

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 380 550**

51 Int. Cl.:
C07D 413/12 (2006.01)
C07D 413/14 (2006.01)
A61K 31/5386 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05857021 .9**
96 Fecha de presentación: **23.11.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1814878**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.08.2007**

54 Título: **Compuestos de espiro-2,4-pirimidindiamina y sus usos**

30 Prioridad:
24.11.2004 US 630808 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.05.2012

73 Titular/es:
RIGEL PHARMACEUTICALS, INC.
1180 VETERANS BOULEVARD
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080, US

72 Inventor/es:
COOPER, Robin;
SINGH, Rajinder y
CLOUGH, Jeffrey

74 Agente/Representante:
Linage González, Rafael

ES 2 380 550 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Compuestos de espiro-2,4-pirimidindiamina y sus usos

5 **1. Referencia cruzada a solicitudes relacionadas**

Esta solicitud reivindica el beneficio en virtud de la disposición 35 U.S.C. § 119(e) de la solicitud con número de serie 60/630.808, presentada el 24 de noviembre de 2004.

10 **2. Campo**

La presente invención se refiere de manera general a compuestos de espiro-2,4-pirimidindiamina, composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos, productos intermedios y métodos sintéticos de preparación de los compuestos y los compuestos y composiciones para su uso en una variedad de contextos, tales como en el tratamiento o la prevención de enfermedades autoinmunitarias y/o los síntomas asociados con las mismas.

15 **3. Antecedentes**

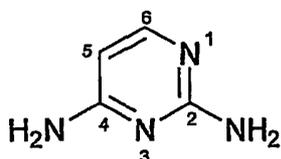
La reticulación de receptores de Fc, tales como el receptor de alta afinidad para IgE (FcεRI) y/o el receptor de alta afinidad para IgG (FcγRI), activa una cascada de señalización en mastocitos, basófilos y otras células inmunitarias que da como resultado la liberación de mediadores químicos responsables de numerosos acontecimientos adversos. Por ejemplo, tal reticulación conduce a la liberación de mediadores formados previamente de reacciones de hipersensibilidad anafilácticas de tipo I (inmediatas), tales como histamina, a partir de sitios de almacenamiento en gránulos a través de desgranulación. También conduce a la síntesis y liberación de otros mediadores, incluyendo leucotrienos, prostaglandinas y factores activadores de plaquetas (PAF), que desempeñan importantes papeles en reacciones inflamatorias. Los mediadores adicionales que se sintetizan y se liberan tras la reticulación de receptores de Fc incluyen citocinas y óxido nítrico.

La(s) cascada(s) de señalización activada(s) por la reticulación de receptores de Fc tales como FcεRI y/o FcγRI comprende(n) un ensayo de proteínas celulares. Entre los propagadores de señales intracelulares más importantes están las tirosina cinasas. Y, una importante tirosina cinasa implicada en las rutas de transducción de señales asociadas con la reticulación de los receptores FcεRI y/o FcγRI, así como otras cascadas de transducción de señales, es la cinasa Syk (véase Valent *et al.*, 2002, Intl. J. Hematol. 75(4):257-362 para una revisión).

Puesto que los mediadores liberados como resultado de la reticulación de receptores FcεRI y FcγRI son responsables de, o desempeñan importantes papeles en, la manifestación de numerosos acontecimientos adversos, la disponibilidad de compuestos que puedan inhibir la(s) cascada(s) de señalización responsable(s) de su liberación sería altamente deseable. Además, debido al papel crítico que desempeña la cinasa Syk en estas y otras cascadas de señalización de receptores, la disponibilidad de compuestos que puedan inhibir la cinasa Syk también sería altamente deseable.

40 **4. Sumario**

En un aspecto, la presente invención proporciona compuestos de espiro-2,4-pirimidindiamina novedosos que, tal como se comentará en más detalle a continuación, tienen una miríada de actividades biológicas. Los compuestos comprenden generalmente un "núcleo" de 2,4-pirimidindiamina que tiene la siguiente estructura y la convención de numeración:

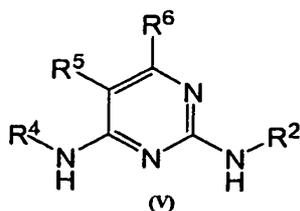


Los compuestos descritos en el presente documento están sustituidos en el nitrógeno de C2 (N2) y nitrógeno de C4 (N4) para formar dos aminas secundarias y opcionalmente están adicionalmente sustituidos en una o más de las siguientes posiciones: la posición C5 y/o la posición C6. El sustituyente en N2, así como los sustituyentes opcionales en las otras posiciones, distintas de N4, pueden oscilar ampliamente en carácter y propiedades fisicoquímicas, tal como se comentará en más detalle a continuación. El sustituyente en N4 contendrá un grupo espiro-heterocíclico tal como se describe más adelante.

Los sustituyentes en las posiciones N2, N4, C5 y/o C6, así como los ligadores opcionales, pueden estar adicionalmente sustituidos con uno o más de los grupos sustituyentes iguales o diferentes. La naturaleza de estos grupos sustituyentes puede variar ampliamente. Los ejemplos no limitativos de grupos sustituyentes adecuados

5 incluyen alquilos ramificados, de cadena lineal o cíclicos, arilos mono o policíclicos, heteroalquilos ramificados, de
 10 cadena lineal o cíclicos, heteroarilos mono o policíclicos, halos, haloalquilos ramificados, de cadena lineal o cíclicos,
 hidroxilos, oxos, tioxos, alcoxilos ramificados, de cadena lineal o cíclicos, haloalcoxilos ramificados, de cadena lineal
 o cíclicos, trifluorometoxilos, ariloxilos mono o policíclicos, heteroariloxilos mono o policíclicos, éteres, alcoholes,
 sulfuros, tioéteres, sulfanilos (tioles), iminas, azos, azidas, aminas (primarias, secundarias y terciarias), nitrilos
 (cualquier isómero), cianatos (cualquier isómero), tiocianatos (cualquier isómero), nitrosos, nitros, diazos, sulfóxidos,
 sulfonilos, ácidos sulfónicos, sulfamidas, sulfonamidas, ésteres sulfámicos, aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos,
 ésteres, amidas, amidinas, formadinas, aminoácidos, acetilenos, carbamatos, lactonas, lactamas, glucósidos,
 gluconuridos, sulfonas, cetales, acetales, tiocetales, oximas, ácidos oxámicos, ésteres oxámicos, etc., y
 combinaciones de estos grupos. Los grupos sustituyentes que portan funcionalidades reactivas pueden estar
 protegidos o no protegidos, tal como se conoce bien en la técnica.

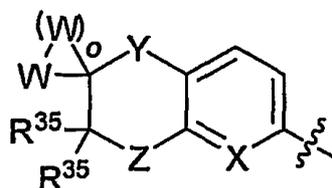
15 Los compuestos de espiro-2,4-pirimidindiamina descritos en el presente documento son compuestos según la
 fórmula estructural (V):



incluyendo sales, hidratos, solvatos y N-óxidos de los mismos, en los que:

20 R² se selecciona del grupo que consiste en arilo (C₅-C₁₅) opcionalmente sustituido con uno o más de los grupos R⁸
 iguales o diferentes (por ejemplo fenilo opcionalmente sustituido con uno o más de los grupos R⁸ iguales o
 diferentes) y heteroarilo de 5 a 15 miembros opcionalmente sustituido con uno o más de los grupos R⁸ iguales o
 diferentes;

25 R⁴ es



30 cada W es, independientemente del otro, -CR³¹R³¹-;

X se selecciona del grupo que consiste en -N- y -CH-;

35 Y y Z se seleccionan cada uno independientemente entre sí del grupo que consiste en -O-, -S-, -SO-, -SO₂-,
 -SONR³⁶-, -NH-, y -NR³⁵-;

40 R⁵ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, -OR^d, -SR^d, haloalquiloxilo (C₁-C₃), perhaloalquiloxilo (C₁-C₃),
 -NR^cR^c, halógeno, haloalquilo (C₁-C₃), perhaloalquilo (C₁-C₃), -CN, -NC, -OCN, -SCN, NO, NO₂, -N₃, -S(O)R^d,
 -S(O)₂R^d, -S(O)₂OR^d, -S(O)NR^cR^c; -S(O)₂NR^cR^c, -OS(O)R^d, -OS(O)₂R^d, -OS(O)₂OR^d, -OS(O)NR^cR^c, -OS(O)₂NR^cR^c,
 -C(O)R^d, -C(O)OR^d, -C(O)NR^cR^c, -C(NH)NR^cR^c, -OC(O)R^d, -SC(O)R^d, -OC(O)OR^d, -SC(O)OR^d, -OC(O)NR^cR^c,
 -SC(O)NR^cR^c, -OC(NH)NR^cR^c, -SC(NH)NR^cR^c, -[NHC(O)]_nR^d, -[NHC(O)]_nOR^d, -[NHC(O)]_nNR^cR^c y
 45 -[NHC(NH)]_nNR^cR^c, arilo (C₅-C₁₀) opcionalmente sustituido con uno o más de los grupos R⁸ iguales o diferentes (por
 ejemplo fenilo opcionalmente sustituido con uno o más de los grupos R⁸ iguales o diferentes), arilalquilo (C₆-C₁₆)
 opcionalmente sustituido con uno o más de los grupos R⁸ iguales o diferentes, heteroarilo de 5 a 10 miembros
 opcionalmente sustituido con uno o más de los grupos R⁸ iguales o diferentes y heteroarilalquilo de 6 a 16 miembros
 50 opcionalmente sustituido con uno o más de los grupos R⁸ iguales o diferentes, alquilo (C₁-C₆) opcionalmente
 sustituido con uno o más de los grupos R⁸ iguales o diferentes, alcanilo (C₁-C₄) opcionalmente sustituido con uno o
 más de los grupos R⁸ iguales o diferentes, alqueno (C₂-C₄) opcionalmente sustituido con uno o más de los grupos
 R⁸ iguales o diferentes y alquino (C₂-C₄) opcionalmente sustituido con uno o más de los grupos R⁸ iguales o
 diferentes;

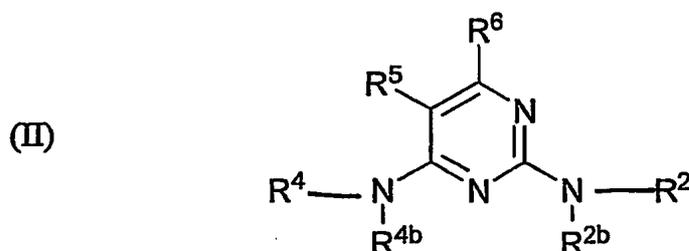
R⁶ se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, -OR^d, -SR^d, haloalquiloxilo (C₁-C₃),
 perhaloalquiloxilo (C₁-C₃), NR^cR^c, halógeno, haloalquilo (C₁-C₃), perhaloalquilo (C₁-C₃), -CN, -NC, -OCN, -SCN, -NO,

- NO₂, -N₃, -S(O)R^d, -S(O)₂R^d, -S(O)₂OR^d, -S(O)NR^cR^c; -S(O)₂NR^cR^c, -OS(O)R^d, -OS(O)₂R^d, -OS(O)₂OR^d, -OS(O)NR^cR^c, -OS(O)₂NR^cR^c, -C(O)R^d, -C(O)OR^d, -C(O)NR^cR^c, -C(NH)NR^cR^c, -OC(O)R^d, -SC(O)R^d, -OC(O)OR^d, -SC(O)OR^d, -OC(O)NR^cR^c, -SC(O)NR^cR^c, -OC(NH)NR^cR^c, -SC(NH)NR^cR^c, -[NHC(O)]_nR^d, -[NHC(O)]_nOR^d, -[NHC(O)]_nNR^cR^c y -[NHC(NH)]_nNR^cR^c, arilo (C₅-C₁₀) opcionalmente sustituido con uno o más de los grupos R^b iguales o diferentes (por ejemplo fenilo opcionalmente sustituido con uno o más de los grupos R^b iguales o diferentes), arilalquilo (C₆-C₁₆) opcionalmente sustituido con uno o más de los grupos R^b iguales o diferentes, heteroarilo de 5 a 10 miembros opcionalmente sustituido con uno o más de los grupos R^b iguales o diferentes y heteroarilalquilo de 6 a 16 miembros opcionalmente sustituido con uno o más de los grupos R^b iguales o diferentes;
- 10 R^b se selecciona del grupo que consiste en R^a, R^b, R^a sustituido con uno o más de R^a o R^b iguales o diferentes, -OR^a sustituido con uno o más de R^a o R^b iguales o diferentes, -B(OR^a)₂, -B(NR^cR^c)₂, -(CH₂)_m-R^b, -(CHR^a)_m-R^b, -O-(CH₂)_m-R^b, -S-(CH₂)_m-R^b, -O-CHR^aR^b, -O-CR^a(R^b)₂, -O-(CHR^a)_m-R^b, -O-(CH₂)_m-CH[(CH₂)_m-R^b]₂, -S-(CHR^a)_m-R^b, -C(O)NH-(CH₂)_m-R^b, -C(O)NH-(CHR^a)_m-R^b, -O-(CH₂)_m-C(O)NH-(CH₂)_m-R^b, -S-(CH₂)_m-C(O)NH-(CH₂)_m-R^b, -O-(CHR^a)_m-C(O)NH-(CHR^a)_m-R^b, -S-(CHR^a)_m-C(O)NH-(CHR^a)_m-R^b, -NH-(CH₂)_m-R^b, -NH-(CHR^a)_m-R^b, -NH[(CH₂)_m-R^b]₂, -NH-C(O)-NH-(CH₂)_m-R^b, -NH-C(O)-(CH₂)_m-CHR^bR^b y -NH-(CH₂)_m-C(O)-NH-(CH₂)_m-R^b;
- 15 cada R³¹ es, independientemente de los demás, hidrógeno o alquilo (C₁-C₆) opcionalmente sustituido con uno o más de los grupos R^b iguales o diferentes;
- 20 cada R³⁵ se selecciona independientemente del otro del grupo que consiste en hidrógeno y R^b, o, alternativamente, los dos grupos R³⁵ se toman juntos para formar un grupo oxo (=O), o NR³⁶;
- cada R³⁶ se selecciona independientemente de los demás del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo (C₁-C₆);
- 25 R³⁸ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo (C₁-C₆) y arilo (C₅-C₁₄);
- cada R^a se selecciona independientemente de los demás del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo (C₁-C₆), cicloalquilo (C₃-C₈), ciclohexilo, cicloalquilalquilo (C₄-C₁₁), arilo (C₅-C₁₀) (por ejemplo fenilo), arilalquilo (C₆-C₁₆) (por ejemplo bencilo), heteroalquilo de 2 a 6 miembros, cicloheteroalquilo de 3 a 8 miembros (por ejemplo morfolinilo, piperazinilo, homopiperazinilo, piperidinilo), cicloheteroalquilalquilo de 4 a 11 miembros, heteroarilo de 5 a 10 miembros y heteroarilalquilo de 6 a 16 miembros;
- 30 cada R^b se selecciona independientemente de los demás del grupo que consiste en =O, -OR^d, haloalquiloxilo (C₁-C₃), =S, -SR^d, NR^d, NOR^d, -NR^cR^c, halógeno, -CF₃, -CN, NC, -OCN, -SCN, -NO, -NO₂, =N₂, -N₃, -S(O)R^d, -S(O)₂R^d, -S(O)₂OR^d, -S(O)NR^cR^c, -S(O)₂NR^cR^c, -OS(O)R^d, -OS(O)₂R^d, -OS(O)₂OR^d, -OS(O)₂NR^cR^c, -C(O)R^d, -C(O)OR^d, -C(O)NR^cR^c, -C(NH)NR^cR^c, -C(NR^a)NR^cR^c, -C(NOH)R^a, -C(NOH)NR^cR^c, -OC(O)R^d, -OC(O)OR^d, -OC(O)NR^cR^c, -OC(NH)NR^cR^c, -OC(NR^a)NR^cR^c, -[NHC(O)]_nR^d, -[NR^aC(O)]_nR^d, -[NHC(O)]_nOR^d, -[NR^aC(O)]_nOR^d, -[NHC(O)]_nNR^cR^c, -[NR^aC(O)]_nNR^cR^c, -[NHC(NH)]_nNR^cR^c y -[NR^aC(NR^a)]_nNR^cR^c;
- 35 cada R^c es, independientemente de los demás, R^a, o, alternativamente, cada R^c se toma junto con el átomo de nitrógeno al que está unido para formar un cicloheteroalquilo o heteroarilo de 5 a 8 miembros que puede incluir opcionalmente uno o más de los heteroátomos adicionales iguales o diferentes y que puede estar opcionalmente sustituido con uno o más de los grupos R^a o R^b adecuados iguales o diferentes;
- 45 cada R^d es, independientemente de los demás, R^a;
- cada m es, independientemente de los demás, un número entero desde 1 hasta 3;
- 50 cada n es, independientemente de los demás, un número entero desde 0 hasta 3; y
- es un número entero desde 1 hasta 6.
- En una realización, R⁵ es F y R⁶ es hidrógeno.
- 55 También se describen profármacos de los compuestos de espiro-2,4-pirimidindiamina. Tales profármacos pueden ser activos en su forma de profármaco, o pueden ser inactivos hasta convertirse en condiciones fisiológicas u otras de su uso a una forma de fármaco activo. En los profármacos descritos en el presente documento, uno o más grupos funcionales de los compuestos de espiro-2,4-pirimidindiamina se incluyen en prorroto que se escinden de la molécula en las condiciones de uso, normalmente mediante hidrólisis, escisión enzimática o algunos otros
- 60 mecanismos de escisión, para proporcionar los grupos funcionales. Por ejemplo, los grupos aminos primarios o secundarios pueden estar incluidos en un prorroto amida que se escinde en condiciones de uso para generar el grupo amino primario o secundario. Por tanto, los profármacos descritos en el presente documento incluyen tipos especiales de grupos protectores, denominados "progrupos", que enmascaran uno o más grupos funcionales de los compuestos de espiro-2,4-pirimidindiamina que se escinden en las condiciones de uso para proporcionar un
- 65 compuesto de fármaco de espiro-2,4 pirimidindiamina activo. Los grupos funcionales dentro de los compuestos de 2,4-pirimidindiamina que pueden enmascarse con progrupos para la inclusión en un prorroto incluyen, pero no se

limitan a, aminas (primaria y secundaria), hidroxilos, sulfanilos (tioles), carboxilos, carbonilos, fenoles, catecoles, dioles, alquinos, fosfatos, etc. Se conoce en la técnica una miríada de progrupos adecuados para enmascarar tales grupos funcionales para proporcionar prorrastos que pueden escindirse en las condiciones de uso deseadas. Todos de estos progrupos, solos o en combinaciones, pueden incluirse en los profármacos de la invención. Los ejemplos
 5 específicos de prorrastos que proporcionan grupos amina primaria o secundaria que pueden incluirse en los profármacos de la invención incluyen, pero no se limitan a, amidas, carbamatos, iminas, ureas, fosfenilos, fosforilos y sulfenilos. Los ejemplos específicos de prorrastos que proporcionan grupos sulfanilo que pueden incluirse en los profármacos de la invención incluyen, pero no se limitan a, tioéteres, por ejemplo derivados de S-metilo (monotio, ditio, oxtio, aminotio acetales), silil tioéteres, tioésteres, tiocarbonatos, tiocarbamatos, disulfuros asimétricos, etc.
 10 Los ejemplos específicos de prorrastos que se escinden para proporcionar grupos hidroxilo que pueden incluirse en los profármacos de la invención incluyen, pero no se limitan a, sulfonatos, ésteres y carbonatos. Los ejemplos específicos de prorrastos que proporcionan grupos carboxilo que pueden incluirse en los profármacos descritos en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, ésteres (incluyendo ésteres de sililo, ésteres de ácido oxámico y tioésteres), amidas e hidrazidas.

Los profármacos descritos en el presente documento incluyen compuestos análogos a los de fórmula estructural (V) en los que R^c o R^d es un progrupo.

Otra realización ilustrativa de los profármacos descritos en el presente documento son compuestos según la fórmula estructural (II):



incluyendo sales, hidratos, solvatos y N-óxidos de los mismos, en los que:

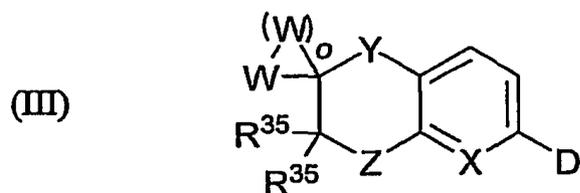
R², R⁴, R⁵ y R⁶ son tal como se definieron anteriormente para la fórmula estructural (V);

R^{2b} es un progrupo;

R^{4b} es un progrupo o un grupo alquilo, por ejemplo, metilo.

