

LLOREDA-CAMACHO & CO

Calle 72 No. 5-83 Piso 6, Bogotá, D.C. Tel: +57 (1) 3264270 - 6069700 Fax +57 (1) 6069701

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-062064- -00020-0000

Fecha: 2016-02-01 16:19:27 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 329 CTOINFORMACION Folios: 9

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

Trámite: 11
Evento: 379
Actuación: 329

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 Oficio No. 0273 dictado por ese Despacho y notificado por fijación en lista de Enero 26 de 2016.

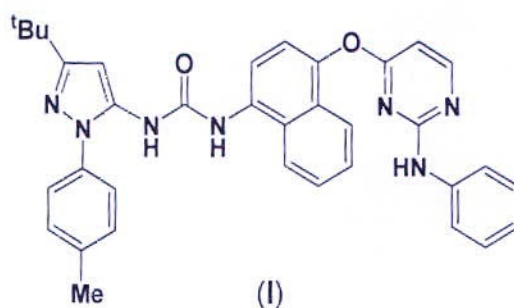
2. Con el fin de responder al **Recurso de Reposición** que contra la Resolución de Concesión No. **89865** para la solicitud antes referenciada presentó el Doctor Tito Noé Parra Murillo, en su calidad de apoderado de la sociedad Laboratorio Franco Colombiano S.A.S. **LAFRANCOL S.A.S.**, el pasado 12 de Enero de 2016, me permito dirigir su atención a los siguientes comentarios y argumentos técnicos por medio de los cuales no solo se desvirtúan las afirmaciones realizadas por el Opositor, sino que además se respalda la decisión de la Superintendencia de Industria y Comercio de otorgar patente de invención a la presente solicitud.

3. OBJETO DE LA SOLICITUD DE PATENTE CONCEDIDA.

De acuerdo con la Resolución **No. 89865**, dictada por el señor Superintendente de Industria y Comercio el 20 de Noviembre de 2015, y notificada mediante listado único de notificaciones de propiedad industrial del 24 de Noviembre de 2015, se otorgó el privilegio de patente solicitado para la invención contenida en el expediente de la referencia.

Respecto a la patentabilidad de la presente solicitud, el señor Superintendente reconoce en el punto Sexto de dicha Resolución que "(...) las reivindicaciones 1 a 6 cumplen los requisitos de novedad, nivel inventivo y aplicación industrial de que trata el artículo 14 de la Decisión 486, en consecuencia, este Despacho encuentra procedente conceder para la(s) misma(s) la patente solicitada".

En conexión con lo anterior, me permito resaltar que la patente concedida se refiere directa y exclusivamente a un compuesto de fórmula (I)



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, incluyendo todos los estereoisómeros y tautómeros del mismo, en donde en el capítulo reivindicatorio de la solicitud de patente concedida, se define claramente que la base libre anhidra se encuentra en forma sólida cristalina y que tiene un patrón de difracción de rayos X de polvo que contiene picos definidos.

En conexión con lo anterior, es pertinente resaltar que el compuesto de fórmula de (I) se caracteriza por presentar una alta inhibición de la familia de enzimas de proteínas cinasas activadas por mitógeno p38 (p38 MAP), quienes cumple un rol fundamental en muchas de las vías de señalización que están involucradas en la iniciación y el mantenimiento de la inflamación crónica y persistente en enfermedades humanas como el asma grave y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD).

Dicha alta inhibición se evidencia en las páginas 49 a 63 de la memoria descriptiva de la presente solicitud, en donde se revelan ensayos que demuestran la efectividad del compuesto de fórmula (I) de la invención como inhibidores de p38 MAP cinasa.

Adicionalmente, es pertinente resaltar que el compuesto de fórmula (I) exhibe una mayor duración de acción y/o persistencia de acción en comparación con otros inhibidores de la p38 MAP cinasa divulgados anteriormente tales como, por ejemplo, BIRB796.

Teniendo en cuenta las anteriores consideraciones, entonces es claro que la patente otorgada proporciona novedosos compuestos de fórmula I, los cuales inhiben exclusivamente la familia de enzimas de proteínas cinasas activadas por mitógeno p38, y por lo tanto son efectivos en el tratamiento de un grupo de trastornos y anomalías asociadas con dichas cinasas.

