-il)-urea en **D2**. Este es el cuarto compuesto listado en la página 24 de **D2**.
7. Chung, K.F.; Marwick, J.A. Molecular mechanisms of oxidative stress in airways and lungs with reference to asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2010**, *1203*, 85-91.
8. Underhill, D.M.; Rossnagle, E.; Lowell, C.A.; Simmons, R.M. Dectin-1 activates Syk tyrosine kinase in a dynamic subset of macrophages for reactive oxygen production. *Blood* **2005**, *106*, 2543-50.
9. Wang, X.; Lau, C.; Wiehler, S.; Pow, A.; Mazzulli, T.; Gutierrez, C.; Proud, D.; Chow, C.W.; Syk is downstream of intercellular adhesion molecule-1 and mediates human rhinovirus activation of p38 MAPK in airway epithelial cells. *J. Immunol.* **2006**;177, 6859-70.