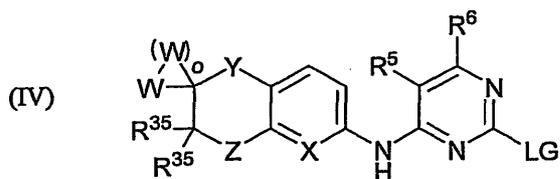
En otro aspecto, se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más compuestos descritos en el presente documento y un portador, excipiente o diluyente apropiado. La naturaleza exacta del portador, excipiente o diluyente dependerá del uso deseado para la composición, y puede oscilar entre ser adecuada o
 35 aceptable para usos veterinarios y ser adecuada o aceptable para uso en seres humanos.

Todavía en otro aspecto, se describen productos intermedios útiles para sintetizar los compuestos de 2,4-pirimidindiamina y profármacos descritos en el presente documento. En una realización, los productos intermedios son compuestos de espiro según la fórmula estructural (III):



incluyendo sales, hidratos, solvatos y N-óxidos de los mismos, en los que o, W, R³⁵, X, Y y Z son tal como se definieron para la fórmula estructural (V) y D es hidrógeno, halógeno, NO₂ o NH₂.

En otra realización, los productos intermedios son 2-4-pirimidinaminas según la fórmula estructural (IV):



incluyendo sales, hidratos, solvatos y N-óxidos de las mismas, en las que R^5 , R^6 , o, R^{31} , R^{35} , X, Y y Z son tal como se definieron anteriormente para la fórmula estructural (V) y LG es un grupo saliente, tal como, por ejemplo, $-S(O)_2Me$, $-SMe$ o halo (por ejemplo, F, Cl, Br, I).

Los compuestos de espiro-2,4-pirimidindiamina descritos en el presente documento son potentes inhibidores de desgranulación de células inmunitarias, tales como mastocitos, basófilos, neutrófilos y/o eosinófilos. Por tanto, todavía en otro aspecto, se describen métodos de regulación, y en particular, inhibición, de la desgranulación de tales células. El método generalmente implica poner en contacto una célula que se desgranula con una cantidad de un compuesto de espiro-2,4-pirimidindiamina o profármaco del mismo, o una sal, hidrato, solvato, N-óxido y/o composición aceptable del mismo, eficaz para regular o inhibir la desgranulación de la célula. El método puede practicarse en contextos *in vitro* o contextos *in vivo* como un enfoque terapéutico frente al tratamiento o la prevención de enfermedades caracterizadas por, provocadas por o asociadas con la desgranulación celular.

Sin querer restringirse a ninguna teoría de operación, los compuestos de espiro-2,4-pirimidindiamina pueden ejercer su efecto inhibitor de desgranulación, al menos en parte, bloqueando o inhibiendo la(s) cascada(s) de transducción de señales iniciada(s) por la reticulación de los receptores de Fc de alta afinidad para IgE ("FcεRI") y/o IgG ("FcγRI"). De hecho, los compuestos de espiro-2,4-pirimidindiamina pueden ser inhibidores de la desgranulación tanto mediada por FcεRI como mediada por FcγRI. Como consecuencia, los compuestos de 2,4-pirimidina pueden usarse para inhibir estas cascadas de señalización de receptores de Fc en cualquier tipo de célula que expresa tales receptores FcεRI y/o FcγRI incluyendo, pero sin limitarse a macrófagos, mastocitos, basófilos, neutrófilos y/o eosinófilos.

Los métodos también pueden permitir la regulación de, y en particular la inhibición de, procesos posteriores que resultan como consecuencia de la activación de tal(es) cascada(s) de señalización de receptores de Fc. Tales procesos posteriores incluyen, pero no se limitan a, desgranulación mediada por FcεRI y/o mediada por FcγRI, producción de citocina y/o la producción y/o liberación de mediadores lipídicos tales como leucotrienos y prostaglandinas. El método generalmente implica poner en contacto una célula que expresa un receptor de Fc, tal como uno de los tipos de células comentados anteriormente, con una cantidad de un compuesto de espiro-2,4-pirimidindiamina o profármaco del mismo, o una sal, hidrato, disolvente, N-óxido y/o composición aceptable del mismo, eficaz para regular o inhibir la cascada de señalización de receptores de Fc y/o un proceso posterior efectuado mediante la activación de esta cascada de señalización. El método puede practicarse en contextos *in vitro* o en contextos *in vivo* como un enfoque terapéutico frente al tratamiento o la prevención de enfermedades caracterizadas por, provocadas por o asociadas con la cascada de señalización de receptores de Fc, tales como enfermedades provocadas por la liberación de mediadores químicos específicos para gránulos tras la desgranulación, la liberación y/o la síntesis de citocinas y/o la liberación y/o la síntesis de mediadores lipídicos tales como leucotrienos y prostaglandinas.

Aún en otro aspecto, se describen métodos de tratamiento y/o prevención de enfermedades caracterizadas por, provocadas por o asociadas con la liberación de mediadores químicos como consecuencia de la activación de cascadas de señalización de receptores de Fc, tales como cascadas de señalización de FcεRI y/o FcγRI. Los métodos pueden practicarse en animales en contextos veterinarios o en seres humanos. Los métodos generalmente implican administrar a un sujeto animal o ser humano una cantidad de un compuesto de espiro-2,4-pirimidindiamina o profármaco del mismo, o una sal, hidrato, solvato, N-óxido y/o composición aceptable del mismo, eficaz para tratar o prevenir la enfermedad. Tal como se comentó anteriormente, la activación de la cascada de señalización de receptores FcεRI o FcγRI en determinadas células inmunitarias conduce a la liberación y/o la síntesis de una variedad de sustancias químicas que son mediadores farmacológicos de una amplia variedad de enfermedades. Cualquiera de estas enfermedades puede tratarse o prevenirse según los métodos descritos.

Por ejemplo, en mastocitos y basófilos, la activación de la cascada de señalización de FcεRI o FcγRI conduce a la liberación inmediata (es decir, en el plazo de 1-3 min. desde la activación del receptor) de mediadores formados previamente de reacciones de hipersensibilidad de tipo I y/o atópicas (por ejemplo, histamina, proteasas tales como tripsina, etc.) a través del proceso de desgranulación. Tales reacciones de hipersensibilidad de tipo I o atópicas incluyen, pero no se limitan a, reacciones anafilácticas al entorno y otros alérgenos (por ejemplo, polen, venenos de insectos y/o animales, alimentos, fármacos, tintes de contraste, etc.), reacciones anafilactoides, fiebre del heno, conjuntivitis alérgica, rinitis alérgica, asma alérgica, dermatitis atópica, eczema, urticaria, trastornos de la mucosa, trastornos tisulares y determinados trastornos gastrointestinales.

La liberación inmediata de los mediadores formados previamente a través de la desgranulación va seguida por la liberación y/o la síntesis de una variedad de otros mediadores químicos, incluyendo, entre otras cosas, factor activador de plaquetas (PAF), prostaglandinas y leucotrienos (por ejemplo, LTC₄) y la síntesis *de novo* y liberación de citocinas tales como TNF α , IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, etc. El primero de estos dos procesos se produce aproximadamente 3-30 min. tras la activación del receptor; el último aproximadamente 30 min. - 7 h. tras la activación del receptor. Se piensa que estos mediadores de "estadio tardío" son en parte responsables de los síntomas crónicos de las reacciones de hipersensibilidad de tipo I y atópicas indicadas anteriormente, y además son mediadores químicos de inflamación y enfermedades inflamatorias (por ejemplo, osteoartritis, enfermedad inflamatoria del intestino, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria del intestino idiopática, síndrome del intestino irritable, colon irritable, etc.), cicatrización de bajo grado (por ejemplo, esclerodermia, fibrosis aumentada, queloides, cicatrices postquirúrgicas, fibrosis pulmonar, espasmos vasculares, migraña, lesión por reperfusión y tras infarto de miocardio), y síndrome o complejo seco. Todas de estas enfermedades pueden tratarse o prevenirse según los métodos descritos.

Las enfermedades adicionales que pueden tratarse o prevenirse según los métodos descritos en el presente documento incluyen enfermedades asociadas con patología de basófilos y/o mastocitos. Los ejemplos de tales enfermedades incluyen, pero no se limitan a, enfermedades de la piel tales como esclerodermia, enfermedades cardíacas tales como tras infarto de miocardio, enfermedades pulmonares tales como remodelación o cambios del músculo pulmonar y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y enfermedades del intestino tales como síndrome del intestino inflamatorio (colon irritable).

Compuestos de espiro-2,4-pirimidindiamina también son potentes inhibidores de la tirosina cinasa, cinasa Syk. Por tanto, todavía en otro aspecto, se describen métodos de regulación, y en particular inhibición, de la actividad cinasa Syk. El método generalmente implica poner en contacto una cinasa Syk o una célula que comprende una cinasa Syk con una cantidad de un compuesto de espiro-2,4-pirimidindiamina o profármaco del mismo, o una sal, hidrato, solvato, N-óxido y/o composición aceptable del mismo, eficaz para regular o inhibir la actividad cinasa Syk. En una realización, la cinasa Syk es una cinasa Syk aislada o recombinante. En otra realización, la cinasa Syk es una cinasa Syk endógena o recombinante expresada por una célula, por ejemplo un mastocito o un basófilo. El método puede practicarse en contextos *in vitro* o en contextos *in vivo* como enfoque terapéutico frente al tratamiento o la prevención de enfermedades caracterizadas por, provocadas por o asociadas con actividad cinasa Syk.

Sin querer restringirse a ninguna teoría de operación particular, los compuestos de espiro-2,4-pirimidindiamina pueden inhibir la desgranulación celular y/o la liberación de otros mediadores químicos principalmente inhibiendo la cinasa Syk que se activa a través del homodímero de cadena gamma de Fc ϵ RI (véase, por ejemplo, la figura 2). Este homodímero de cadena gamma se comparte en otros receptores de Fc, incluyendo Fc γ RI, Fc γ RIII y Fc α RI. Para todos de estos receptores, la transducción de señales intracelulares está mediada por el homodímero de cadena gamma común. La unión y agregación de estos receptores dan como resultado el reclutamiento y la activación de tirosina cinasas tales como cinasa Syk. Como consecuencia de estas actividades de señalización comunes, los compuestos de espiro-2,4-pirimidindiamina descritos en el presente documento pueden usarse para regular, y en particular inhibir, las cascadas de señalización de receptores de Fc que tienen este homodímero de cadena gamma, tales como Fc ϵ RI, Fc γ RI, Fc γ RIII y Fc α RI, así como las respuestas celulares producidas a través de estos receptores.

Se sabe que la cinasa Syk desempeña un papel crítico en otras cascadas de señalización. Por ejemplo, cinasa Syk es un efector de la señalización del receptor de células B (BCR) (Turner *et al.*, 2000, *Immunology Today* 21:148-154) y es un componente esencial de señalización por integrinas beta(1) beta(2) y beta(3) en neutrófilos (Mocsai *et al.*, 2002, *Immunity* 16:547-558). Puesto que los compuestos de espiro-2,4-pirimidindiamina descritos en el presente documento son potentes inhibidores de cinasa Syk, éstos pueden usarse para regular, y en particular inhibir, cualquier cascada de señalización en la que Syk desempeña un papel, tales como, por ejemplo, las cascadas de señalización por integrinas, BCR y receptores de Fc, así como las respuestas celulares producidas a través de estas cascadas de señalización. La respuesta celular particular regulada o inhibida dependerá, en parte, del tipo de célula específico y la cascada de señalización de receptores, tal como se conoce bien en la técnica. Los ejemplos no limitativos de respuestas celulares que pueden regularse o inhibirse con los compuestos de espiro-2,4-pirimidindiamina incluyen un explosión respiratoria, adhesión celular, desgranulación celular, propagación celular, migración celular, fagocitosis (por ejemplo, en macrófagos), flujo de iones calcio (por ejemplo, en mastocitos, basófilos, neutrófilos, eosinófilos y células B), agregación plaquetaria, y maduración celular (por ejemplo, en células B).

Por tanto, en otro aspecto, se describen métodos de regulación, y en particular inhibición, cascadas de transducción de señales en las que Syk desempeña un papel. Los métodos generalmente implican poner en contacto un receptor dependiente de Syk o una célula que expresa un receptor dependiente de Syk con una cantidad de un compuesto de espiro-2,4-pirimidindiamina o profármaco descrito en el presente documento, o una sal, hidrato, solvato, N-óxido y/o composición aceptable del mismo, eficaz para regular o inhibir la cascada de transducción de señales. Los métodos también pueden usarse para regular, y en particular inhibir, procesos posteriores o respuestas celulares producidas por la activación de la cascada de transducción de señales dependiente de Syk particular. Los métodos pueden practicarse para regular cualquier cascada de transducción de señales en la que no se sabe, o se descubre

posteriormente, que Syk desempeña un papel. Los métodos pueden practicarse en contextos *in vitro* o en contextos *in vivo* como enfoque terapéutico frente al tratamiento o la prevención de enfermedades caracterizadas por, provocadas por o asociadas con activación de la cascada de transducción de señales dependiente de Syk. Los ejemplos no limitados de tales enfermedades incluyen aquellas comentadas anteriormente.

5 Los compuestos de espiro-2,4-pirimidindiamina descritos en el presente documento también pueden usarse para tratar o prevenir enfermedades autoinmunitarias y/o síntomas de tales enfermedades. Los métodos generalmente implican administrar a un sujeto que padece una enfermedad autoinmunitaria o en riesgo de desarrollar una enfermedad autoinmunitaria una cantidad de un método de espiro 2,4-pirimidindiamina o profármaco del mismo, o
10 una sal, N-óxido, hidrato, solvato o composición aceptable del mismo, eficaz para tratar o prevenir la enfermedad autoinmunitaria y/o sus síntomas asociados. Las enfermedades autoinmunitarias que pueden tratarse o prevenirse con los compuestos de espiro-2,4-pirimidindiamina incluyen las enfermedades que comúnmente están asociadas con reacciones de hipersensibilidad no anafilácticas (reacciones de hipersensibilidad de tipo II, tipo III y/o tipo IV) y/o las enfermedades que están mediadas, al menos en parte, por la activación de la cascada de señalización de FcγR en monocitos. Tales enfermedades autoinmunitarias incluyen, pero no se limitan a, las enfermedades autoinmunitarias que frecuentemente se denominan trastornos autoinmunitarios de tipo de célula individual u órgano individual y las enfermedades autoinmunitarias que frecuentemente se denomina como que implican trastorno autoinmunitario sistémico. Los ejemplos no limitativos de enfermedades frecuentemente denominadas trastornos autoinmunitarios de tipo de célula individual u órgano individual incluyen: tiroiditis de Hashimoto, anemia hemolítica autoinmunitaria, gastritis atrófica autoinmunitaria de anemia perniciosa, encefalomiелitis autoinmunitaria, orquitis autoinmunitaria, enfermedad de Goodpasture, trombocitopenia autoinmunitaria, oftalmia simpática, miastenia grave, enfermedad de Graves, cirrosis biliar primaria, hepatitis agresiva crónica, colitis ulcerosa y glomerulopatía membranosa. Los ejemplos no limitativos de enfermedades a menudo denominadas como que implican trastorno autoinmunitario sistémico incluyen: lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, síndrome de Sjogren, síndrome de Reiter, polimiositis-dermatomiositis, esclerosis sistémica, poliarteritis nudosa, esclerosis múltiple y penfigoide ampolloso.

5. Breve descripción de las figuras

30 La figura 1 proporciona un dibujo que ilustra producción inducida por alérgenos de IgE y posterior liberación de mediadores químicos formados previamente y otros a partir de mastocitos;

la figura 2 proporciona un dibujo que ilustra la cascada de transducción de señales de FcεR1 que conduce a desgranulación de mastocitos y/o basófilos; y

35 la figura 3 proporciona un dibujo que ilustra los supuestos puntos de acción de compuestos que inhiben selectamente aguas arriba la desgranulación mediada por FcεR1 y compuestos que inhiben la desgranulación tanto mediada por FcεR1 como inducida por ionomicina.

40 6. Descripción detallada

6.2 Definiciones

45 Tal como se usa en el presente documento, se pretende que los siguientes términos tengan los siguientes significados:

“Alquilo” por sí mismo o como parte de otro sustituyente se refiere a un radical hidrocarbonado monovalente ramificado, de cadena lineal o cíclico, saturado o insaturado que tiene el número de átomos de carbono indicado (es decir, C₁-C₆ significa de uno a seis átomos de carbono) que se deriva por la eliminación de un átomo de hidrógeno a partir de un átomo de carbono individual de un alcano, alqueno o alquino original. Los grupos alquilo típicos incluyen, pero no se limitan a, metilo; etilos tales como etanilo, etenilo, etinilo; propilos tales como propan-1-ilo, propan-2-ilo, ciclopropan-1-ilo, prop-1-en-1-ilo, prop-1-en-2-ilo, prop-2-en-1-ilo, cicloprop-1-en-1-ilo, cicloprop-2-en-1-ilo, prop-1-in-1-ilo, prop-2-in-1-ilo, etc.; butilos tales como butan-1-ilo, butan-2-ilo, 2-metil-propan-1-ilo, 2-metil-propan-2-ilo, ciclobutan-1-ilo, but-1-en-1-ilo, but-1-en-2-ilo, 2-metil-prop-1-en-1-ilo, but-2-en-1-ilo, but-2-en-2-ilo, buta-1,3-dien-1-ilo, buta-1,3-dien-2-ilo, ciclobut-1-en-1-ilo, ciclobut-1-en-3-ilo, ciclobuta-1,3-dien-1-ilo, but-1-in-1-ilo, but-1-in-3-ilo, but-3-in-1-ilo, etc.; y similares. Cuando se pretenden niveles de saturación específicos, se usa la nomenclatura “alcanilo”, “alquenilo” y/o “alquinilo”, tal como se define a continuación. En algunas realizaciones, los grupos alcanilo son alquilo (C₁-C₁₀). En otras realizaciones, los grupos alquilo son alquilo (C₁-C₆).

60 “Alcanilo” por sí mismo o como parte de otro sustituyente se refiere a un alquilo ramificado, de cadena lineal o cíclico, saturado derivado mediante la eliminación de un átomo de hidrógeno de un átomo de carbono individual de un alcano original. Los grupos alcanilo típicos incluyen, pero no se limitan a, metanilo; etanilo; propanilos tales como propan-1-ilo, propan-2-ilo (isopropilo), ciclopropan-1-ilo, etc.; butanilos tales como butan-1-ilo, butan-2-ilo (sec-butilo), 2-metil-propan-1-ilo (isobutilo), 2-metil-propan-2-ilo (t-butilo), ciclobutan-1-ilo, etc.; y similares.