4. **RESPUESTA A LOS ARGUMENTOS Y RAZONES DE INCONFORMIDAD DEL OPOSITOR FRENTE A LA CONCENSIÓN DE LA PRESENTE PATENTE DE INVENCIÓN.**

Ahora bien, con respecto al ya referenciado Recurso de Reposición, la lectura de dicho documento permite concluir que el Doctor Parra Murillo fundamenta su acción en una supuesta violación de la Decisión 486, afirmando en este sentido que: *"La Resolución 89865 de Noviembre 20 de 2015, que concede el privilegio de patente de invención solicitado para el capítulo reivindicatorio del expediente 14-062064 (...) viola flagrantemente la Decisión 486 si se tiene en cuenta que existían motivos suficientes para afectar los requisitos de novedad y nivel inventivo de la solicitud en mención"*.

Sobre tal afirmación, me permito manifestar que **el Opositor continúa realizando una interpretación errónea del objeto de la presente solicitud, y este hecho, sumado a su desconocimiento de la legislación y la práctica en materia de patentes, lo lleva a presentar objeciones que carecen completamente de fundamento.**

A continuación, me permito discutir los argumentos expuestos por el Doctor Parra Murillo, con el fin de comprobar que dichas objeciones son infundadas y que la decisión de otorgar el privilegio de patente es totalmente acertada y coherente:

- a) En su Recurso de Reposición contra la Resolución No. 89865, el Doctor Parra Murillo afirma que la Resolución comete un error al afirmar que la oposición presentada por su representada no muestra ningún tipo de argumento soportado técnicamente, ni desvirtúa la patentabilidad del objeto de estudio, declarándola infundada por cuanto, *"al momento de presentación del escrito de oposición se dejó en claro que para el presente caso nos encontramos frente a una combinación de compuestos, lo cual indudablemente afecta el requisito de nivel inventivo (...)"* (resaltado fuera del texto).

Frente a lo anterior, me permito resaltar que tal señalamiento es prueba fehaciente del desconocimiento que posee el Opositor con respecto al alcance de la patente otorgada, a la forma correcta de realizar el análisis de la novedad y nivel inventivo de una solicitud de patente, y en general a la legislación en patentes.

Al señalar que la solicitud se centra en una *"combinación de compuestos"*, **es claro que el Opositor desconoce el verdadero objeto de la invención, puesto que claramente la materia reivindicada se refiere a un compuesto de fórmula (I) con actividad inhibitoria de la p38 MAP cinasa, tal como lo muestran las reivindicaciones reconocidas como patentables por la Resolución No. 89865, y como se discutió en anterior numeral del presente memorial.**

Contrario a las afirmaciones del Opositor, la novedad y el nivel inventivo de la invención descrita en la presente aplicación se encuentran en el hecho de que los compuestos de fórmula I poseen una estructura particular que permiten la alta actividad inhibitoria atribuida y que no ha sido divulgada por ningún documento del estado de la técnica anterior. A su vez, es claro que tal efecto técnico sorprendente (*alta inhibición la p38 MAP cinasa*) no pudo haber sido anticipado por ningún documento del arte previo.

- b) Ahora, en segundo lugar, el Doctor Parra Murillo afirma que la patentabilidad de la solicitud en estudio se vería afectada a la luz de las enseñanzas de documentos del estado del arte "(...) *que fueron presentados inicialmente en el escrito de observación* (...). A saber, dichos documentos corresponden al documento de Publicación Internacional WO03072569.

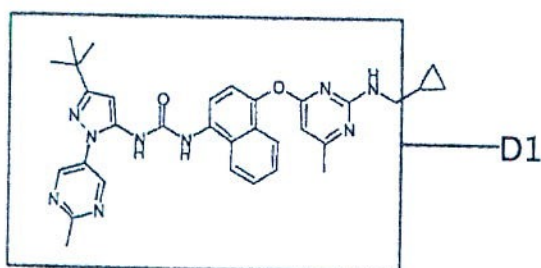
Sin embargo, **en su Recurso de Reposición el Opositor falla en presentar nuevos argumentos que sustenten la supuesta falta de novedad y nivel inventivo de la invención en vista de dicho documento, toda vez que las enseñanzas del mismo, de ninguna manera divulgan los compuestos de fórmula I de la invención con exactamente las mismas características técnicas estructurales ni tampoco pueden conducir o anticipar de manera obvia el objeto particular reclamado.**

La anterior afirmación es claramente soportada por el señor Examinador, quien en el punto Cuarto de la Resolución de Concesión No. 89865 reconoce que "(...) *si bien es cierto el documento WO03072569 revela 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 del TNF- α y la IL-1, no es menos cierto que no anticipa de forma específica el sustituyente N-fenilo en la posición 2 del anillo de pirimidina, además que no anticipa la actividad selectiva quinasa Syk y su actividad inhibitoria p38MPAK α y cSrc. En conclusión, el documento WO03072569 no desvirtúa los requisitos de patentabilidad de la solicitud.*"

A pesar de la anterior consideración, el Doctor Parra Murillo mantiene su objeción en contra de la presente solicitud pero no suministra argumento alguno en cuanto a cómo, a partir de la escasa divulgación del documento mencionado inicialmente por él, una persona versada en la materia podría tener alguna motivación para llegar al compuesto de fórmula I reivindicado. Al parecer, el Opositor no tiene en cuenta las claridades hechas por ese Despacho y pretende que se dé un "*análisis completo y a cabalidad sobre los siguientes documentos, los cuales sin lugar a dudas objetan la concesión en mención* (...)", sin siquiera proveer argumentos que contrarresten lo afirmado por el solicitante y por el señor Examinador.

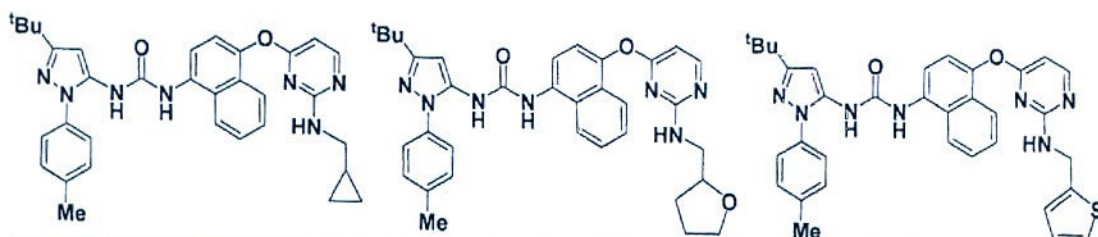
Ahora, con relación a los persistentes comentarios del Doctor Parra Murillo, me permito resaltar el compuesto de la presente invención se caracteriza porque presenta propiedades biológicas marcadamente diferentes a aquellas mencionadas en WO03072569.

Para demostrar lo anterior inicialmente me permito señalar que, contrario a lo aseverado por el señor Opositor, los compuestos divulgados en WO03072569 que se caracterizan estructuralmente porque la posición 2 del anillo de pirimidina está sustituida con un grupo amino, como el siguiente:



no corresponderían a los compuestos estructuralmente más cercanos al compuesto de la presente invención y que son explícitamente divulgados en dicha anterioridad.

En efecto, los siguientes tres compuestos químicos divulgados en la página 24 del documento WO03072569 resultarían estructuralmente más cercanos a aquel revelado en la presente invención:



Compuestos químicos revelados explícitamente en el documento WO03072569

En donde la diferencia estructural entre dichos compuestos y aquel revelado en la solicitud de patente en cuestión consiste en que el anillo de pirimidina de los tres compuestos explícitamente revelados en WO03072569 está sustituido con un grupo alquilamino sustituido, mientras que el anillo de pirimidina del compuesto de la presente invención está sustituido con el grupo anilina (N-fenilo).

Una vez aclarado lo anterior, atentamente me permito resaltar que en la página 69 del documento WO03072569, toda vez que de acuerdo con los datos experimentales allí divulgados el primer y segundo compuestos químicos arriba mencionados (los cuales son identificados en WO03072569 como compuestos preferidos de acuerdo con lo señalado en la página 34 de dicha anterioridad) inhiben la producción de TNF- α en células THP1 con un valor IC50 menor a 10 μ M.

Sin embargo, anexo al presente memorial me permito presentar un reporte experimental desarrollado por el solicitante de la presente invención y que corresponde a un estudio comparativo entre las propiedades del compuesto reivindicado en la presente invención (mencionado como compuesto 1) y los compuestos relevantes del documento WO03072569 (mencionados como compuestos 2, 3 y 4).

Tal y como podrá apreciar el señor Examinador, dicho reporte concluye lo siguiente (*copia simple al castellano*):

"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 en 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."

De esta manera, 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 el documento WO03072569.

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 del documento WO03072569, es claro que la presente invención es inventiva.