65 “Alquenilo” por sí mismo o como parte de otro sustituyente se refiere a un alquilo ramificado, de cadena lineal o

- cíclico, insaturado que tiene al menos un doble enlace carbono-carbono derivado mediante la eliminación de un átomo de hidrógeno a partir de un átomo de carbono individual de un alqueno original. El grupo puede estar en la conformación o bien cis o bien trans con respecto al/a los doble(s) enlace(s). Los grupos alquenilo típicos incluyen, pero no se limitan a, etenilo; propenilos tales como prop-1-en-1-ilo, prop-1-en-2-ilo, prop-2-en-1-ilo, prop-2-en-2-ilo, 5 cicloprop-1-en-1-ilo; cicloprop-2-en-1-ilo; butenilos tales como but-1-en-1-ilo, but-1-en-2-ilo, 2-metil-prop-1-en-1-ilo, but-2-en-1-ilo, but-2-en-2-ilo, buta-1,3-dien-1-ilo, buta-1,3-dien-2-ilo, ciclobut-1-en-1-ilo, ciclobut-1-en-3-ilo, ciclobuta-1,3-dien-1-ilo, etc.; y similares. En realizaciones preferidas, el grupo alquenilo es alquenilo (C₂-C₆).
- 10 “Alquinilo” por sí mismo o como parte de otro sustituyente se refiere a un alquilo ramificado, de cadena lineal o cíclico, insaturado que tiene al menos un triple enlace carbono-carbono derivado mediante la eliminación de un átomo de hidrógeno a partir de un átomo de carbono individual de un alquino original. Los grupos alquinilo típicos incluyen, pero no se limitan a, etinilo; propinilos tales como prop-1-in-1-ilo, prop-2-in-1-ilo, etc.; butinilos tales como but-1-in-1-ilo, but-1-in-3-ilo, but-3-in-1-ilo, etc.; y similares.
- 15 “Alquildiilo” por sí mismo o como parte de otro sustituyente se refiere a un grupo hidrocarbonado divalente ramificado, de cadena lineal o cíclico, saturado o insaturado que tiene el número de átomos de carbono indicado (es decir, C₁-C₆ significa desde uno hasta seis átomos de carbono) derivado mediante la eliminación de un átomo de hidrógeno a partir de cada uno de dos átomos de carbono diferentes de un alcano, alqueno o alquino original, o mediante la eliminación de dos átomos de hidrógeno a partir de un átomo de carbono individual de un alcano, 20 alqueno o alquino original. Los dos centros de radical monovalente o cada valencia del centros de radical divalente pueden formar enlaces con los átomos iguales o diferentes. Los grupos alquildiilo típicos incluyen, pero no se limitan a, metandiilo; etildiilos tales como etan-1,1-diilo, etan-1,2-diilo, eten-1,1-diilo, eten-1,2-diilo; propildiilos tales como propan-1,1-diilo, propan-1,2-diilo, propan-2,2-diilo, propan-1,3-diilo, ciclopropan-1,1-diilo, ciclopropan-1,2-diilo, prop-1-en-1,1-diilo, prop-1-en-1,2-diilo, prop-2-en-1,2-diilo, prop-1-en-1,3-diilo, cicloprop-1-en-1,2-diilo, cicloprop-2-en-1,2-diilo, cicloprop-2-en-1,1-diilo, prop-1-in-1,3-diilo, etc.; butildiilos tales como, butan-1,1-diilo, butan-1,2-diilo, butan-1,3-diilo, butan-1,4-diilo, butan-2,2-diilo, 2-metil-propan-1,1-diilo, 2-metil-propan-1,2-diilo, ciclobutan-1,1-diilo; ciclobutan-1,2-diilo, ciclobutan-1,3-diilo, but-1-en-1,1-diilo, but-1-en-1,2-diilo, but-1-en-1,3-diilo, but-1-en-1,4-diilo, 2-metil-prop-1-en-1,1-diilo, 2-metaniliden-propan-1,1-diilo, buta-1,3-dien-1,1-diilo, buta-1,3-dien-1,2-diilo, buta-1,3-dien-1,3-diilo, buta-1,3-dien-1,4-diilo, ciclobut-1-en-1,2-diilo, ciclobut-1-en-1,3-diilo, ciclobut-2-en-1,2-diilo, ciclobuta-1,3-dien-1,2-diilo, ciclobuta-1,3-dien-1,3-diilo, but-1-in-1,3-diilo, but-1-in-1,4-diilo, buta-1,3-diin-1,4-diilo, etc.; y similares. Cuando se pretenden niveles de saturación específicos, se usa la nomenclatura alcanildiilo, alquenildiilo y/o alquinildiilo. Cuando se pretende específicamente que las dos valencias estén en el mismo átomo de carbono, se usa la nomenclatura “alquilideno”. En algunas realizaciones, los grupos alquildiilo son alquildiilo (C₁-C₁₀). En otras realizaciones, los grupos alquildiilo son alquidilo (C₁-C₆). También se prefieren grupos alcanildiilo acíclicos saturados en los que los centros de radical están en los carbonos terminales, por ejemplo, metandiilo (metano); etan-1,2-diilo (etano); propan-1,3-diilo (propano); butan-1,4-diilo (butano); y similares (también denominados alquilenos, definidos más adelante).
- 35 “Alquileno” por sí mismo o como parte de otro sustituyente se refiere a un grupos alquildiilo de cadena lineal saturado o insaturado que tiene dos centros de radical monovalente terminales derivado mediante la eliminación de un átomo de hidrógeno a partir de cada uno de los dos átomos de carbono terminales de alcano, alqueno o alquino original de cadena lineal. La ubicación de un doble enlace o triple enlace, si está presente, en un alquileno particular se indica entre corchetes. Los grupos alquileno típicos incluyen, pero no se limitan a, metano; etilenos tales como etano, eteno, etino; propilenos tales como propano, prop[1]eno, propa[1,2]dieno, prop[1]ino, etc.; butilenos tales como butano, but[1]eno, but[2]eno, buta[1,3]dieno, but[1]ino, but[2]ino, buta[1,3]diino, etc.; y similares. Cuando se pretenden niveles de saturación específicos, se usa la nomenclatura alcano, alqueno y/o alquino. En algunas realizaciones, el grupo alquileno es alquileno (C₁-C₁₀). En otras realizaciones, el grupo alquileno es alquileno (C₁-C₆). Todavía en otras realizaciones, el grupo alquileno es alquileno (C₁-C₃). También se prefieren grupos alcano de cadena lineal saturados, por ejemplo, metano, etano, propano, butano, y similares.
- 40 “Heteroalquilo”, “heteroalcanilo”, “heteroalquenilo”, “heteroalquinilo”, “heteroalquildiilo” y “heteroalquileno” por sí mismos o como parte de otro sustituyente se refieren a grupos alquilo, alcanilo, alquenilo, alquinilo, alquildiilo y alquileno, respectivamente, en los que uno o más de los átomos de carbono están sustituidos cada uno independientemente por grupos heteroatómicos o heteroátomos iguales o diferentes. Los grupos heteroatómicos y/o heteroátomos típicos que pueden sustituir a los átomos de carbono incluyen, pero no se limitan a, -O-, -S-, -S-O-, 45 -NR'-, -PH-, -S(O)-, -S(O)₂-, -S(O)NR'-, -S(O)₂NR'-, y similares, incluyendo combinaciones de los mismos, en los que cada R' es independientemente hidrógeno o alquilo (C₁-C₆).
- 50 “Cicloalquilo” y “heterocicloalquilo” por sí mismos o como parte de otro sustituyente se refieren a versiones cíclicas de grupos “alquilo” y “heteroalquilo”, respectivamente. Para grupos heteroalquilo, un heteroátomo puede ocupar la posición que se une al resto de la molécula. Los grupos cicloalquilo típicos incluyen, pero no se limitan a, ciclopropilo; ciclobutilos tales como ciclobutanilo y ciclobutenilo; ciclopentilos tales como ciclopentanilo y ciclopentenilo; ciclohexilos tales como ciclohexanilo y ciclohexenilo; y similares. Los grupos heterocicloalquilo típicos incluyen, pero no se limitan a, tetrahidrofuranilo (por ejemplo, tetrahidrofuran-2-ilo, tetrahidrofuran-3-ilo, etc.), piperidinilo (por ejemplo, piperidin-1-ilo, piperidin-2-ilo, etc.), morfolinilo (por ejemplo, morfolin-3-ilo, morfolin-4-ilo, etc.), piperazinilo (por ejemplo, piperazin-1-ilo, piperazin-2-ilo, etc.), y similares.
- 60
- 65

“Puente heteroatómico acíclico” se refiere a un puente divalente en el que los átomos de la estructura principal son exclusivamente grupos heteroatómicos y/o heteroátomos. Los puentes heteroatómicos acíclicos típicos incluyen, pero no se limitan a, -O-, -S-, -S-O-, -NR'-, -PH-, -S(O)-, -S(O)₂-, -S(O)NR'-, -S(O)₂NR'-, y similares, incluyendo combinaciones de los mismos, en los que cada R' es independientemente hidrógeno o alquilo (C₁-C₆).

“Sistema de anillos aromático original” se refiere a un sistema de anillos cíclico o policíclico insaturado que tiene un sistema de electrones π conjugado. Específicamente se incluyen dentro de la definición de “sistema de anillos aromático original” sistemas de anillos condensados en los que uno o más de los anillos son aromáticos y uno o más de los anillos están saturados o insaturados, tales como, por ejemplo, fluoreno, indano, indeno, fenaleno, tetrahidronaftaleno, etc. Los sistemas de anillos aromáticos originales típicos incluyen, pero no se limitan a, aceantrileno, acenafileno, acefenantrileno, antraceno, azuleno, benceno, criseno, coroneno, fluoranteno, fluoreno, hexaceno, hexafeno, hexaleno, indaceno, s-indaceno, indano, indeno, naftaleno, octaceno, octafeno, octaleno, ovaleno, penta-2,4-dieno, pentaceno, pentaleno, pentafeno, perileno, fenaleno, fenantreno, piceno, pleiadeno, pireno, pirantreno, rubiceno, tetrahidronaftaleno, trifenileno, trinaftaleno, y similares, así como los diversos hidroisómeros de los mismos.

“Ariilo” por sí mismo o como parte de otro sustituyente se refiere a un grupo hidrocarbonado aromático monovalente que tiene el número de átomos de carbono indicado (es decir, C₅-C₁₅ significa desde 5 hasta 15 átomos de carbono) derivado mediante la eliminación de un átomo de hidrógeno a partir de un átomo de carbono individual de un sistema de anillos aromático original. Los grupos ariilo típicos incluyen, pero no se limitan a, grupos derivados de aceantrileno, acenafileno, acefenantrileno, antraceno, azuleno, benceno, criseno, coroneno, fluoranteno, fluoreno, hexaceno, hexafeno, hexaleno, as-indaceno, s-indaceno, indano, indeno, naftaleno, octaceno, octafeno, octaleno, ovaleno, penta-2,4-dieno, pentaceno, pentaleno, pentafeno, perileno, fenaleno, fenantreno, piceno, pleiadeno, pireno, pirantreno, rubiceno, trifenileno, trinaftaleno, y similares, así como los diversos hidroisómeros de los mismos. En algunas realizaciones, el grupo ariilo es ariilo (C₅-C₁₅), siendo (C₅-C₁₀) incluso más preferido. Los ariilos preferidos son ciclopentadienilo, fenilo y naftilo.

“Ariilarilo” por sí mismo o como parte de otro sustituyente se refiere a un grupo hidrocarbonado monovalente derivado mediante la eliminación de un átomo de hidrógeno a partir de un átomo de carbono individual de un sistema de anillos en el que dos o más sistemas de anillos aromáticos originales idénticos o no idénticos están directamente unidos entre sí mediante un enlace sencillo, en el que el número de tales uniones de anillo directas es uno menos del número de sistemas de anillos aromáticos originales implicados. Los grupos ariilarilo típicos incluyen, pero no se limitan a, bifenilo, trifenilo, fenil-naftilo, binaftilo, bifenil-naftilo, y similares. Cuando se especifica el número de átomos de carbono en un grupo ariilarilo, los números se refieren a los átomos de carbono que comprenden cada anillo aromático original. Por ejemplo, ariilarilo (C₅-C₁₅) es un grupo ariilarilo en el que cada anillo aromático comprende desde 5 hasta 15 carbonos, por ejemplo, bifenilo, trifenilo, binaftilo, fenilnaftilo, etc. Preferiblemente, cada sistema de anillos aromático original de un grupo ariilarilo es independientemente un sistema aromático (C₅-C₁₅), más preferiblemente un sistema aromático (C₅-C₁₀). También se prefieren grupos ariilarilo en los que todos los sistemas de anillos aromáticos originales son idénticos, por ejemplo, bifenilo, trifenilo, binaftilo, trinaftilo, etc.

“Biarilo” por sí mismo o como parte de otro sustituyente se refiere a un grupo ariilarilo que tiene dos sistemas aromáticos originales idénticos unidos directamente entre sí por un enlace sencillo. Los grupos biarilo típicos incluyen, pero no se limitan a, bifenilo, binaftilo, biantracilo, y similares. Preferiblemente, los sistemas de anillos aromáticos son anillos aromáticos (C₅-C₁₅), más preferiblemente anillos aromáticos (C₅-C₁₀). Un grupo biarilo particularmente preferido es bifenilo.

“Ariilalquilo” por sí mismo o como parte de otro sustituyente se refiere a un grupo alquilo acíclico en el que uno de los átomos de hidrógeno unidos a un átomo de carbono, normalmente un átomo de carbono sp³ o terminal, está sustituido por un grupo ariilo. Los grupos ariilalquilo típicos incluyen, pero no se limitan a, bencilo, 2-feniletan-1-ilo, 2-feniletan-1-ilo, naftilmetilo, 2-naftiletan-1-ilo, 2-naftiletan-1-ilo, naftobencilo, 2-naftofeniletan-1-ilo y similares. Cuando se pretenden restos alquilo específicos, se usa la nomenclatura ariilalcanilo, ariilalquenilo y/o ariilalquinilo. En realizaciones preferidas, el grupo ariilalquilo es ariilalquilo (C₆-C₂₁), por ejemplo, el resto alcanilo, alquenilo o alquinilo del grupo ariilalquilo es (C₁-C₆) y el resto ariilo es (C₅-C₁₅). En algunas realizaciones el grupo ariilalquilo es (C₆-C₁₃), por ejemplo, el resto alcanilo, alquenilo o alquinilo del grupo ariilalquilo es (C₁-C₃) y el resto ariilo es (C₅-C₁₀).

“Sistema de anillos heteroaromático original” se refiere a un sistema de anillos aromático original en el que uno o más átomos de carbono están sustituidos cada uno independientemente por los grupos heteroatómicos o heteroátomos iguales o diferentes. Los grupos heteroatómicos o heteroátomos típicos para sustituir a los átomos de carbono incluyen, pero no se limitan a, N, NH, P, O, S, S(O), S(O)₂, Si, etc. Específicamente se incluyen dentro de la definición de “sistemas de anillos heteroaromáticos originales” sistemas de anillos condensados en los que uno o más de los anillos son aromáticos y uno o más de los anillos están saturados o insaturados, tales como, por ejemplo, benzodioxano, benzofurano, cromano, cromeno, indol, indolina, xanteno, etc. También se incluyen en la definición de “sistema de anillos heteroaromático original” los anillos reconocidos que incluyen sustituyentes comunes, tales como, por ejemplo, benzopirona y 1-metil-1,2,3,4-tetrazol. Específicamente se excluyen de la definición de “sistema de anillos heteroaromático original” anillos de benceno condensados con polialquilenglicoles cíclicos tales como

polietilenglicoles cíclicos. Los sistemas de anillos heteroaromáticos originales típicos incluyen, pero no se limitan a, acridina, bencimidazol, bencisoxazol, benzodioxano, benzodioxol, benzofurano, benzopirona, benzotiadiazol, benzotiazol, benzotriazol, benzoxaxina, benzoxazol, benzoxazolina, carbazol, β -carbolina, cromano, cromeno, cinolina, furano, imidazol, indazol, indol, indolina, indolizina, isobenzofurano, isocromeno, isoindol, isoindolina, isoquinolina, isotiazol, isoxazol, naftiridina, oxadiazol, oxazol, perimidina, fenantridina, fenantrolina, fenazina, ftalazina, pteridina, purina, pirano, pirazina, pirazol, piridazina, piridina, pirimidina, pirrol, pirrolizina, quinazolina, quinolina, quinolizina, quinoxalina, tetrazol, tiadiazol, tiazol, tiofeno, triazol, xanteno, y similares.

“Heteroarilo” por sí mismo o como parte de otro sustituyente se refiere a un grupo heteroaromático monovalente que tiene el número de átomos de anillo indicado (por ejemplo, “de 5 a 14 miembros” significa desde 5 hasta 14 átomos de anillo) derivado mediante la eliminación de un átomo de hidrógeno a partir de un átomo individual de un sistema de anillos heteroaromático original. Los grupos heteroarilo típicos incluyen, pero no se limitan a, grupos derivados de acridina, bencimidazol, bencisoxazol, benzodioxano, benzodioxol, benzofurano, benzopirona, benzotiadiazol, benzotiazol, benzotriazol, benzoxaxina, benzoxazol, benzoxazolina, carbazol, β -carbolina, cromano, cromeno, cinolina, furano, imidazol, indazol, indol, indolina, indolizina, isobenzofurano, isocromeno, isoindol, isoindolina, isoquinolina, isotiazol, isoxazol, naftiridina, oxadiazol, oxazol, perimidina, fenantridina, fenantrolina, fenazina, ftalazina, pteridina, purina, pirano, pirazina, pirazol, piridazina, piridina, pirimidina, pirrol, pirrolizina, quinazolina, quinolina, quinolizina, quinoxalina, tetrazol, tiadiazol, tiazol, tiofeno, triazol, xanteno, y similares, así como los diversos hidroisómeros de los mismos. En algunas realizaciones, el grupo heteroarilo es un heteroarilo de 5 a 14 miembros, prefiriéndose particularmente heteroarilo de 5 a 10 miembros.

“Heteroaril-heteroarilo” por sí mismo o como parte de otro sustituyente se refiere a un grupo heteroaromático monovalente derivado mediante la eliminación de un átomo de hidrógeno a partir de un átomo individual de un sistema de anillos en el que dos o más sistemas de anillos heteroaromáticos originales idénticos o no idénticos están unidos directamente entre sí mediante un enlace sencillo, en el que el número de tales uniones de anillos directas es uno menos del número de sistemas de anillos heteroaromáticos originales implicados. Los grupos heteroaril-heteroarilo típicos incluyen, pero no se limitan a, bipiridilo, tripiridilo, piridilpurinilo, bipurinilo, etc. Cuando se especifica el número de átomos, los números se refieren al número de átomos que comprende cada sistema de anillos heteroaromático original. Por ejemplo, heteroaril-heteroarilo de 5 a 15 miembros es un grupo heteroaril-heteroarilo en el que cada sistema de anillos heteroaromático original comprende desde 5 hasta 15 átomos, por ejemplo, bipiridilo, tripiridilo, etc. Preferiblemente, cada sistema de anillos heteroaromático original es independientemente un sistema heteroaromático de 5 a 15 miembros, más preferiblemente un sistema heteroaromático de 5 a 10 miembros. También se prefieren grupos heteroaril-heteroarilo en los que todos de los sistemas de anillos heteroaromáticos originales son idénticos.

“Biheteroarilo” por sí mismo o como parte de otro sustituyente se refiere a un grupo heteroaril-heteroarilo que tiene dos sistemas de anillos heteroaromáticos originales idénticos unidos directamente entre sí mediante un enlace sencillo. Los grupos biheteroarilo típicos incluyen, pero no se limitan a, bipiridilo, bipurinilo, biquinolililo, y similares. Preferiblemente, los sistemas de anillos heteroaromáticos son anillos heteroaromáticos de 5 a 15 miembros, más preferiblemente anillos heteroaromáticos de 5 a 10 miembros.

“Heteroarilalquilo” por sí mismo o como parte de otro sustituyente se refiere a un grupo alquilo acíclico en el que uno de los átomos de hidrógeno unidos a un átomo de carbono, normalmente un átomo de carbono sp^3 o terminal, está sustituido por un grupo heteroarilo. Cuando se pretenden restos alquilo específicos, se usa la nomenclatura heteroarilalcanilo, heteroarilalquenilo y/o heteroarilalquinilo. En realizaciones preferidas, el grupo heteroarilalquilo es un heteroarilalquilo de 6 a 21 miembros, por ejemplo, el resto alcanilo, alquenilo o alquinilo del heteroarilalquilo es alquilo (C_1-C_6) y el resto heteroarilo es un heteroarilo de 5 a 15 miembros. En realizaciones particularmente preferidas, el heteroarilalquilo es un heteroarilalquilo de 6 a 13 miembros, por ejemplo, el resto alcanilo, alquenilo o alquinilo es alquilo (C_1-C_3) y el resto heteroarilo es un heteroarilo de 5 a 10 miembros.

“Halógeno” o “halo” por sí mismos o como parte de otro sustituyente, a menos que se indique lo contrario, se refieren a fluoro, cloro, bromo y yodo.

“Haloalquilo” por sí mismo o como parte de otro sustituyente se refiere a un grupo alquilo en el que uno o más de los átomos de hidrógeno está sustituido por un halógeno. Por tanto, el término “haloalquilo” pretende incluir monohaloalquilos, dihaloalquilos, trihaloalquilos, etc. hasta perhaloalquilos. Por ejemplo, la expresión “haloalquilo (C_1-C_2)” incluye fluorometilo, difluorometilo, trifluorometilo, 1-fluoroetilo, 1,1-difluoroetilo, 1,2-difluoroetilo, 1,1,1-trifluoroetilo, perfluoroetilo, etc.

Los grupos definidos anteriormente pueden incluir prefijos y/o sufijos que se usan comúnmente en la técnica para crear grupos sustituyentes bien reconocidos adicionales. Como ejemplos, “alquiloxilo” o “alcoxilo” se refiere a un grupo de la fórmula -OR”, “alquilamina” se refiere a un grupo de fórmula -NHR” y “dialquilamina” se refiere a un grupo de fórmula NR”R”, en las que cada R” es independientemente un alquilo. Como otro ejemplo, “haloalcoxilo” o “haloalquiloxilo” se refieren a un grupo de fórmula -OR””, en la que R” es un haloalquilo.

“Grupo protector” se refiere a un grupo de átomos que, cuando están unidos a un grupo funcional reactivo en una

molécula, enmascaran, reducen o previenen la reactividad del grupo funcional. Normalmente, un grupo protector puede eliminarse selectivamente según se desee durante el transcurso de una síntesis. Ejemplos de grupos protectores pueden encontrarse en Greene and Wuts, *Protective Groups in Organic Chemistry*, 3ª Ed., 1999, John Wiley & Sons, NY y Harrison *et al.*, *Compendium of Synthetic Organic Methods*, Vol. 1-8, 1971-1996, John Wiley & Sons, NY. Los grupos protectores de amino representativos incluyen, pero no se limitan a, formilo, acetilo, trifluoroacetilo, bencilo, benciloxicarbonilo ("CBZ"), terc-butoxicarbonilo ("Boc"), trimetilsililo ("TMS"), 2-trimetilsilil-etanosulfonilo ("TES"), grupos tritilo sustituido y tritilo, aliloxicarbonilo, 9-fluorenilmetiloxicarbonilo ("Fmoc"), nitro-veratriloxicarbonilo ("Nvoc") y similares. Los grupos protectores de hidroxilo representativos incluyen, pero no se limitan a, aquellos en los que el grupo hidroxilo está o bien acilado o bien alquilado tal como bencil y tritil éteres, así como alquil éteres, tetrahidropiraniil éteres, trialkilsilil éteres (por ejemplo, grupos TMS o TIPPS) y alil éteres.

"Profármacos" se refiere a un derivado de un compuesto de espiro-2,4-pirimidindiamina activo (fármaco) que requiere una transformación en las condiciones de uso, tal como dentro del organismo, para liberar el fármaco de espiro-2,4-pirimidindiamina activo. Con frecuencia, pero no necesariamente, los profármacos son farmacológicamente inactivos hasta convertirse en el fármaco activo. Normalmente se obtienen profármacos enmascarando un grupo funcional en el fármaco de espiro-2,4-pirimidindiamina que se cree que se requiere en parte para la actividad con un progrupo (definido a continuación) para formar un proresto que experimenta una transformación, tal como escisión, en las condiciones específicas de uso para liberar el grupo funcional, y por tanto el fármaco de espiro-2,4-pirimidindiamina activo. La escisión del proresto puede avanzar espontáneamente, tal como mediante una reacción de hidrólisis, o puede catalizarse o inducirse por otro agente, tal como por una enzima, por la luz, por ácido o base, o por un cambio de o exposición a un parámetro físico o ambiental, tal como un cambio de temperatura. El agente puede ser endógeno en las condiciones de uso, tal como una enzima presente en las células a las cuales se administra el profármaco o las condiciones ácidas del estómago, o puede suministrarse por vía exógena.

Se conocen bien en la técnica una amplia variedad de progrupos, así como los prorestos resultantes, adecuados para enmascarar grupos funcionales en los compuestos de 2,4-pirimidindiaminas activos para proporcionar profármacos. Por ejemplo, un grupo funcional hidroxilo puede enmascararse como proresto sulfonato, éster o carbonato, que puede hidrolizarse *in vivo* para proporcionar el grupo hidroxilo. Un grupo funcional amino puede enmascararse como proresto amida, carbamato, imina, urea, fosfenilo, fosforilo o sulfenilo, que puede hidrolizarse *in vivo* para proporcionar el grupo amino. Un grupo carboxilo puede enmascararse como proresto éster (incluyendo ésteres de sililo y tioésteres), amida o hidrazida, que puede hidrolizarse *in vivo* para proporcionar el grupo carboxilo. Los grupos protectores de nitrógeno y profármacos de nitrógeno de la invención pueden incluir grupos alquilo inferior así como amidas, carbamatos, etc. Otros ejemplos específicos de progrupos adecuados y sus respectivos prorestos resultarán evidentes para los expertos en la técnica.

"Progrupo" se refiere a un tipo de grupo protector que, cuando se usa para enmascarar un grupo funcional dentro de un fármaco de espiro-2,4-pirimidindiamina activo para formar un proresto, convierte el fármaco en un profármaco. Los progrupos normalmente se unen al grupo funcional del fármaco a través de enlaces que pueden escindirse en condiciones de uso especificadas. Por tanto, un progrupo es la parte de un proresto que se escinde para liberar el grupo funcional en las condiciones de uso especificadas. Como ejemplo específico, un proresto amida de fórmula NH-C(O)CH_3 comprende el progrupo $-\text{C(O)CH}_3$.

"Receptor de Fc" se refiere a un miembro de la familia de moléculas de superficie celular que se une a la parte Fc (que contiene la región constante específica) de una inmunoglobulina. Cada receptor de Fc se une a inmunoglobulinas de un tipo específico. Por ejemplo el receptor de $\text{Fc}\alpha$ ("Fc α R") se une a IgA, el Fc ϵ R se une a IgE y el Fc γ R se une a IgG.

La familia Fc α R incluye el receptor de Ig polimérico implicado en el transporte epitelial de IgA/IgM, el receptor R α RI específico de mieloides (también denominado CD89), el Fc α μ R y al menos dos receptores de IgA alternativos (para una revisión reciente véase Monteiro & van de Winkel, 2003, *Annu. Rev. Immunol.*, publicación electrónica avanzada). El Fc α RI se expresa en neutrófilos, eosinófilos, monocitos/macrófagos, células dendríticas y células de Kupfer. El Fc α RI incluye una cadena alfa y el homodímero gamma de FcR que porta un motivo de activación (ITAM) en el dominio citoplásmico y fosforila la cinasa Syk.

La familia Fc ϵ R incluye dos tipos, denominados Fc ϵ RI y Fc ϵ RII (también conocido como CD23). Fc ϵ RI es un receptor de alta afinidad (se une a IgE con una afinidad de aproximadamente 10^{10} M^{-1}) encontrado en mastocitos, basófilos y eosinófilos que ancla IgE monomérico a la superficie celular. El Fc ϵ RI tiene una cadena alfa, una cadena beta y el homodímero de cadena gamma comentado anteriormente. El Fc ϵ RII es un receptor de baja afinidad expresado en fagocitos mononucleares, linfocitos B, eosinófilos y plaquetas. El Fc ϵ RII comprende una cadena polipeptídica sencilla y no incluye el homodímero de cadena gamma.

La familia Fc γ R incluye tres tipos, denominados Fc γ RI (también conocido como CD64), Fc γ RII (también conocido como CD32) y Fc γ RIII (también conocido como CD16). Fc γ RI es un receptor de alta afinidad (se une a IgG1 con una afinidad de 10^8 M^{-1}) encontrado en mastocitos, basófilos, células mononucleares, neutrófilos, eosinófilos, células

dendríticas y fagocitos que ancla IgG monomérico a la superficie celular. El FcγRI incluye una cadena alfa y el dímero de cadena gamma compartido por FcαRI y FcεRI.

5 El FcγRII es un receptor de baja afinidad expresado en neutrófilos, monocitos, eosinófilos, plaquetas y linfocitos B. El FcγRII incluye una cadena alfa, y no incluye el homodímero de cadena gamma comentado anteriormente.

10 El FcγRIII es de baja afinidad (se une a IgG1 con una afinidad de $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) expresado en NK, eosinófilos, macrófagos, neutrófilos y mastocitos. Comprende una cadena alfa y el homodímero gamma compartido por FcαRI, FcεRI y FcγRI.

15 Los expertos reconocerán que la estructura de la subunidad y las propiedades de unión de estos diversos receptores de Fc, los tipos celulares que los expresan, no se caracterizan completamente. Los comentarios anteriores reflejan meramente el estado actual de la técnica con respecto a estos receptores (véase, por ejemplo, Immunobiology: The Immune System in Health & Disease, 5ª edición, Janeway *et al.*, Eds, 2001, ISBN 0-8153-3642-x, figura 9.30 en la página 371), y no pretenden ser limitativos con respecto a la mirada de cascadas de señalización de receptores que pueden regularse con los compuestos descritos en el presente documento.

20 “Desgranulación mediada por receptores de Fc” o “desgranulación inducida por receptores de Fc” se refiere a desgranulación que avanza a través de una cascada de transducción de señales de receptores de Fc iniciada mediante reticulación de un receptor de Fc.

25 “Desgranulación inducida por IgE” o “desgranulación mediada por FcεRI” se refiere a desgranulación que avanza a través de la cascada de transducción de señales del receptor de IgE iniciada mediante reticulación de IgE unida a FcεRI. La reticulación puede inducirse mediante un alérgeno específico de IgE u otro agente de unión multivalente, tal como un anticuerpo anti-IgE. Haciendo referencia a la figura 2, en mastocitos y/o basófilos, la cascada de señalización de FcεRI que conduce a la desgranulación puede dividirse en dos fases: anterior y posterior. La fase de anterior incluye todos los procesos que se producen antes de la movilización del ion calcio (ilustrado como “Ca²⁺” en la figura 2; véase también la figura 3). La fase posterior incluye movilización del ion calcio y todos los procesos posteriores a la misma. Los compuestos que inhiben la desgranulación mediada por FcεRI pueden actuar en cualquier punto a lo largo de la cascada de transducción de señales mediada por FcεRI. Los compuestos que inhiben selectivamente la desgranulación mediada por FcεRI aguas arriba actúan para inhibir la parte de la cascada de señalización de FcεRI anterior al punto en el que se induce la movilización del ion calcio. En ensayos basados en células, los compuestos que inhiben selectivamente la desgranulación mediada por FcεRI aguas arriba inhiben la desgranulación de células tales como mastocitos o basófilos que se activan o se estimulan con un alérgeno específico de IgE o agente de unión (tal como un anticuerpo anti-IgE) pero no inhiben de manera apreciable la desgranulación de células que se activan o se estimulan con agentes de desgranulación que evitan la ruta de señalización de FcεRI, tales como, por ejemplo los ionóforos de calcio ionomicina y A23187.

40 “Desgranulación inducida por IgG” o “desgranulación mediada por FcγRI” se refiere a desgranulación que avanza a través de la cascada de transducción de señales de FcγRI iniciada mediante reticulación de IgG unida a FcγRI. La reticulación puede inducirse mediante un alérgeno específico de IgG u otro agente de unión multivalente, tal como un anticuerpo anti-IgG o fragmento. Como la cascada de señalización de FcεRI, en mastocitos y basófilos la cascada de señalización de FcγRI también conduce a desgranulación que puede dividirse en las mismas dos fases: anterior y posterior. Similar a la desgranulación mediada por FcεRI, los compuestos que inhiben selectivamente la desgranulación mediada por FcγRI aguas arriba actúan antes del punto en el que se induce la movilización del ion calcio. En ensayos basados en células, los compuestos que inhiben selectivamente la desgranulación mediada por FcγRI aguas arriba inhiben la desgranulación de células tales como mastocitos o basófilos que se activan o se estimulan con un alérgeno específico de IgG o agente de unión (tal como un anticuerpo anti-IgG o fragmento) pero no inhiben de manera apreciable la desgranulación de células que se activan o se estimulan con agentes de desgranulación que evitan la ruta de señalización de FcγRI, tales como, por ejemplo los ionóforos de calcio ionomicina y A23187.

55 “Desgranulación inducida por ionóforo” o “desgranulación mediada por ionóforo” se refiere a desgranulación de una célula, tal como un mastocito o basófilo, que se produce tras la exposición de un ionóforo de calcio tal como, por ejemplo, ionomicina o A23187.

60 “Cinasas Syk” se refiere a la proteína tirosina cinasa del bazo no receptora (citoplásmica) de 72 kDa bien conocida expresada en células B y otras células hematopoyéticas. cinasa Syk incluye dos dominios de homología Src 2 (SH2) consenso en tándem que se unen a motivos de activación basados en tirosina de inmunorreceptor (“ITAM”) fosforilados, un dominio “ligador” y un dominio catalítico (para una revisión de la estructura y función de cinasa Syk véase Sada *et al.*, 2001, J. Biochem. (Tokio) 130:177-186); véase también Turner *et al.*, 2000, Immunology Today 21:148-154). La cinasa Syk se ha estudiado exhaustivamente como un efector de la señalización del receptor de células B (BCR) (Turner *et al.*, 2000, citado anteriormente). La cinasa Syk también es crítica para la fosforilación de tirosina de múltiples proteínas que regulan importantes rutas a partir de inmunorreceptores, tales como las cascadas

de movilización de Ca^{2+} y de proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK) (véase, por ejemplo, la figura 2) y desgranulación. La cinasa Syk también desempeña un papel crítico en la señalización de integrinas en neutrófilos (véase, por ejemplo, Mocsai *et al.*, 2002, *Immunity* 16:547-558).

5 Tal como se usa en el presente documento, cinasa Syk incluye cinasas de cualquier especie de animal, incluyendo, pero sin limitarse a, *Homo sapiens*, simio, bovino, porcino, roedor, etc., reconocidas por pertenecer a la familia Syk. Específicamente se incluyen isoformas, variantes de corte y empalme, variantes alélicas, mutantes, tanto que se producen de manera natural como hechas por el hombre. Las secuencias de aminoácidos de tales cinasas Syk se conocen bien y están disponibles de GENBANK. Ejemplos específicos de ARNm que codifican para diferentes
 10 isoformas de cinasa Syk humana pueden encontrarse en n.º de registro de GENBANK gi|21361552|ref|NM003177.2|, gi|496899|emb|Z29630.1|HSSYKPTK[496899] y gi|15030258|gb|BC011399.1|BC011399[15030258], que se incorporan en el presente documento como referencia.

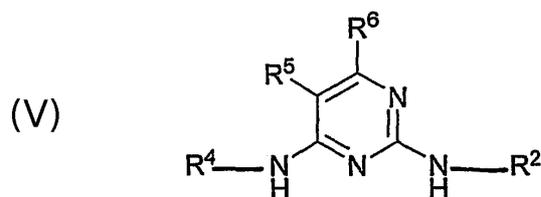
15 Los expertos apreciarán que tirosina cinasas que pertenecen a otras familias pueden tener sitios activos o cavidades de unión que son similares en la estructura tridimensional a la de Syk. Como consecuencia de esta similitud estructural, se espera que tales cinasas, denominadas en el presente documento "imitadoras de Syk", catalicen la fosforilación de sustratos fosforilados por Syk. Por tanto, se apreciará que tales imitadoras de Syk, cascadas de transducción de señales en las que tales imitadoras de Syk desempeñan un papel y respuestas biológicas provocadas mediante tales imitadoras de Syk y cascadas de señalización dependientes de las imitadoras de Syk,
 20 pueden regularse, y en particular inhibirse, con los compuestos de espiro-2,4-pirimidindiamina descritos en el presente documento.

"Cascada de señalización dependiente de Syk" se refiere a una cascada de transducción de señales en la que la cinasa Syk desempeña un papel. Los ejemplos no limitativos de tales cascadas de señalización dependientes de Syk incluyen las cascadas de señalización de $Fc\alpha RI$, $Fc\epsilon RI$, $Fc\gamma RI$, $Fc\gamma RI III$, BCR e integrina.

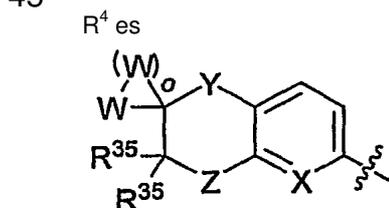
"Enfermedad autoinmunitaria" se refiere a las enfermedades que comúnmente están asociadas con las reacciones de hipersensibilidad no anafilácticas (reacciones de hipersensibilidad de tipo II, tipo III y/o tipo IV) que generalmente resultan como consecuencia de la respuesta inmunitaria mediada por células y/o humoral del propio sujeto a una o más sustancias inmunógenas de origen endógeno y/o exógeno. Tales enfermedades autoinmunitarias se distinguen de enfermedades asociadas con la reacción de hipersensibilidad anafiláctica (tipo I o mediada por IgE).

6.3 Compuestos de espiro-2,4-pirimidindiamina

35 Se proporcionan en el presente documento compuestos de espiro-2,4-pirimidindiamina según la fórmula estructural (V):



40 incluyendo sales, hidratos, solvatos y N-óxidos de los mismos, en los que:
 R² se selecciona del grupo que consiste en arilo (C₅-C₁₅) opcionalmente sustituido con uno o más de los grupos R⁸ iguales o diferentes (por ejemplo fenilo opcionalmente sustituido con uno o más de los grupos R⁸ iguales o diferentes) y heteroarilo de 5 a 15 miembros opcionalmente sustituido con uno o más de los grupos R⁸ iguales o diferentes;



50 cada W es, independientemente del otro, -CR³¹R³¹-;

X se selecciona del grupo que consiste en -N- y -CH-;

Y y Z se seleccionan cada uno independientemente entre sí del grupo que consiste en -O-, -S-, -SO-, -SO₂-,

-SONR³⁶-, -NH- y -NR³⁵-;

5 R⁵ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, -OR^d, -SR^d, haloalquiloxilo (C₁-C₃), perhaloalquiloxilo (C₁-C₃), -NR^cR^c, halógeno, haloalquilo (C₁-C₃), perhaloalquilo (C₁-C₃), -CF₃, -CH₂CF₃, -CF₂CF₃, -CN, -NC, -OCN, -SCN, -NO, -NO₂, -N₃, -S(O)R^d, -S(O)₂R^d, -S(O)₂OR^d, -S(O)NR^cR^c, -S(O)₂NR^cR^c, -OS(O)R^d, -OS(O)₂R^d, -OS(O)₂OR^d, -OS(O)NR^cR^c, -OS(O)₂NR^cR^c, -C(O)R^d, -C(O)OR^d, -C(O)NR^cR^c, -C(NH)NR^cR^c, -OC(O)R^d, -SC(O)R^d, -OC(O)OR^d, -SC(O)OR^d, -OC(O)NR^cR^c, -SC(O)NR^cR^c, -OC(NH)NR^cR^c, -SC(NH)NR^cR^c, -[NHC(O)]_nR^d, -[NHC(O)]_nOR^d, -[NHC(O)]_nNR^cR^c y -[NHC(NH)]_nNR^cR^c, arilo (C₅-C₁₀) opcionalmente sustituido con uno o más de los grupos R⁸ iguales o diferentes (por ejemplo fenilo opcionalmente sustituido con uno o más de los grupos R⁸ iguales o diferentes), arilalquilo (C₆-C₁₆) opcionalmente sustituido con uno o más de los grupos R⁸ iguales o diferentes, heteroarilo de 5 a 10 miembros opcionalmente sustituido con uno o más de los grupos R⁸ iguales o diferentes y heteroarilalquilo de 6 a 16 miembros opcionalmente sustituido con uno o más de los grupos R⁸ iguales o diferentes, alquilo (C₁-C₆) opcionalmente sustituido con uno o más de los grupos R⁸ iguales o diferentes, alcanilo (C₁-C₄) opcionalmente sustituido con uno o más de los grupos R⁸ iguales o diferentes, alquínilo (C₂-C₄) opcionalmente sustituido con uno o más de los grupos R⁸ iguales o diferentes;