De esta manera, me permito señalar que los comentarios del Opositor son enunciados generales y opiniones acerca de cómo la Superintendencia de Industria y Comercio debería revisar los documentos referenciados con el fin de determinar si afectan la novedad y el nivel inventivo de la patente concedida. Frente a lo anterior, es preciso aclarar que **el Opositor no presenta argumentos concretos para afectar la patentabilidad de la presente invención ni tampoco discute el contenido general de las enseñanzas del documento de la anterioridad, a la luz de la respuesta del Examinador Técnico.**

Ahora, me permito resaltar que, como respuesta a las objeciones expuestas por el Señor Examinador en el Concepto Técnico correspondiente al Oficio No. 5269, el solicitante modificó el capítulo reivindicatorio y presentó argumentos técnicos contundentes que demostraron el inequívoco nivel inventivo de la presente solicitud. Atendiendo a las sugerencias del señor Examinador y evaluando sus comentarios, el solicitante estableció de manera incontrovertible que la combinación de las enseñanzas de los documentos del arte previo citados por ese Despacho de ninguna manera afecta el nivel inventivo de la presente invención.

Así las cosas, el señor Examinador reconoció que el objeto de la patente concedida no ha sido revelado de ninguna manera por el arte previo, y por lo tanto, la solicitud patentada cumple a cabalidad con lo exigido por los Artículos 14, 16 y 18 de la Decisión Andina 486 de 2000. Consecuentemente, me permito manifestar que resulta infundado el Recurso de Reposición que en este sentido presentó el Doctor Parra Murillo en contra de la patente concedida.

- c) Por otro lado, el Opositor también agrega que: *"puede observarse que la solicitud de la referencia pretende proteger mediante el derecho patentario objetos que no son considerados invenciones (...)"*, señalando posteriormente que por este hecho la solicitud carecería también de aplicación industrial, nivel inventivo y novedad.

En relación con lo anterior, me permito señalar nuevamente que claramente el Opositor mezcla conceptos distintos para realizar una objeción que carece totalmente de fundamento.

En este sentido me permito llamar la atención a ese Despacho sobre dos puntos importantes: el primero de ellos que una combinación farmacéutica si es considerada como una invención. El segundo, que no sería correcto afirmar de manera tajante que la solicitud **como un todo** carece de aplicación industrial, nivel inventivo y novedad, si se tienen reivindicaciones que se refieren por ejemplo a un compuesto de fórmula I y sus formas como la base libre anhidra que se encuentra en forma cristalina y una composición farmacéutica que los comprenden. Este es el caso de la solicitud en estudio, toda vez que el objeto principal de la invención es claramente un producto aplicable en la industria farmacéutica, novedoso e inventivo como se demostró en los puntos anteriores.

- d) Por otra parte, *"en caso que ese Despacho decidiera insistir en el cabal cumplimiento de los requisitos exigidos para acceder al beneficio de patente"*, el Opositor incluye copia del International Search Report y el respectivo Written Opinion of the International Searching Authority, documentos que él considera que *"resaltan que la presente invención no cumple con los requisitos de novedad y nivel inventivo por cuanto existen documentos citados del estado del arte que afectan de manera definitiva tales exigencias"*.

En lo que concierne al anterior señalamiento, no es correcto comparar el alcance de la materia incluida en la patente concedida con aquella presentada en la solicitud original, puesto que el capítulo reivindicatorio aceptado es el resultado de significativas restricciones en su alcance a lo largo del estudio de la solicitud y de conformidad con lo sugerido por el señor Examinador. Es así como, de 16 reivindicaciones originalmente presentadas, el último capítulo reivindicatorio presentado incluyó 6 reivindicaciones, las cuales representan una significativa restricción a las características técnicas esenciales (*estructurales y funcionales*) de un compuesto de fórmula I con actividad inhibitoria de p38 MAP cinasas.

Adicionalmente, me permito resaltar que al leer la categoría "Y" de la copia del International Search Report, los documentos WO2010/067130, WO2010/067131, WO2010/112936 y WO2011/070368, describen compuestos que se caracterizan por presentar sustituyentes amida-alquilo o amida-heterociclilo como sustituyentes en la posición relevante.

Por lo tanto, las objeciones realizadas por la Autoridad de Búsqueda Internacional no pueden ser aplicadas a las 6 reivindicaciones aceptadas, las cuales cumplen con los requerimientos de claridad, concisión, novedad y nivel inventivo, reconocidos por la Resolución No. 89865 de la Superintendencia de Industria y Comercio.

Como consecuencia de todos estos hechos, es evidente que la patente concedida se refiere a productos que sí son considerados invenciones, y que gozan de novedad, nivel inventivo y aplicación industrial, cumpliendo así las exigencias del Artículo 14 de la Decisión Andina 486. Por lo tanto, me permito manifestar que el Recurso de Reposición contra la Resolución de Concesión No. 89865 que presenta el Doctor Parra Murillo en este sentido es totalmente infundado.