20 R⁶ se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, -OR^d, -SR^d, haloalquiloxilo (C₁-C₃), perhaloalquiloxilo (C₁-C₃), -NR^cR^c, halógeno, haloalquilo (C₁-C₃), perhaloalquilo (C₁-C₃), -CF₃, -CH₂CF₃, -CF₂CF₃, -CN, -NC, -OCN, -SCN, -NO, -NO₂, -N₃, -S(O)R^d, -S(O)₂R^d, -S(O)₂OR^d, -S(O)NR^cR^c, -S(O)₂NR^cR^c, -OS(O)R^d, -OS(O)₂R^d, -OS(O)₂OR^d, -OS(O)NR^cR^c, -OS(O)₂NR^cR^c, -C(O)R^d, -C(O)OR^d, -C(O)NR^cR^c, -C(NH)NR^cR^c, -OC(O)R^d, -SC(O)R^d, -OC(O)OR^d, -SC(O)OR^d, -OC(O)NR^cR^c, -SC(O)NR^cR^c, -OC(NH)NR^cR^c, -SC(NH)NR^cR^c, -[NHC(O)]_nR^d, -[NHC(O)]_nOR^d, -[NHC(O)]_nNR^cR^c y -[NHC(NH)]_nNR^cR^c, arilo (C₅-C₁₀) opcionalmente sustituido con uno o más de los grupos R⁸ iguales o diferentes (por ejemplo fenilo opcionalmente sustituido con uno o más de los grupos R⁸ iguales o diferentes), arilalquilo (C₆-C₁₆) opcionalmente sustituido con uno o más de los grupos R⁸ iguales o diferentes, heteroarilo de 5 a 10 miembros opcionalmente sustituido con uno o más de los grupos R⁸ iguales o diferentes y heteroarilalquilo de 6 a 16 miembros opcionalmente sustituido con uno o más de los grupos R⁸ iguales o diferentes;

30 R⁸ se selecciona del grupo que consiste en R^a, R^b, R^a sustituido con uno o más de R^a o R^b iguales o diferentes, -OR^a sustituido con uno o más de R^a o R^b iguales o diferentes, -B(OR^a)₂, -B(NR^cR^c)₂, -(CH₂)_mR^b, -(CHR^a)_mR^b, -O-(CH₂)_mR^b, -S-(CH₂)_mR^b, -O-CHR^aR^b, -O-CR^a(R^b)₂, -O-(CHR^a)_mR^b, -O-(CH₂)_m-CH[(CH₂)_mR^b] R^b, -S-(CHR^a)_mR^b, -C(O)NH-(CH₂)_mR^b, -C(O)NH-(CHR^a)_mR^b, -O-(CH₂)_m-C(O)NH-(CH₂)_mR^b, -S-(CH₂)_m-C(O)NH-(CH₂)_mR^b, -O-(CHR^a)_m-C(O)NH-(CHR^a)_mR^b, -S-(CHR^a)_m-C(O)NH-(CHR^a)_mR^b, -NH-(CH₂)_mR^b, -NH-(CHR^a)_mR^b, -NH[(CH₂)_mR^b], -N[(CH₂)_mR^b]₂, -NH-C(O)-NH-(CH₂)_mR^b, -NH-C(O)-(CH₂)_m-CHR^aR^b y -NH-(CH₂)_m-C(O)-NH-(CH₂)_mR^b;

35 cada R³¹ es, independientemente de los demás, hidrógeno o alquilo (C₁-C₆) opcionalmente sustituido con uno o más de los grupos R⁸ iguales o diferentes;

40 cada R³⁵ se selecciona independientemente del otro del grupo que consiste en hidrógeno y R⁸, o, alternativamente, los dos grupos R³⁵ se toman juntos para formar un grupo oxo (=O), o =NR³⁸;

cada R³⁶ se selecciona independientemente de los demás del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo (C₁-C₆);

45 R³⁸ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo (C₁-C₆) y arilo (C₅-C₁₄);

50 cada R^a se selecciona independientemente de los demás del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo (C₁-C₆), cicloalquilo (C₃-C₈), ciclohexilo, cicloalquilalquilo (C₄-C₁₁), arilo (C₅-C₁₀) (por ejemplo fenilo), arilalquilo (C₆-C₁₆) (por ejemplo bencilo), heteroalquilo de 2 a 6 miembros, cicloheteroalquilo de 3 a 8 miembros (por ejemplo morfolinilo, piperazinilo, homopiperazinilo, piperidinilo), cicloheteroalquilalquilo de 4 a 11 miembros, heteroarilo de 5 a 10 miembros y heteroarilalquilo de 6 a 16 miembros;

55 cada R^b se selecciona independientemente de los demás del grupo que consiste en =O, -OR^d, haloalquiloxilo (C₁-C₃), -OCF₃, =S, -SR^d, =NR^d, =NOR^d, NR^cR^c, halógeno, -CF₃, -CN, -NC, -OCN, -SCN, -NO, -NO₂, =N₂, -N₃, -S(O)R^d, -S(O)₂R^d, -S(O)₂OR^d, -S(O)NR^cR^c, -S(O)₂NR^cR^c, -OS(O)R^d, -OS(O)₂R^d, -OS(O)₂OR^d, -OS(O)₂NR^cR^c, -C(O)R^d, -C(O)OR^d, -C(O)NR^cR^c, -C(NH)NR^cR^c, -C(NR^a)NR^cR^c, -C(NOH)R^a, -C(NOH)NR^cR^c, -OC(O)R^d, -OC(O)OR^d, -OC(O)NR^cR^c, -OC(NH)NR^cR^c, -OC(NR^a)NR^cR^c, -[NHC(O)]_nR^d, -[NR^aC(O)]_nR^d, -[NHC(O)]_nOR^d, -[NR^aC(O)]_nOR^d, -[NHC(O)]_nNR^cR^c, -[NR^aC(O)]_nNR^cR^c, -[NHC(NH)]_nNR^cR^c, y -[NR^aC(NR^a)]_nNR^cR^c;

60 cada R^c es, independientemente de los demás, R^a, o, alternativamente, cada R^c se toma junto con el átomo de nitrógeno al que está unido para formar un cicloheteroalquilo o heteroarilo de 5 a 8 miembros que puede incluir opcionalmente uno o más de los heteroátomos adicionales iguales o diferentes y que puede estar opcionalmente sustituido con uno o más de los grupos R^a o R^b adecuados iguales o diferentes;

65 cada R^d es, independientemente de los demás, R^a;

cada m es, independientemente de los demás, un número entero desde 1 hasta 3;

cada n es, independientemente de los demás, un número entero desde 0 hasta 3; y

es un número entero desde 1 hasta 6.

5 En las realizaciones anteriores, los grupos R^a específicos que pueden incluirse en los grupos R^9 se seleccionan del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo (C_1 - C_6), fenilo y bencilo.

10 En algunas realizaciones de compuestos de fórmula estructural (V), R^5 es halo, fluoro o $-CF_3$. En otras realizaciones, R^5 es fluoro.

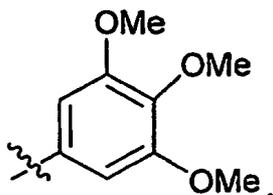
15 En algunas realizaciones de los compuestos de fórmula estructural (V), R^6 es hidrógeno. En otras realizaciones, Y y Z se seleccionan independientemente del grupo que consiste en $-O-$ y $-NH-$. En algunas otras realizaciones, X es $-CH-$. Todavía en otras realizaciones, Y es $-O-$ y Z es $-NH-$.

En algunas realizaciones de los compuestos de fórmula estructural (V), cada R^{35} es hidrógeno. En otras realizaciones, los dos grupos R^{35} forman un grupo oxo.

20 En algunas realizaciones de los compuestos de fórmula estructural (V), o es un número entero desde 1 hasta 4. En otras realizaciones, o es 1.

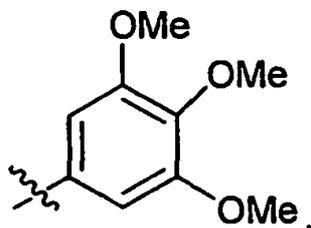
En algunas realizaciones de fórmula estructural (V), cada R^{31} es independientemente hidrógeno o alquilo (C_1 - C_6). En otras realizaciones, cada R^{31} es hidrógeno.

25 En algunas realizaciones de fórmula estructural (V), R^2 es fenilo opcionalmente sustituido con uno o más de los grupos R^8 iguales o diferentes. En otras realizaciones, R^2 es un grupo fenilo disustituido con dos grupos R^b o R^2 es un grupo fenilo trisustituido con tres grupos R^b . Todavía en otras realizaciones, R^2 es

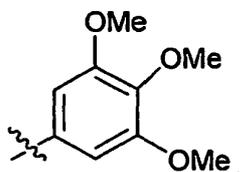


30 En algunas realizaciones de fórmula estructural (V), R^5 es halo, fluoro o $-CF_3$ y R^6 es hidrógeno. En otras realizaciones, R^5 es fluoro y R^6 es hidrógeno. Todavía en otras realizaciones, los dos grupos R^{35} forman un grupo oxo, Y es O, Z es NH, X es CH y cada R^{31} es hidrógeno. Todavía en otras realizaciones, R^5 es fluoro y R^6 es hidrógeno.

35 En algunas realizaciones de fórmula estructural (V), R^2 es fenilo opcionalmente sustituido con uno o más de los grupos R^8 iguales o diferentes. En otras realizaciones, R^2 es un grupo fenilo disustituido con dos grupos R^b o R^2 es un grupo fenilo trisustituido con tres grupos R^b . Todavía en otras realizaciones, R^2 es



40 Todavía en otras realizaciones, o es 1. Todavía en otras realizaciones, R^2 es fenilo opcionalmente sustituido con uno o más de los grupos R^8 iguales o diferentes. Todavía en otras realizaciones, R^2 es un grupo fenilo disustituido con dos grupos R^b o R^2 es un grupo fenilo trisustituido con tres grupos R^b . Todavía en otras realizaciones, R^2 es



45 También se describen específicamente combinaciones de las realizaciones anteriores.

Los expertos en la técnica apreciarán que los compuestos de espiro-2,4-pirimidindiamina descritos en el presente documento pueden incluir grupos funcionales que pueden enmascarse con progrupos para crear profármacos. Habitualmente, pero no necesariamente, tales profármacos son farmacológicamente inactivos hasta convertirse en su forma de fármaco activo. Por ejemplo, grupos éster comúnmente experimentan hidrólisis catalizada por ácido para proporcionar el ácido carboxílico original cuando se exponen a las condiciones ácidas del estómago, o hidrólisis catalizada por base cuando se exponen a las condiciones básicas del intestino o la sangre. Por tanto, cuando se administran a un sujeto por vía oral, las 2,4-pirimidindiaminas que incluyen restos éster pueden considerarse profármacos de su correspondiente ácido carboxílico, independientemente de si la forma de éster es farmacológicamente activa.

En los profármacos descritos en el presente documento, cualquier resto funcional disponible puede enmascarse con un progrupo para proporcionar un profármaco. Los grupos funcionales dentro de los compuestos de espiro-2,4-pirimidindiamina que pueden enmascarse con progrupos para su inclusión en un proresto incluyen, pero no se limitan a, aminas (primaria y secundaria), hidroxilos, sulfanilos (tioles), carboxilos, etc. Se conoce en la técnica una mirada de progrupos adecuados para enmascarar tales grupos funcionales para proporcionar prorestos que pueden escindirse en las condiciones de uso deseadas. Todos estos progrupos, solos o en combinaciones, pueden incluirse en los profármacos descritos en el presente documento.

En algunas realizaciones, los profármacos son compuestos análogos a los de fórmula estructural (V) en los que R^c y R^d pueden ser un progrupo.

Los expertos en la técnica apreciarán que muchos de los compuestos y profármacos descritos en el presente documento, así como las diversas especies de compuestos específicamente descritos y/o ilustrados en el presente documento, pueden presentar los fenómenos de tautomerismo, isomerismo conformacional, isomerismo geométrico y/o isomerismo óptico. Por ejemplo, los compuestos y profármacos descritos en el presente documento pueden incluir uno o más centros quirales y/o dobles enlaces y como consecuencia pueden existir como estereoisómeros, tales como isómeros de dobles enlaces (es decir, isómeros geométricos), enantiómeros y diastereómeros y mezclas de los mismos, tales como mezclas racémicas. Como otro ejemplo, los compuestos y profármacos descritos en el presente documento pueden existir en varias formas tautoméricas, incluyendo, por ejemplo, la forma enólica, la forma ceto y mezclas de las mismas. Como los diversos nombres de compuestos, fórmulas y dibujos de compuestos dentro de la memoria descriptiva y reivindicaciones pueden representar sólo uno de los posibles tautómeros, isómeros conformacionales, isómeros ópticos o isómeros geométricos, debe entenderse que los compuestos o profármacos descritos en el presente documento incluyen todos los posibles tautómeros, isómeros conformacionales, isómeros ópticos y/o isómeros geométricos, así como mezclas de estos diversos isómeros diferentes. En casos de rotación limitada alrededor de la estructura de núcleo de 2,4-pirimidindiamina, también son posibles atropisómeros y también se incluyen específicamente en los compuestos descritos en el presente documento.

Además, los expertos apreciarán que cuando las listas de sustituyentes alternativos incluyen miembros que, debido a los requisitos de valencia u otros motivos, no pueden usarse para sustituir un grupo particular, se pretende que se lea la lista en el contexto para incluir los miembros de la lista que son adecuados para sustituir el grupo particular. Por ejemplo, los expertos en la técnica apreciarán que aunque todas las alternativas indicadas para R^b pueden usarse para sustituir un grupo alquilo, algunas de las alternativas, tales como =O, no pueden usarse para sustituir un grupo fenilo. Debe entenderse que sólo se pretenden las combinaciones posibles de pares de sustituyente-grupo.

Los compuestos y/o profármacos descritos en el presente documento pueden identificarse mediante o bien su estructura química o bien su nombre químico. Cuando la estructura química y el nombre químico entran en conflicto, la estructura química es determinativa de la identidad del compuesto específico.

Dependiendo de la naturaleza de los diversos sustituyentes, los compuestos de espiro-2,4-pirimidindiamina y profármacos descritos en el presente documento pueden estar en forma de sales. Tales sales incluyen sales adecuadas para usos farmacéuticos ("sales farmacéuticamente aceptables"), sales adecuadas para usos veterinarios, etc. Tales sales pueden derivarse de ácidos o bases, tal como se conoce bien en la técnica.

En algunas realizaciones, la sal es una sal farmacéuticamente aceptable. Generalmente, las sales farmacéuticamente aceptables son las sales que retienen sustancialmente una o más de las actividades farmacológicas deseadas del compuesto original y que son adecuadas para la administración a seres humanos. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de adición de ácido formadas con ácidos inorgánicos o ácidos orgánicos. Los ácidos inorgánicos adecuados para formar sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables incluyen, a modo de ejemplo y no de limitación, hidrácidos halogenados (por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido yodhídrico, etc.), ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, y similares. Los ácidos orgánicos adecuados para formar sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables incluyen, a modo de ejemplo y no de limitación, ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido propiónico, ácido hexanoico, ácido ciclopentanopropiónico, ácido glicólico, ácido oxálico, ácido pirúvico, ácido láctico, ácido malónico, ácido succínico, ácido málico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido palmítico, ácido benzoico, ácido 3-(4-

5 hidroxibenzoil)benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácidos alquilsulfónicos (por ejemplo, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido 1,2-etano-disulfónico, ácido 2-hidroxietanosulfónico, etc.), ácidos arilsulfónicos (por ejemplo, ácido benzenosulfónico, ácido 4-clorobenzenosulfónico, ácido 2-naftalenosulfónico, ácido 4-toluenosulfónico), ácidos cicloalquilsulfónicos (por ejemplo, ácido canforsulfónico), ácido 4-metilbicyclo[2.2.2]oct-2-eno-1-carboxílico, ácido glucoheptónico, ácido 3-fenilpropiónico, ácido trimetilacético, ácido terc-butilacético, ácido laurilsulfúrico, ácido glucónico, ácido glutámico, ácido hidroxinaftoico, ácido salicílico, ácido esteárico, ácido mucónico, y similares.

10 Sales farmacéuticamente aceptables también incluyen sales formadas cuando un protón ácido presente en el compuesto original o bien se sustituye por un ion metálico (por ejemplo, un ion de metal alcalino, un ion de metal alcalinotérreo o un ion de aluminio), un ion de amonio o bien se coordina con una base orgánica (por ejemplo, etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, N-metilglucamina, morfolina, piperidina, dimetilamina, dietilamina, etc.).

15 Los compuestos de espiro-2,4-pirimidindiamina descritos en el presente documento así como las sales de los mismos, también pueden estar en forma de hidratos, solvatos y N-óxidos, tal como se conocen bien en la técnica.

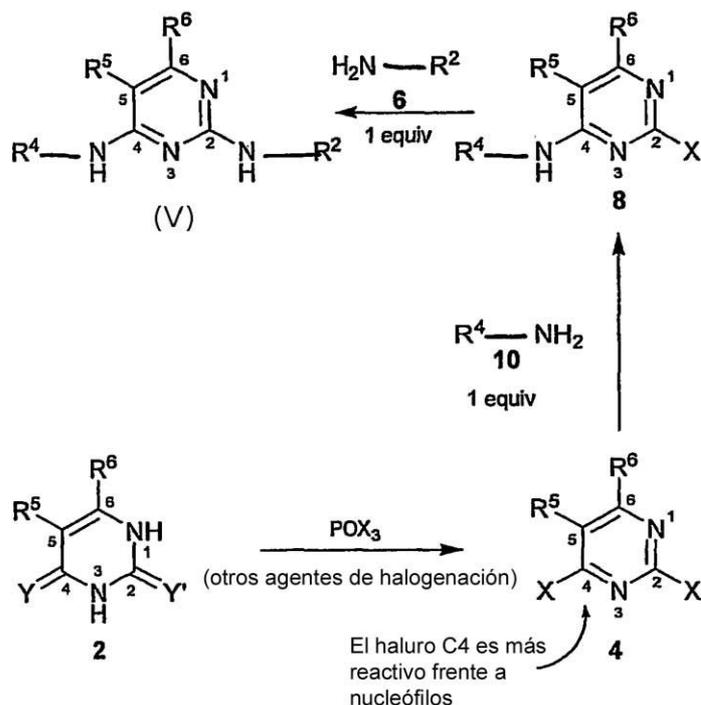
6.4 Métodos de síntesis

20 Los compuestos y profármacos descritos pueden sintetizarse mediante una variedad de vías sintéticas diferentes usando materiales de partida comercialmente disponibles y/o materiales de partida preparados mediante métodos sintéticos convencionales. Métodos a modo de ejemplo adecuados que pueden adaptarse de manera rutinaria para sintetizar compuestos de 2,4-pirimidindiamina y profármacos descritos en el presente documento se encuentran en la patente estadounidense n.º 5.958.935, solicitud de patente estadounidense con n.º de serie 10/355.543, presentada el 31 de enero de 2003 (publicación estadounidense n.º US20040029902-A1), publicación internacional n.º WO 03/063794, solicitud de patente estadounidense con n.º de serie 10/631.029, presentada el 29 de julio de 2003 y publicación internacional n.º WO 2004/014382, publicada el 19 de febrero de 2004.

30 En los esquemas (I)-(VIII) a continuación se describe una variedad de vías sintéticas a modo de ejemplo que pueden usarse para sintetizar compuestos de espiro-2,4-pirimidindiamina. En los esquemas (I)-(VIII), los compuestos con números iguales tienen estructuras similares. Estos métodos pueden adaptarse de manera rutinaria para sintetizar los profármacos según la fórmula estructural (II).

35 En una realización a modo de ejemplo, los compuestos pueden sintetizarse a partir de uracilos o tiouracilos sustituidos o no sustituidos tal como se ilustra en el esquema (I), a continuación:

Esquema (I)



En el esquema (I), R², R⁴, R⁵ y R⁶ son tal como se definieron anteriormente para la fórmula estructural (V), X es un halógeno (por ejemplo, F, Cl, Br o I) e Y e Y' se seleccionan cada uno independientemente del otro del grupo que consiste en O y S. Haciendo referencia al esquema (I), se dihalogena uracilo o tiouracilo 2 en las posiciones 2 y 4 usando un agente de halogenación convencional POX₃ (u otro agente de halogenación convencional) en condiciones convencionales para proporcionar 2,4-bis-halo-pirimidina 4. Dependiendo del sustituyente R⁵, en la pirimidina 4, el haluro en la posición C4 es más reactivo frente a nucleófilos que el haluro en la posición C2. Esta reactividad diferencial puede aprovecharse para sintetizar 2,4-pirimidindiaminas según la fórmula estructural (V) haciendo reaccionar en primer lugar 2,4-bis-halopirimidina 4 con un equivalente de amina 10, proporcionando 4N-sustituido-2-halo-4-pirimidinamina 8, seguido por amina 6 para proporcionar una 2,4-pirimidindiamina según la fórmula estructural (V).

En la mayoría de las situaciones, el haluro C4 es más reactivo frente a nucleófilos, tal como se ilustra en el esquema. Sin embargo, tal como reconocerán los expertos en la técnica, la identidad del sustituyente R⁵ puede alterar esta reactividad. Por ejemplo, cuando R⁵ es trifluorometilo, se obtiene una mezcla 50:50 de 4N-sustituido-4-pirimidinamina 8 y la correspondiente 2N-sustituido-2-pirimidinamina. Independientemente de la identidad del sustituyente R⁵, la regioselectividad de la reacción puede controlarse ajustando el disolvente y otras condiciones sintéticas (tales como la temperatura), tal como se conoce bien en la técnica.

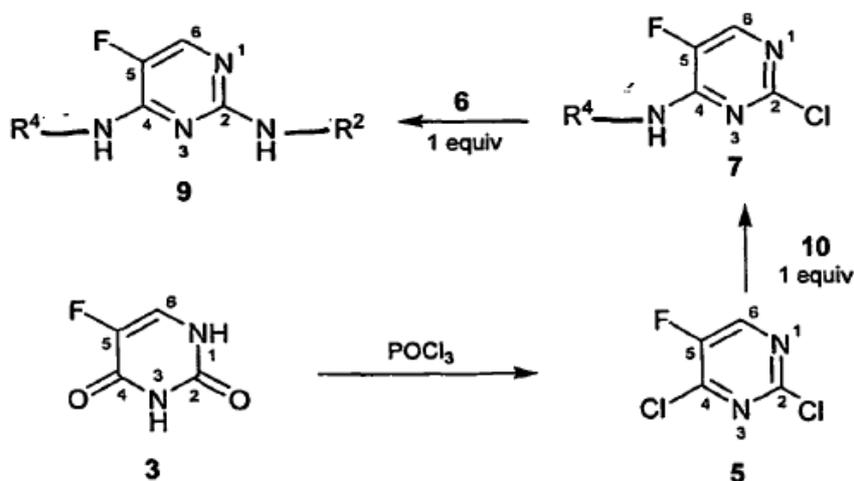
Las reacciones representadas en el esquema (I) pueden avanzar más rápidamente cuando se calientan las mezclas de reacción mediante microondas. Cuando se calienta de esta manera, pueden usarse las siguientes condiciones: calentar hasta 175°C en etanol durante 5-20 min. en un reactor de Smith (Personal Chemistry) en un tubo sellado (a 20 bares de presión).

Los materiales de partida de uracilo o tiouracilo 2 pueden adquirirse de fuentes comerciales o prepararse usando técnicas convencionales de química orgánica. Uracilos y tiouracilos comercialmente disponibles que pueden usarse como materiales de partida en el esquema (I) incluyen, a modo de ejemplo y no de limitación, uracilo (Aldrich n.º 13.078-8; registro CAS 66-22-8); 2-tio-uracilo (Aldrich n.º 11.558-4; registro CAS 141-90-2); 2,4-ditiouracilo (Aldrich n.º 15,846-1; registro CAS 2001-93-6); 5-acetouracilo (Chem. Sources Int'l 2000; registro CAS 6214-65-9); 5-azidouracilo; 5-aminouracilo (Aldrich n.º 85.528-6; registro CAS 932-52-5); 5-bromouracilo (Aldrich n.º 85.247-3; registro CAS 51-20-7); 5-(trans-2-bromovinil)-uracilo (Aldrich n.º 45.744-2; registro CAS 69304-49-0); 5-(trans-2-clorovinil)-uracilo (registro CAS 81751-48-2); 5-(trans-2-carboxivinil)-uracilo; ácido uracil-5-carboxílico (ácido 2,4-dihidroxipirimidina-5-carboxílico hidratado; Aldrich n.º 27.770-3; registro CAS 23945-44-0); 5-clorouracilo (Aldrich n.º 22.458-8; registro CAS 1820-81-1); 5-cianouracilo (Chem. Sources Int'l 2000; registro CAS 4425-56-3); 5-etiluracilo (Aldrich n.º 23,044-8; registro CAS 4212-49-1); 5-eteniluracilo (registro CAS 37107-81-6); 5-fluorouracilo (Aldrich n.º 85.847-1; registro CAS 51-21-8); 5-yodouracilo (Aldrich n.º 85.785-8; registro CAS 696-07-1); 5-metiluracilo (timina; Aldrich n.º 13.199-7; registro CAS 65-71-4); 5-nitouracilo (Aldrich n.º 85.276-7; registro CAS 611-08-5); ácido uracil-5-sulfámico (Chem. Sources Int'l 2000; registro CAS 5435-16-5); 5-(trifluorometil)-uracilo (Aldrich n.º 22.327-1; registro CAS 54-20-6); 5-(2,2,2-trifluoroetil)-uracilo (registro CAS 155143-31-6); 5-(pentafluoroetil)-uracilo (registro CAS 60007-38-3); 6-aminouracilo (Aldrich n.º A5060-6; registro CAS 873-83-6) ácido uracil-6-carboxílico (ácido orótico; Aldrich n.º 0-840-2; registro CAS 50887-69-9); 6-metiluracilo (Aldrich n.º D11.520-7; registro CAS 626-48-2); ácido uracil-5-amino-6-carboxílico (ácido 5-aminoorótico; Aldrich n.º 19.121-3; n.º de registro CAS 7164-43-4); 6-amino-5-nitrosouracilo (6-amino-2,4-dihidroxi-5-nitrosopirimidina; Aldrich n.º 27.689-8; registro CAS 5442-24-0); ácido uracil-5-fluoro-6-carboxílico (ácido 5-fluoorótico; Aldrich n.º 42.513-3; registro CAS 00000-00-0); y ácido uracil-5-nitro-6-carboxílico (ácido 5-nitroorótico; Aldrich n.º 18.528-0; registro CAS 600779-49-9). Hay uracilos y/o tiouracilos 5, 6 y 5,6-sustituidos adicionales disponibles de General Intermediates of Canada, Inc., Edmonton, Alberta, CA y/o Interchim, Francia o pueden prepararse usando técnicas convencionales. Más adelante se proporciona una mirada de referencias a libros de textos que enseñan métodos sintéticos adecuados.

Pueden adquirirse aminas 10 de fuentes comerciales o, alternativamente, pueden sintetizarse usando técnicas convencionales. Por ejemplo, pueden sintetizarse aminas adecuadas a partir de precursores nitro usando química convencional. Véase también Vogel, 1989, Practical Organic Chemistry, Addison Wesley Longman, Ltd. y John Wiley & Sons, Inc. Las aminas 6 pueden sintetizarse tal como se describe, más adelante, en los esquemas (VII) y (VIII).

En el esquema (Ia), a continuación, se ilustra una realización específica del esquema (I) usando 5-fluorouracilo (Aldrich n.º 32.937-1) como material de partida:

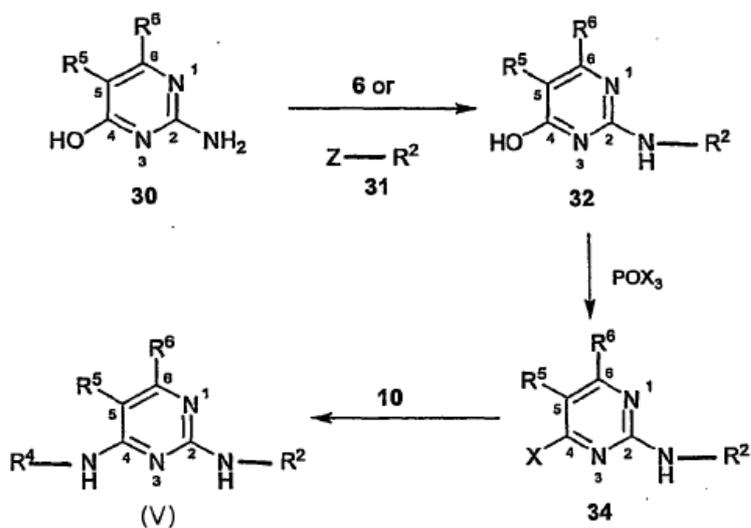
Esquema (Ia)



En el esquema (Ia), R² y R⁴ son tal como se definieron anteriormente para el esquema (I). Según el esquema (Ia), se halogena 5-fluorouracilo 3 con POCl₃ para proporcionar 2,4-dicloro-5-fluoropirimidina 5. La reacción de 2,4-dicloro-5-fluoropirimidina 5 con un equivalente de amina 10 (para proporcionar 2-cloro-N⁴-sustituido-5-fluoro-4-pirimidinamina 7) seguido por uno o más equivalentes de amina 6.

Todavía en otra realización a modo de ejemplo, los compuestos de 2,4-pirimidindiamina de la invención pueden sintetizarse a partir de 2-amino-4-pirimidinoles sustituidos o no sustituidos tal como se ilustra en el esquema (II), a continuación:

Esquema (II)



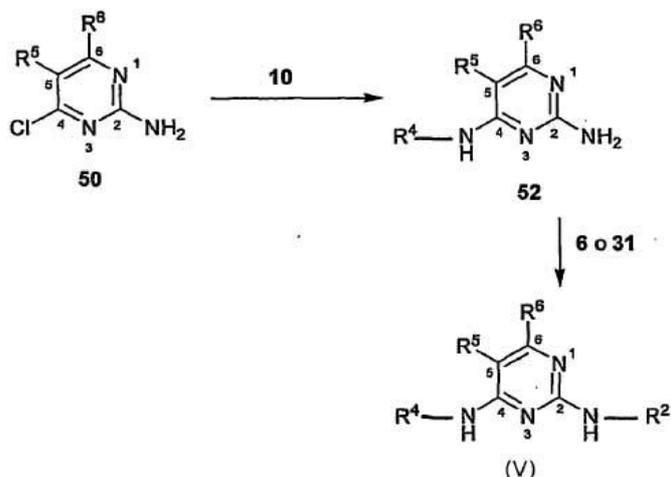
En el esquema (II), R², R⁴, R⁵ y R⁶ y X son tal como se definieron anteriormente para el esquema (I) y Z es un grupo saliente tal como se comenta con más detalle en relación con el esquema III, más adelante. Haciendo referencia al esquema (II), se hace reaccionar 2-amino-4-pirimidinol 30 con amina 6 (o amina 21 opcionalmente protegida) para proporcionar N²-sustituido-4-pirimidinol 32, que entonces se halogena tal como se describió anteriormente para proporcionar N²-sustituido-4-halo-2-pirimidinamina 34. La desprotección opcional (por ejemplo si se usó amina 21 protegida en la primera etapa) seguida por reacción con amina 10 proporciona una 2,4-pirimidindiamina según la fórmula estructural (V). Alternativamente, puede hacerse reaccionar pirimidinol 30 con un agente de acilación 31.

Los 2-amino-4-pirimidinoles 30 comercialmente disponibles adecuados que pueden usarse como materiales de partida en el esquema (III) incluyen, pero no se limitan a, hidrato de 2-amino-6-cloro-4-pirimidinol (Aldrich n.º A4702-8; registro CAS 00000-00-0) y 2-amino-6-hidroxi-4-pirimidinol (Aldrich n.º A5040-1; registro CAS 56-09-7). Otros 2-amino-4-pirimidinoles 30 útiles como materiales de partida en el esquema (III) están disponibles de General Intermediates of Canada, Inc., Edmonton, Alberta, CA y/o Interchim, Francia o pueden prepararse usando técnicas convencionales. Más adelante se proporciona una miríada de referencias a libros de texto que enseñan métodos sintéticos adecuados.

Aún en otra realización a modo de ejemplo, los compuestos de 2,4-pirimidindiamina de la invención pueden prepararse a partir de 2-cloro-4-aminopirimidinas o 2-amino-4-cloropirimidinas tal como se ilustra en el esquema (III), a continuación:

5

Esquema (III)



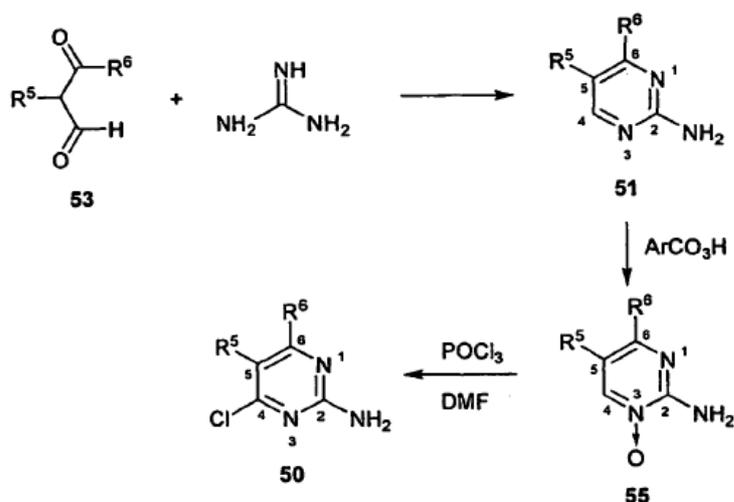
- 10 En el esquema (III), R², R⁴, R⁵ y R⁶ son tal como se definieron para el esquema (I) y Z es un grupo saliente tal como, por ejemplo, un halógeno, metanosulfonyloxilo, trifluorometanosulfonyloxilo, p-toluenosulfonyloxilo, bencenosulfonyloxilo, etc. Haciendo referencia al esquema (III), se hace reaccionar 2-amino-4-cloropirimidina 50 con
- 15 2-cloro-4-amino-pirimidina 54 con el compuesto 44 seguido por amina 6 para proporcionar un compuesto según la fórmula estructural (V).

Una variedad de pirimidinas 50 y 54 adecuadas para su uso como materiales de partida en el esquema (V) están comercialmente disponibles, incluyendo a modo de ejemplo y no de limitación, 2-amino-4,6-dicloropirimidina (Aldrich n.º A4860-1; registro CAS 56-05-3); 2-amino-4-cloro-6-metoxi-pirimidina (Aldrich n.º 51.864-6; registro CAS 5734-64-5); 2-amino-4-cloro-6-metilpirimidina (Aldrich n.º 12.288-2; registro CAS 5600-21-5); y 2-amino-4-cloro-6-metiltiopirimidina (Aldrich n.º A4600-5; registro CAS 1005-38-5). Hay materiales de partida de pirimidina adicionales disponibles de General Intermediates of Canada, Inc., Edmonton, Alberta, CA y/o Interchim, Francia o pueden prepararse usando técnicas convencionales. Más adelante se proporciona una mirada de referencias a libros de

25 textos que enseñan métodos sintéticos adecuados.

Alternativamente, pueden prepararse 4-cloro-2-pirimidinaminas 50 tal como se ilustra en el esquema (IV):

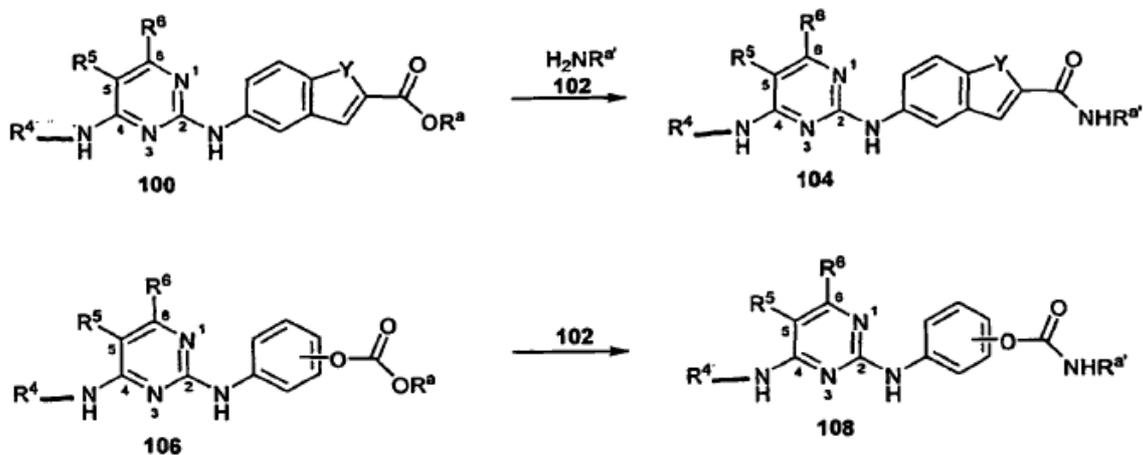
30 Esquema (IV)



En el esquema (IV), R^5 y R^6 son tal como se definieron anteriormente para la fórmula estructural (V). En el esquema (IV), se hace reaccionar dicarbonilo 53 con guanidina para proporcionar 2-pirimidinamina 51. La reacción con perácidos tales como ácido m-cloroperbenzoico, ácido trifluoroperacético o complejo de urea-peróxido de hidrógeno proporciona N-óxido 55, que entonces se halogena para dar 4-cloro-2-pirimidinamina 50. Las correspondientes 4-halo-2-pirimidinaminas pueden obtenerse usando reactivos de halogenación adecuados.

Tal como reconocerán los expertos en la técnica, también pueden usarse espiro-2,4-pirimidindiaminas, sintetizadas mediante métodos a modo de ejemplo descritos anteriormente o mediante otros medios bien conocidos, como materiales de partida y/o productos intermedios para sintetizar compuestos de espiro-2,4-pirimidindiamina adicionales. Un ejemplo específico se ilustra en el esquema (V), a continuación:

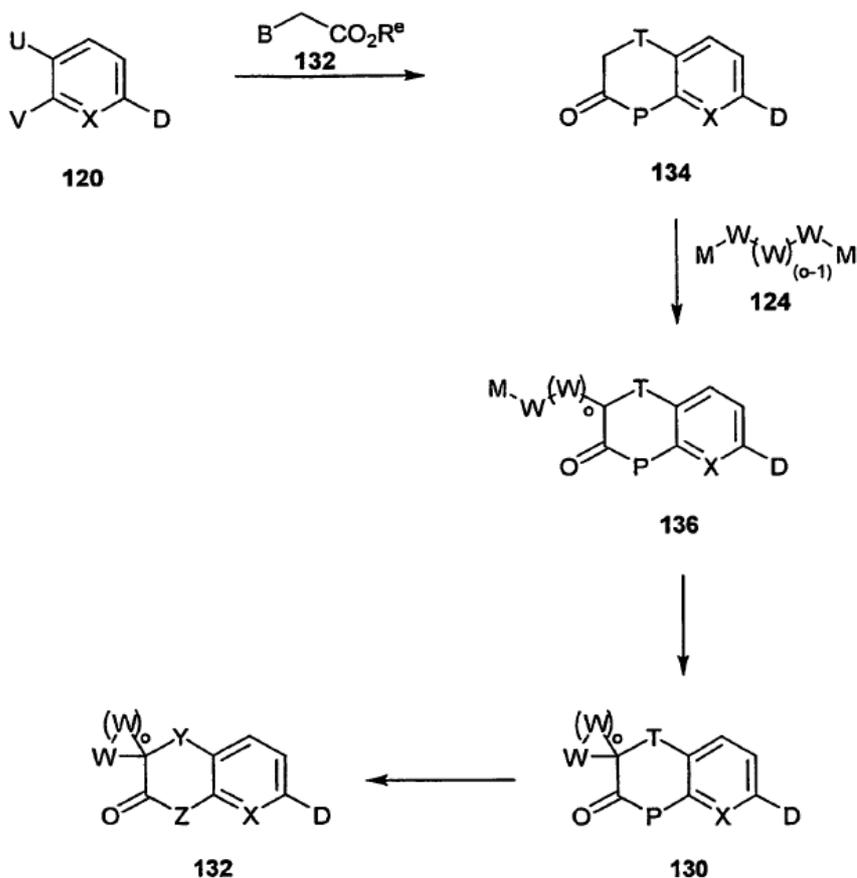
Esquema (V)



En el esquema (V), R^4 , R^5 , R^6 y R^a son tal como se definieron anteriormente para la fórmula estructural (V). Cada R^a es independientemente un R_a , y puede ser igual o diferente del R_a ilustrado. Haciendo referencia al esquema (V), puede convertirse ácido o éster carboxílico 100 en amida 104 mediante reacción con amina 102. En la amina 102, R_a puede ser igual o diferente de R_a del ácido o éster 100. De manera similar, puede convertirse éster carbonato 106 en carbamato 108.