5. CONCLUSIÓN.

Para finalizar, me permito resaltar que los argumentos anteriormente expuestos han demostrado de manera incontrovertible que el Recurso de Reposición por la sociedad opositora LAFRANCOL S.A.S., para desvirtuar la decisión de ese Despacho, carece totalmente de fundamento y que las objeciones presentadas en dicho escrito son totalmente infundadas.

La falta de argumentos demostró claramente que el Opositor de manera general señala una supuesta falta de novedad, nivel inventivo y aplicación industrial de la patente concedida, pero falla en proveer una argumentación sólida y pruebas fehacientes que sustenten tales afirmaciones.

En este sentido, se estableció que el objeto de la invención es un compuesto de fórmula (I), el cual no han sido de ninguna manera revelado y tampoco es derivable de forma obvia a partir del arte previo, y claramente es considerado como una invención.

Aunado a lo anterior, se comprobó el desconocimiento que posee el Opositor del alcance de la patente concedida y se resaltó el objeto primordial de la materia reclamada, demostrando así el inequívoco carácter novedoso e inventivo de la presente solicitud.

6. Anexo al presente memorial, me permito presentar:

i) 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 WO03072569.

7. En vista de todo lo anterior, ruego a usted declarar infundado el Recurso de Reposición de la sociedad **LAFRANCOL S.A.S.** y ratificar la Resolución de Concesión No. **89865**, manteniendo así la decisión de otorgar el privilegio de patente a la presente solicitud.

Señor Superintendente,



ALICIA LLOREDA RICAURTE

T. P. 53.215

Solicitud de Patente Colombiana No. 14-062.064 a nombre de Respivert Limited

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 BioParticles™ (0,5 ml, Life Technologies, Paisley, Reino Unido) durante 60 min a 37°C, mientras se rotaba en un mezclador de muestras HulaMixer™.

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 inhibidoras de los compuestos 1-4 en enzimas p38 MAPK α , Src y Syk.

Compuesto de Prueba	Valores de IC ₅₀ para la Inhibición de la Enzima (nM)		
	p38 MAPK α	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 inhibidor del derivado tetrahidrofurano **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.

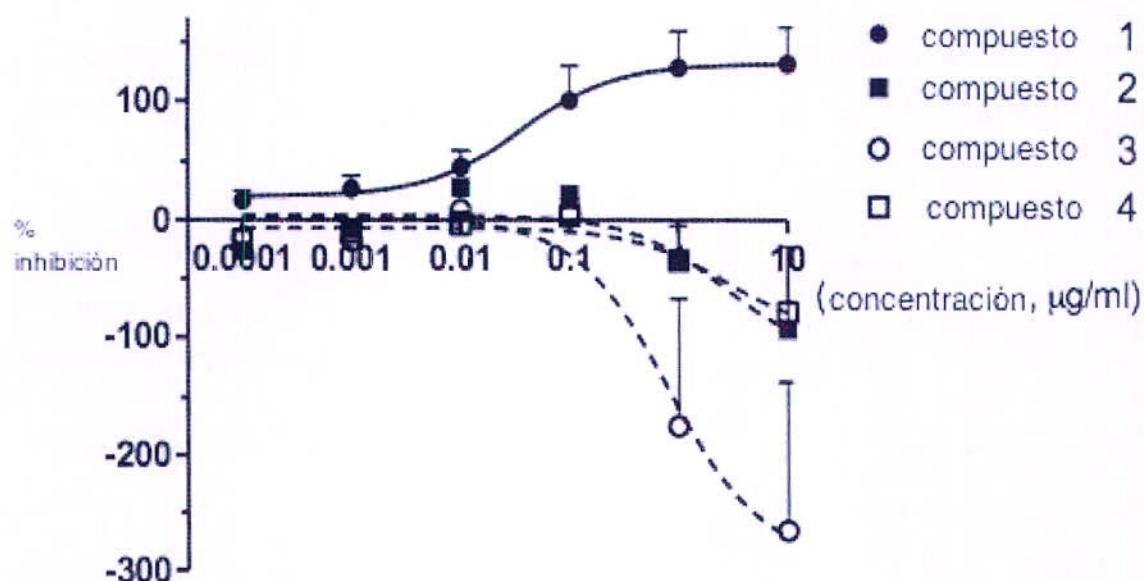
	Compuesto de Prueba				Dosis (ng/mL)
	1	2	3	4	
	7.2	17.7	-40.8	9.7	0.32
CPE por HRV	5.7	30.1	14.3	0.5	1.6
(% Inhibición)	60.0	26.4	19.3	41.0	8.0
	68.1	ND*	46.5	20.9	40
Valor IC₅₀(nM)	16.0	n/a	n/a	n/a	

*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 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.

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.