Un segundo ejemplo específico se ilustra en el esquema (VI), a continuación:

Esquema (VI)



Haciendo referencia al esquema (VII), se alquila el compuesto 120 con éster 132 para proporcionar, tras la ciclación intramolecular, el producto de anelación 134. La alquilación de 134 con agente bifuncional 124 proporciona el producto de monoalquilo 136 que puede ciclarse intramolecularmente para proporcionar 130 que puede convertirse en compuesto 132 mediante métodos convencionales conocidos por el experto en la técnica. Por ejemplo, pueden convertirse sulfuros (es decir, en los que T y/o P son azufres) y aminas (es decir, en las que T y/o P son nitrógeno) en sulfóxidos, sulfonatos, sulfonamidas, alquilaminas, arilaminas y aminas protegidas mediante métodos sintéticos de rutina. Las diversas realizaciones de sustituyente D de compuesto 130 pueden interconvertirse, ya que H puede convertirse en NO₂ mediante nitración, NO₂ en NH₂ mediante reducción, etc. Finalmente, tal como también se conoce en la técnica, el grupo carbonilo en el compuesto 130 puede convertirse en el compuesto de dihidro mediante reducción con reactivos convencionales (por ejemplo, hidruro de litio y aluminio). En algunas realizaciones del compuesto 124, un M es halógeno y el otro M es OR^e. Por consiguiente en algunas realizaciones, el grupo M en el compuesto 136 o bien es un grupo saliente o bien puede convertirse en un grupo saliente (es decir, cuando M es OR^e) mediante métodos convencionales.

Aunque muchos de los esquemas sintéticos comentados anteriormente no ilustran el uso de grupos protectores, los expertos en la técnica reconocerán que en algunos casos los sustituyentes R², R⁴, R⁵ y/o R⁶ pueden incluir grupos funcionales que requieren protección. La identidad exacta del grupo protector usado dependerá, entre otras cosas, de la identidad del grupo funcional que está protegiéndose y las condiciones de reacción usadas en el esquema sintético particular, y resultará evidente para los expertos en la técnica. Pueden encontrarse directrices para seleccionar grupos protectores y químicas para su unión y eliminación adecuadas para una aplicación particular, por ejemplo, en Greene & Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3^a edición, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York (1999).

Pueden prepararse profármacos según la fórmula estructural (II) mediante modificación de rutina de los métodos descritos anteriormente. Alternativamente, tales profármacos pueden prepararse haciendo reaccionar una 2,4-pirimidindiamina protegida de manera adecuada de fórmula estructural (V) con un progrupo adecuado. Las condiciones para llevar a cabo tales reacciones y para desproteger el producto para proporcionar un profármaco de fórmula (II) se conocen bien.

En la técnica se conoce una miríada de referencias que enseñan métodos útiles para sintetizar pirimidinas de manera general, así como materiales de partida descritos en los esquemas (I)-(VIII). Para directrices específicas, se remite al lector a Brown, D. J., "The Pirimidines", en *The Chemistry of Heterocyclic Compounds*, volumen 16

(Weissberger, A., Ed.), 1962, Interscience Publishers, (una división de John Wiley & Sons), Nueva York ("Brown I"); Brown, D. J., "The Pirimidines", en The Chemistry of Heterocyclic Compounds, volumen 16, suplemento I (Weissberger, A. y Taylor, E. C., Ed.), 1970, Wiley-Interscience, (una división de John Wiley & Sons), Nueva York (Brown II"); Brown, D. J., "The Pirimidines", en The Chemistry of Heterocyclic compounds, volumen 16, suplemento II (Weissberger, A. y Taylor, E. C., Ed.), 1985, An Interscience Publication (John Wiley & Sons), Nueva York ("Brown III"); Brown, D. J., "The Pirimidines" en The Chemistry of Heterocyclic Compounds, volumen 52 (Weissberger, A. y Taylor, E. C., Ed.), 1994, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, págs. 1-1509 ("Brown IV"); Kenner, G. W. y Todd, A., en Heterocyclic Compounds, volumen 6, (Elderfield, R. C., Ed.), 1957, John Wiley, Nueva York, capítulo 7 (pirimidinas); Paquette, L. A., Principles of Modern Heterocyclic Chemistry, 1968, W. A. Benjamin, Inc., Nueva York, págs. 1 - 401 (síntesis de uracilo págs. 313, 315; síntesis de pirimidina págs. 313-316; síntesis de amino-pirimidina pág. 315); Joule, J. A., Mills, K. y Smith, G. F., Heterocyclic Chemistry, 3ª edición, 1995, Chapman and Hall, Londres, R.U., págs. 1 - 516; Vorbrüggen, H. y Ruh-Pohlentz, C., Handbook of Nucleoside Synthesis, John Wiley & Sons, Nueva York, 2001, págs. 1-631 (protección de pirimidinas mediante acilación págs. 90-91; sililación de pirimidinas págs. 91-93); Joule, J. A., Mills, K. y Smith, G. F., Heterocyclic Chemistry, 4ª edición, 2000, Blackwell Science, Ltd, Oxford, R.U., págs. 1 - 589; y Comprehensive Organic Synthesis, volúmenes 1-9 (Trost, B. M. y Fleming, I., Ed.), 1991, Pergamon Press, Oxford, R.U.

El experto en la técnica debe entender que en los esquemas I a VIII, el nitrógeno N4 puede estar sustituido con R^{4c} tal como se describe a lo largo de la memoria descriptiva y en los ejemplos proporcionados en el presente documento.

6.5 Inhibición de cascadas de señales de receptores de Fc

Los compuestos de espiro-2,4-pirimidindiamina activos descritos en el presente documento pueden inhibir cascadas de señalización de receptores de Fc que conducen, entre otras cosas, a desgranulación de células. Como ejemplo específico, los compuestos inhiben las cascadas de señales de FcεRI y/o FcγRI que conducen a la desgranulación de células inmunitarias tales como neutrófilos, eosinófilos, mastocitos y/o basófilos. Tanto los mastocitos como los basófilos desempeñan un papel fundamental en trastornos inducidos por alérgenos, incluyendo, por ejemplo, rinitis alérgica y asma. Haciendo referencia a la figura 1, tras la exposición a alérgenos, que pueden ser, entre otras cosas, polen o parásitos, se sintetizan anticuerpos IgE específicos de alérgenos por células B activadas por IL-4 (o IL-13) y otros mensajeros que para cambiar a la síntesis de anticuerpos específicos de clase IgE. Estas IgE específicas de alérgenos se unen al FcεRI de alta afinidad. Tras la unión de antígeno, las IgE unidas a FcεRI se reticular y se activa la ruta de transducción de señales de receptores de IgE, que conduce a la desgranulación de las células y consiguiente liberación y/o la síntesis de una gran cantidad de mediadores químicos, incluyendo histamina, proteasas (por ejemplo, tripsina y quimasa), mediadores lipídicos tales como leucotrienos (por ejemplo, LTC₄), factor activador de plaquetas (PAF) y prostaglandinas (por ejemplo, PGD₂) y una serie de citocinas, incluyendo TNF-α, IL-4, IL-13, IL-5, IL-6, IL-8, GM-CSF, VEGF y TGF-β. La liberación y/o la síntesis de estos mediadores a partir de mastocitos y/o basófilos representan las respuestas de fase temprana y tardía inducidas por alérgenos, y está directamente asociada con acontecimientos posteriores que conducen a un estado inflamatorio sostenido.

Los acontecimientos moleculares en la ruta de transducción de señales de FcεRI que conducen a la liberación de mediadores formados previamente mediante desgranulación y liberación y/o la síntesis de otros mediadores químicos se conocen bien y se ilustran en la figura 2. Haciendo referencia a la figura 2, el FcεRI es un receptor heterotetramérico compuesto por una subunidad alfa de unión a IgE, una subunidad beta, y dos subunidades gamma (homodímero gamma). La reticulación de IgE unida a FcεRI mediante agentes de unión multivalentes (incluyendo, por ejemplo alérgenos específicos de IgE o anticuerpos anti-IgE o fragmentos) induce la rápida asociación y activación de la cinasa Lyn relacionada con Src. Lyn fosforila motivos de activación basados en tirosina de inmunorreceptor (ITAM) en las subunidades beta y gamma intracelulares, lo que conduce al reclutamiento de Lyn adicional en la subunidad beta y cinasa Syk en el homodímero gamma. Estas cinasa asociadas con receptor, que se activan mediante fosforilación intra e intermolecular, fosforilan otros componentes de la ruta, tales como la cinasa Btk, LAT, y fosfolipasa C-gamma PLC-gamma. La PLC-gamma activada inicia rutas que conducen a la activación de la proteína cinasa C y la movilización de Ca²⁺, ambas de las cuales se requieren para la desgranulación. La reticulación de FcεRI también activa las tres clases principales de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAP), es decir ERK1/2, JNK1/2, y p38. La activación de estas rutas es importante en la regulación transcripcional de mediadores proinflamatorios, tales como TNF-α e IL-6, así como el mediador lipídico leucotrieno CA (LTC₄).

Aunque no se ilustra, se cree que la cascada de señalización de FcγRI comparte algunos elementos comunes con la cascada de señalización de FcεRI. De manera importante, al igual que FcεRI, FcγRI incluye un homodímero gamma que se fosforila y recluta Syk, y al igual que FcεRI, la activación de la cascada de señalización de FcγRI conduce, entre otras cosas, a la desgranulación. Otros receptores de Fc que comparten el homodímero gamma, y que pueden regularse mediante los compuestos activos de 2,4-pirimidindiamina, incluyen, pero no se limitan a, FcαRI y FcγRIII.

La capacidad de los compuestos de espiro-2,4-pirimidindiamina para inhibir cascadas de señalización de receptores de Fc puede determinarse o confirmarse sencillamente en ensayos *in vitro*. En la sección de ejemplos se proporcionan ensayos adecuados para confirmar la inhibición de la desgranulación mediada por FcεRI. En un

5 ensayo típico, en primer lugar se hacen crecer células que pueden experimentar desgranulación mediada por FcεRI, tales como mastocitos o basófilos, en presencia de IL-4, factor de células madre (SCF), IL-6 e IgE para aumentar la expresión del FcεRI, se exponen a un compuesto de prueba de 2,4-pirimidindiamina de la invención y se estimulan con anticuerpos anti-IgE (o, alternativamente, un alérgeno específico de IgE). Tras la incubación, puede cuantificarse la cantidad de un mediador químico u otro agente químico liberado y/o sintetizado como consecuencia de la activación de la cascada de señalización de FcεRI usando técnicas convencionales y compararse con la cantidad del mediador o agente liberada de células control (es decir, células que se estimulan pero que no se han expuesto a compuesto de prueba). La concentración de compuesto de prueba que proporciona una reducción del 50% en la cantidad del mediador o agente medida en comparación con células control es la CI_{50} del compuesto de prueba. El origen de los mastocitos o basófilos usados en el ensayo dependerá, en parte, del uso deseado para los compuestos y resultará evidente para los expertos en la técnica. Por ejemplo, si los compuestos se usarán para tratar o prevenir una enfermedad particular en seres humanos, una fuente conveniente de mastocitos o basófilos es un ser humano u otro animal que constituye un modelo clínico conocido o aceptado para la enfermedad particular. Por tanto, dependiendo de la aplicación particular, los mastocitos o basófilos pueden derivarse de una amplia variedad de fuentes animales, que oscilan entre, por ejemplo, mamíferos inferiores tales como ratones y ratas, y perros, ovejas y otros mamíferos comúnmente empleados en pruebas clínicas, y mamíferos superiores tales como monos, chimpancés y simios, y seres humanos. Ejemplos específicos de células adecuadas para llevar a cabo los ensayos *in vitro* incluyen, pero no se limitan a, basófilos de roedor o humanos, líneas celulares de leucemia de basófilos de rata, mastocitos de ratón primarios (tales como mastocitos de ratón derivados de médula ósea "BMMC") y mastocitos humanos primarios aislados de sangre de cordón umbilical ("CHMC") u otros tejidos tales como pulmón. Métodos para aislar y cultivar estos tipos de célula se conocen bien o se proporcionan en la sección de ejemplos (véase, por ejemplo, Demo *et al.*, 1999, Cytometry 36(4):340-348 y la solicitud estadounidense en tramitación junto con la presente con n.º de serie 10/053.355, presentada el 8 de noviembre de 2001, cuyas descripciones se incorporan en el presente documento como referencia). Evidentemente, también pueden usarse otros tipos de células inmunitarias que se desgranulan tras la activación de la cascada de señalización de FcεRI, incluyendo, por ejemplo, eosinófilos.

30 Tal como reconocerán los expertos en la técnica, el mediador o agente cuantificado no es crítico. El único requisito es que sea un mediador o agente liberado y/o sintetizado como consecuencia de iniciar o activar la cascada de señalización de receptores de Fc. Por ejemplo, haciendo referencia a la figura 1, la activación de la cascada de señalización de FcεRI en mastocitos y/o basófilos conduce a numerosos acontecimientos posteriores. Por ejemplo, la activación de la cascada de señales de FcεRI conduce a la liberación inmediata (es decir, en el plazo de 1-3 min. tras la activación del receptor) de una variedad de agentes y mediadores químicos formados previamente mediante desgranulación. Por tanto, en una realización, el mediador o agente cuantificado puede ser específico para los gránulos (es decir, está presente en gránulos pero no en el citoplasma celular de manera general). Ejemplos de mediadores o agentes específicos de gránulos que pueden cuantificarse para determinar y/o confirmar la actividad de un compuesto de 2,4-pirimidindiamina de la invención incluyen, pero no se limitan a, enzimas específicas de gránulos tales como hexosaminidasa y triptasa y componentes específicos de gránulos tales como histamina y serotonina. Se conocen bien ensayos para cuantificar tales factores, y en muchos casos están comercialmente disponibles. Por ejemplo, la liberación de triptasa y/o hexosaminidasa puede cuantificarse incubando las células con sustratos que pueden escindirse que fluorescen tras la escisión y cuantificando la cantidad de fluorescencia producida usando técnicas convencionales. Tales sustratos fluorogénicos escindibles están comercialmente disponibles. Por ejemplo, pueden usarse los sustratos fluorogénicos Z-Gly-Pro-Arg-AMC (Z=benciloxicarbonilo; AMC=7-amino-4-metilcumarina; BIOMOL Research Laboratories, Inc., Plymouth Meeting, PA 19462, n.º de catálogo P-142) y Z-Ala-Lys-Arg-AMC (Enzyme Systems Products, una división de ICN Biomedicals, Inc., Livermore, CA 94550, n.º de catálogo AMC-246) para cuantificar la cantidad de triptasa liberada. El sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferil-N-acetil-β-D-glucosaminida (Sigma, St. Louis, MO, n.º de catálogo 69585) para cuantificar la cantidad de hexosaminidasa liberada. La liberación de histamina puede cuantificarse usando un ensayo de inmunoabsorción asociado a enzimas (ELISA) comercialmente disponible tal como el ensayo de ELISA de histamina de Immunotech n.º IM2015 (Beckman-Coulter, Inc.). En la sección de ejemplos se proporcionan métodos específicos de cuantificación de la liberación de triptasa, hexosaminidasa e histamina. Cualquiera de esos ensayos puede usarse para determinar o confirmar la actividad de espiro-2,4-pirimidindiamina.

55 Haciendo de nuevo referencia a la figura 1, la desgranulación sólo es una de varias respuestas iniciadas por la cascada de señalización de FcεRI. Además, la activación de esta ruta de señalización conduce a la síntesis *de novo* y liberación de citocinas y quimiocinas tales como IL-4, IL-5, IL-6, TNF-α, IL-13 y MIP1-α, y la liberación de mediadores lipídicos tales como leucotrienos (por ejemplo, LTC4), factor activador de plaquetas (PAF) y prostaglandinas. Por consiguiente, los compuestos de 2,4-pirimidindiamina de la invención también pueden someterse a ensayo para detectar la actividad cuantificando la cantidad de uno o más de esos mediadores liberados y/o sintetizados por células activadas.

65 Al contrario que los componentes específicos de gránulos comentados anteriormente, estos mediadores de "estadio tardío" no se liberan inmediatamente tras la activación de la cascada de señalización de FcεRI. Por consiguiente, cuando se cuantifican estos mediadores de estadio tardío, debe tenerse cuidado para asegurarse de que se incubó el cultivo de células activadas durante un tiempo suficiente para dar como resultado la síntesis (si es necesario) y

- 5 liberación del mediador que está cuantificándose. Generalmente, PAF y mediadores lipídicos tales como leucotrieno C4 se liberan 3-30 min. tras la activación de FcεRI. Las citocinas y otros mediadores de estadio tardío se liberan aproximadamente 4-8 h. tras la activación de FcεRI. Los tiempos de incubación adecuados para un mediador específico resultarán evidentes para los expertos en la técnica. En la sección de ejemplos se proporcionan directrices y ensayos específicos.
- 10 La cantidad de un mediador de estadio tardío particular liberado puede cuantificarse usando cualquier técnica convencional. En una realización, la(s) cantidad(es) puede(n) cuantificarse usando ensayos de ELISA. Hay kits de ensayo de ELISA adecuados para cuantificar la cantidad de TNFα, IL-4, IL-5, IL-6 y/o IL-13 liberada disponibles, por ejemplo, de Biosource International, Inc., Camarillo, CA 93012 (véanse, por ejemplo, n.ºs de catálogo KHC3011, KHC0042, KHC0052, KHC0061 y KHC0132). Hay kits de ensayo de ELISA adecuados para cuantificar la cantidad de leucotrieno C4 (LTC4) liberada de células disponibles de Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI 48108 (véase, por ejemplo, n.º de catálogo 520211).
- 15 Normalmente, los compuestos de espiro-2,4-pirimidindiamina activos presentarán CI₅₀ con respecto a la liberación o síntesis de mediador y/o desgranulación mediada por FcεRI de aproximadamente 20 μM o inferior, medida en un ensayo *in vitro*, tal como uno de los ensayos *in vitro* descritos anteriormente o en la sección de ejemplos. Evidentemente, los expertos en la técnica apreciarán que los compuestos que muestran CI₅₀ inferiores, por ejemplo del orden de 10 μM, 1 μM, 100 nM, 10 nM, 1 nM, o incluso inferiores, son particularmente útiles.
- 20 Los expertos en la técnica también apreciarán que los diversos mediadores comentados anteriormente pueden inducir diferentes efectos adversos o presentar diferentes potencias con respecto al mismo efecto adverso. Por ejemplo, el mediador lipídico LTC4 es un potente vasoconstrictor (es aproximadamente 1000 veces más potente en la inducción de la vasoconstricción que la histamina). Como otro ejemplo, además de mediar en reacciones de hipersensibilidad de tipo I o atópicas, las citocinas también pueden provocar remodelación tisular y proliferación celular. Por tanto, aunque los compuestos que inhiben la liberación y/o la síntesis de uno cualquiera de los mediadores químicos comentados anteriormente son útiles, los expertos en la técnica apreciarán que compuestos que inhiben la liberación y/o la síntesis de una pluralidad, o incluso todos, de los mediadores descritos anteriormente encuentran uso particular, ya que tales compuestos son útiles para mejorar o evitar completamente una pluralidad, o incluso todos, de los efectos adversos inducidos por los mediadores particulares. Por ejemplo, compuestos que inhiben la liberación de los tres tipos de mediadores (específicos de gránulos, lipídicos y citocinas) son útiles para tratar o prevenir reacciones de hipersensibilidad tipo I inmediatas así como los síntomas crónicos asociados con las mismas.
- 25 Los compuestos descritos en el presente documento que pueden inhibir la liberación de más de un tipo de mediador (por ejemplo, específico de gránulos o de estadio tardío) pueden identificarse determinando la CI₅₀ con respecto a un mediador representativo de cada clase usando los diversos ensayos *in vitro* descritos anteriormente (u otros ensayos *in vitro* equivalentes). Los compuestos que pueden inhibir la liberación de más de un tipo de mediador presentarán normalmente una CI₅₀ para cada tipo de mediador sometido a prueba inferior a aproximadamente 20 μM. Por ejemplo, un compuesto que muestra una CI₅₀ de 1 μM con respecto a la liberación de histamina (CI₅₀ para histamina) y una CI₅₀ de 1 nM con respecto a la síntesis y/o liberación de leucotrieno LTC4 (CI₅₀ para LTC4) inhibe la liberación de mediador tanto inmediata (específico de gránulos) como de estadio tardío. Como otro ejemplo específico, un compuesto que presenta una CI₅₀ para tripsasa de 10 μM, una CI₅₀ para LTC4 de 1 μM y una CI₅₀ para IL-4 de 1 μM inhibe la liberación de mediador inmediata (específico de gránulos), lipídico y de citocina. Aunque los ejemplos específicos anteriores usan las CI₅₀ de un mediador representativo de cada clase, los expertos en la técnica apreciarán que pueden obtenerse las CI₅₀ de una pluralidad, o incluso todos, los mediadores que comprenden una o más de las clases. La(s) cantidad(es) e identidad(es) de mediadores para los que deben determinarse datos de CI₅₀ para un compuesto y aplicación particulares resultarán evidentes para los expertos en la técnica.
- 30 Pueden usarse ensayos similares para confirmar la inhibición de cascadas de transducción de señales iniciadas mediante otros receptores de Fc, tales como señalización de FcαRI, FcγRI y/o FcγRIII, con modificación rutinaria. Por ejemplo, la capacidad de los compuestos para inhibir la transducción de señales de FcγRI puede confirmarse en ensayos similares a los descritos anteriormente, con la excepción de que la cascada de señalización de FcγRI se activa, por ejemplo, incubando las células con IgG y un anticuerpo o alérgeno específico de IgG, en vez de IgE y un anticuerpo o alérgeno específico de IgE. Tipos de células adecuadas, agentes activadores y agentes para cuantificar para confirmar la inhibición de otros receptores de Fc, tales como receptores de Fc que comprenden un homodímero gamma, resultarán evidentes para los expertos en la técnica.
- 35 Una clase particularmente útil de compuestos incluye los compuestos de espiro-2,4-pirimidindiamina que inhiben la liberación de mediadores específicos de gránulos inmediatos y mediadores de estadio tardío con CI₅₀ aproximadamente equivalentes. Por aproximadamente equivalente quiere decirse que las CI₅₀ para cada tipo de mediador están dentro de aproximadamente un intervalo de 10 veces entre sí. Otra clase particularmente útil de compuestos incluye los compuestos de espiro-2,4-pirimidindiamina que inhiben la liberación de mediadores específicos de gránulos inmediatos, mediadores lipídicos y mediadores de citocina con CI₅₀ aproximadamente
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

equivalentes. En una realización específica, tales compuestos inhiben la liberación de los siguientes mediadores con CI_{50} aproximadamente equivalentes: histamina, triptasa, hexosaminidasa, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, $TNF\alpha$ y LTC₄. Tales compuestos son particularmente útiles, entre otras cosas, para mejorar o evitar completamente respuestas tanto de

5 De manera ideal, la capacidad para inhibir la liberación de todos los tipos deseados de mediadores se encontrará en un único compuesto. Sin embargo, también pueden identificarse mezclas de compuestos que logran el mismo resultado. Por ejemplo, puede usarse un primer compuesto que inhibe la liberación de mediadores específicos de gránulos en combinación con un segundo compuesto que inhibe la liberación y/o la síntesis de mediadores de

10 citocina.

Además de las rutas de desgranulación de $Fc\epsilon RI$ o $Fc\gamma RI$ comentadas anteriormente, la desgranulación de mastocitos y/o basófilos puede inducirse por otros agentes. Por ejemplo, ionomicina, un ionóforo de calcio que evita la maquinaria de transducción de señales temprana de $Fc\epsilon RI$ o $Fc\gamma RI$ de la célula, induce directamente un flujo de calcio que activa la desgranulación. Haciendo de nuevo referencia a la figura 2, la $PLC\gamma$ activada inicia rutas que conducen, entre otras cosas, a la movilización del ión y posterior desgranulación. Tal como se ilustra, esta

15 movilización de Ca^{2+} se activa tarde en la ruta de transducción de señales de $Fc\epsilon RI$. Tal como se mencionó anteriormente, y tal como se ilustra en la figura 3, la ionomicina induce directamente la movilización de Ca^{2+} y un flujo de Ca^{2+} que conduce a la desgranulación. Otros ionóforos que inducen la desgranulación de esta manera incluyen A23187. La capacidad de ionóforos que inducen granulación tales como ionomicina para evitar los estadios tempranos de las cascadas de señalización de $Fc\epsilon RI$ y/o $Fc\gamma RI$ puede usarse como contraselección para identificar compuestos activos de la invención que ejercen específicamente su actividad inhibitoria de la desgranulación

20 bloqueando o inhibiendo las cascadas de señalización de $Fc\epsilon RI$ o $Fc\gamma RI$ tempranos, tal como se comentó anteriormente. Compuestos que inhiben específicamente tal desgranulación mediada por $Fc\epsilon RI$ o $Fc\gamma RI$ tempranos no sólo inhiben la desgranulación y posterior liberación rápida de histamina, triptasa y otros contenidos de gránulos, sino que también inhiben las rutas de activación proinflamatoria que provocan la liberación de $TNF\alpha$, IL-4, IL-13 y los mediadores lipídicos tales como LTC₄. Por tanto, compuestos que inhiben específicamente tal desgranulación mediada por $Fc\epsilon RI$ y/o $Fc\gamma RI$ tempranos no sólo bloquean o inhiben reacciones de hipersensibilidad de tipo I o atópicas agudas, sino también respuestas tardías que en las que participan múltiples mediadores inflamatorios.

30 Compuestos descritos en el presente documento que inhiben específicamente desgranulación mediada por $Fc\epsilon RI$ y/o $Fc\gamma RI$ tempranos son los compuestos que inhiben la desgranulación mediada por $Fc\epsilon RI$ y/o $Fc\gamma RI$ (por ejemplo, tienen una CI_{50} inferior a aproximadamente 20 μM con respecto a la liberación de un mediador específico de gránulos o componente medido en un ensayo *in vitro* con células estimuladas con un agente de unión a IgE o IgG) pero que no inhiben de manera apreciable la desgranulación inducida por ionóforo. En una realización, se considera que los compuestos no inhiben de manera apreciable la desgranulación inducida por ionóforo si muestran una CI_{50} de desgranulación inducida por ionóforo superior a aproximadamente 20 μM , medida en un ensayo *in vitro*. Evidentemente, compuestos activos que presentan CI_{50} incluso superiores de desgranulación inducida por ionóforo, o que no inhiben la desgranulación inducida por ionóforo en absoluto, son particularmente útiles. En otra realización, se considera que los compuestos no inhiben de manera apreciable la desgranulación inducida por ionóforo si

35 presentan una diferencia de más de 10 veces en sus CI_{50} de desgranulación mediada por $Fc\epsilon RI$ y/o $Fc\gamma RI$ y desgranulación mediada por ionóforo, medido en un ensayo *in vitro*. Ensayos adecuados para determinar la CI_{50} de desgranulación inducida por ionóforo incluyen cualquiera de los ensayos de desgranulación descritos anteriormente, con la modificación de que las células se estimulan o se activan con un ionóforo de calcio que induce desgranulación tal como ionomicina o A23187 (A.G. Scientific, San Diego, CA) en vez de anticuerpos anti-IgE o un alérgeno específico de IgE. Ensayos específicos para evaluar la capacidad de un compuesto de espiro-2,4-pirimidindiamina particular de la invención para inhibir la desgranulación inducida por ionóforo se proporcionan en la sección de

40 ejemplos.

50 Tal como reconocerán los expertos en la técnica, los compuestos que presentan un alto grado de selectividad de desgranulación mediada por $Fc\epsilon RI$ encuentran uso particular, ya que tales compuestos se dirigen selectivamente a la cascada de $Fc\epsilon RI$ y no interfieren con otros mecanismos de desgranulación. De manera similar, los compuestos que presentan un alto grado de selectividad de la desgranulación mediada por $Fc\gamma RI$ encuentran un uso particular, ya que tales compuestos se dirigen selectivamente a la cascada de $Fc\gamma RI$ y no interfieren con otros mecanismos de

55 desgranulación. Los compuestos que presentan un alto grado de selectividad son generalmente 10 veces o más selectivos para la desgranulación mediada por $Fc\epsilon RI$ o $Fc\gamma RI$ con respecto a la desgranulación mediada por ionóforo, tal como desgranulación inducida por ionomicina.

60 Por consiguiente, la actividad de compuestos de espiro-2,4-pirimidindiamina también puede confirmarse en ensayos bioquímicos o celulares de actividad de cinasa Syk. Haciendo de nuevo referencia a la figura 2, en la cascada de señalización de $Fc\epsilon RI$ en mastocitos y/o basófilos, la cinasa Syk fosforila LAT y PLC-gamma, lo que conduce, entre otras cosas, a la desgranulación. Cualquiera de estas actividades puede usarse para confirmar la actividad de compuestos de espiro-2,4-pirimidindiamina. En una realización, la actividad se confirma poniendo en contacto una cinasa Syk aislada, o un fragmento activo de la misma, con un compuesto de espiro-2,4-pirimidindiamina en

presencia de un sustrato de cinasa Syk (por ejemplo, un péptido sintético o una proteína que se sabe que se fosforila mediante Syk en una cascada de señalización) y evaluando si la cinasa Syk fosforiló el sustrato. Alternativamente, el ensayo puede llevarse a cabo con células que expresan una cinasa Syk. Las células pueden expresar la cinasa Syk de manera endógena o pueden modificarse mediante ingeniería para expresar una cinasa Syk recombinante. Las células también pueden expresar opcionalmente el sustrato de cinasa Syk. Células adecuadas para realizar tales ensayos de confirmación, así como métodos de modificación mediante ingeniería de células adecuadas, resultarán evidentes para los expertos en la técnica. En la sección de ejemplos se proporcionan ejemplos específicos de ensayos bioquímicos y celulares para confirmar la actividad de compuestos de espiro-2,4-pirimidindiamina.

Generalmente, compuestos que son inhibidores de cinasa Syk presentarán una CI_{50} con respecto a una actividad de cinasa Syk, tal como la capacidad de la cinasa Syk para fosforilar un sustrato sintético o endógeno, en un ensayo *in vitro* o celular en el intervalo de aproximadamente 20 μ M o menos. Los expertos en la técnica apreciarán que los compuestos que presentan CI_{50} inferiores, tales como en el intervalo de 10 μ M, 1 μ M, 100 nM, 10 nM, 1 nM, o incluso inferiores, son particularmente útiles.

6.6 Usos y composiciones

Tal como se comentó anteriormente, los compuestos activos inhiben cascadas de señalización de receptores de Fc, especialmente los receptores de Fc que incluyen un homodímero gamma, tales como las cascadas de señalización de Fc ϵ RI y/o Fc γ RI, que conducen, entre otras cosas, a la liberación y/o la síntesis de mediadores químicos a partir de células, o bien mediante desgranulación o bien otros procesos. Tal como también se comentó, los compuestos activos también son potentes inhibidores de cinasa Syk. Como consecuencia de estas actividades, los compuestos activos de la invención pueden usarse en una variedad de contextos *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo* para regular o inhibir la cinasa Syk, cascadas de señalización en las que la cinasa Syk desempeña un papel, cascadas de señalización de receptores de Fc, y las respuestas biológicas realizadas por tales cascadas de señalización. Por ejemplo, en una realización, los compuestos pueden usarse para inhibir la cinasa Syk, o bien *in vitro* o bien *in vivo*, en prácticamente cualquier tipo de célula que exprese la cinasa Syk. También pueden usarse para regular cascadas de transducción de señales en las que la cinasa Syk desempeña un papel. Tales cascadas de transducción de señales dependientes de Syk incluyen, pero no se limitan a, las cascadas de transducción de señales de Fc ϵ RI, Fc γ RI, Fc γ RIII, BCR e integrina. Los compuestos también pueden usarse *in vitro* o *in vivo* para regular, y en particular inhibir, respuestas celulares o biológicas provocadas por tales cascadas de transducción de señales dependientes de Syk. Tales respuestas celulares o biológicas incluyen, pero no se limitan a, explosión respiratoria, adhesión celular, desgranulación celular, propagación celular, migración celular, agregación celular, fagocitosis, síntesis y liberación de citocinas, maduración celular y flujo de Ca^{2+} . De manera importante, los compuestos pueden usarse para inhibir la cinasa Syk *in vivo* como enfoque terapéutico frente al tratamiento o la prevención de enfermedades mediadas, o bien completa o bien parcialmente, por una actividad de cinasa Syk. Ejemplos no limitativos de enfermedades mediadas por cinasa Syk que pueden tratarse o prevenirse con los compuestos son las comentadas con más detalle a continuación.

En otra realización, los compuestos activos pueden usarse para regular o inhibir las cascadas de señalización de receptores de Fc y/o desgranulación mediada por Fc ϵ RI y/o Fc γ RI como enfoque terapéutico frente al tratamiento o prevención de enfermedades caracterizadas por, provocadas por y/o asociadas con la liberación o síntesis de mediadores químicos de tales cascadas de señalización de receptores de Fc o desgranulación. Tales tratamientos pueden administrarse a animales en contextos veterinarios o a seres humanos. Las enfermedades que están caracterizadas por, provocadas por o asociadas con tal liberación, síntesis o desgranulación de mediadores, y que por tanto pueden tratarse o prevenirse con los compuestos activos, incluyen, a modo de ejemplo y no de limitación, reacciones alérgicas o de hipersensibilidad anafiláctica o de atopía, alergias (por ejemplo, conjuntivitis alérgica, rinitis alérgica, asma atópica, dermatitis atópica y alergias a alimentos), cicatrización de bajo grado (por ejemplo, de esclerodermia, fibrosis aumentada, queloides, cicatrices postquirúrgicas, fibrosis pulmonar, espasmos vasculares, migraña, lesión por reperusión y tras infarto de miocardio), enfermedades asociadas con destrucción tisular (por ejemplo, de EPOC, cardiobronquitis y tras infarto de miocardio), enfermedades asociadas con inflamación tisular (por ejemplo, síndrome del intestino irritable, colon irritable y enfermedad inflamatoria del intestino), inflamación y cicatrización.

Además de la mirada de enfermedades comentadas anteriormente, los compuestos de espiro-2,4-pirimidindiamina descritos en el presente documento también pueden ser útiles para el tratamiento o prevención de enfermedades autoinmunitarias, así como los diversos síntomas asociados con tales enfermedades. Los tipos de enfermedades autoinmunitarias que pueden tratarse o prevenirse con los compuestos de 2,4-pirimidindiamina incluyen generalmente los trastornos que suponen lesión tisular que se produce como resultado de una respuesta humoral y/o mediada por células frente a inmunógenos o antígenos de origen endógeno y/o exógeno. Tales enfermedades se denominan con frecuencia enfermedades que implican las reacciones de hipersensibilidad no anafilácticas (es decir, tipo II, tipo III y/o tipo IV).

Tal como se comentó anteriormente, las reacciones de hipersensibilidad de tipo I resultan generalmente de la

liberación de sustancias farmacológicamente activas, tales como histamina, a partir de mastocitos y/o basófilos tras el contacto con un antígeno exógeno específico. Tal como se mencionó anteriormente, tales reacciones de tipo I desempeñan un papel en numerosas enfermedades, incluyendo asma alérgica, rinitis alérgica, etc.

5 Las reacciones de hipersensibilidad de tipo II (también denominadas reacciones de hipersensibilidad citotóxicas, dependientes de complemento citolítico o estimulantes de células) se producen cuando inmunoglobulinas reaccionan con componentes antigénicos de células o tejido, o con un antígeno o hapteno que se acopla íntimamente a células o tejido. Las enfermedades que están comúnmente asociadas con reacciones de hipersensibilidad de tipo II incluyen, pero no se limitan a, anemia hemolítica autoinmunitaria, eritroblastosis fetal y enfermedad de Goodpasture.

10 Las reacciones de hipersensibilidad de tipo III, (también denominadas reacciones de hipersensibilidad de complejo tóxico, de complejo soluble o de complejo inmunitario) resultan de la deposición de complejos antígeno-inmunoglobulina circulantes solubles en vasos o en tejidos, con reacciones inflamatorias agudas acompañantes en el sitio de deposición de complejo inmunitario. Los ejemplos no limitativos de enfermedades de tipo III prototípicas incluyen la reacción de Arthus, artritis reumatoide, enfermedad del suero, lupus eritematoso sistémico, determinados tipos de glomerulonefritis, esclerosis múltiple y penfigoide ampolloso.

15 Las reacciones de hipersensibilidad de tipo IV (denominadas con frecuencia reacciones de hipersensibilidad de tipo celular, mediadas por células, retrasadas o de tuberculina) se provocan por linfocitos T sensibilizados que resultan del contacto con un antígeno específico. Ejemplos no limitativos de enfermedades que se menciona que implican reacciones de tipo IV son dermatitis de contacto y rechazo de aloinjerto.

20 Las enfermedades autoinmunitarias asociadas con cualquiera de las reacciones de hipersensibilidad no anafilácticas anteriores pueden tratarse o prevenirse con espiro-2,4-pirimidindiamina. En particular, los métodos pueden usarse para tratar o prevenir las enfermedades autoinmunitarias caracterizadas con frecuencia como trastornos autoinmunitarios de tipo de células individuales u órganos individuales incluyendo, pero sin limitarse a: tiroiditis de Hashimoto, anemia hemolítica autoinmunitaria, gastritis atrófica autoinmunitaria de anemia perniciososa, encefalomielititis autoinmunitaria, orquitis autoinmunitaria, enfermedad de Goodpasture, trombocitopenia autoinmunitaria, oftalmia simpática, miastenia grave, enfermedad de Graves, cirrosis biliar primaria, hepatitis agresiva crónica, colitis ulcerosa y glomerulopatía membranosa, así como las enfermedades autoinmunitarias caracterizadas con frecuencia como que implican trastorno autoinmunitario sistémico, que incluyen, pero no se limitan a: lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, síndrome de Sjogren, síndrome de Reiter, polimiositis-dermatomiositis, esclerosis sistémica, poliarteritis nudosa, esclerosis múltiple y penfigoide ampolloso.

25 Los expertos en la técnica apreciarán que muchas de las enfermedades autoinmunitarias indicadas anteriormente están asociadas con síntomas graves, cuya mejora proporciona un beneficio terapéutico significativo incluso en casos en los que no puede mejorarse la enfermedad autoinmunitaria subyacente. Muchos de estos síntomas, así como sus estados patológicos subyacentes, resultan como consecuencia de la activación de la cascada de señalización de FcγR en células monocíticas. Como los compuestos de 2,4-pirimidindiamina descritos en el presente documento son potentes inhibidores de tal señalización de FcγR en monocitos y otras células, los métodos encuentran uso en el tratamiento y/o la prevención de una miríada de síntomas adversos asociados con las enfermedades autoinmunitarias indicadas anteriormente.

30 Como ejemplo específico, la artritis reumatoide (AR) da normalmente como resultado hinchamiento, dolor, pérdida de movimiento y sensibilidad a la presión de articulaciones afectadas en todo el cuerpo. AR se caracteriza por un sinovio inflamado de manera crónica que está densamente poblado con linfocitos. La membrana sinovial, que normalmente tiene el grosor de una capa celular, se vuelve de muchas células y adopta una forma similar al tejido linfoide, incluyendo células dendríticas, células T, B y NK, macrófagos y agrupaciones de células plasmáticas. Este proceso, así como una gran cantidad de mecanismos inmunopatológicos que incluyen la formación de complejos de antígeno-inmunoglobulina, da eventualmente como resultado la destrucción de la integridad de la articulación, dando como resultado deformidad, pérdida permanente de función y/o erosión ósea en o cerca de la articulación. Los métodos pueden usarse para tratar o mejorar un cualquiera, varios o todos de esos síntomas de AR. Por tanto, en el contexto de AR, se considera que los métodos proporcionan un beneficio terapéutico (comentado más generalmente, más adelante) cuando se logra una reducción o mejora de cualquiera de los síntomas comúnmente asociados con AR, independientemente de si el tratamiento da como resultado un tratamiento concomitante de la AR subyacente y/o una reducción en la cantidad de factor reumatoide ("RF") circulante.

35 Como otro ejemplo específico, lupus eritematoso sistémico ("LES") está normalmente asociado con síntomas tales como fiebre, dolor en las articulaciones (artralgias), artritis, y serositis (pleuresía o pericarditis). En el contexto de LES, se considera que los métodos proporcionan beneficio terapéutico cuando se logra una reducción o mejora de cualquiera de los síntomas comúnmente asociados con LES, independientemente de si el tratamiento da como resultado un tratamiento concomitante del LES subyacente.

40 Como otro ejemplo específico, la esclerosis múltiple ("EM") incapacita al paciente alterando su agudeza visual; estimulando una doble visión; alterando funciones motoras que afectan al andar y al uso de las manos; produciendo

- 5 incontinencia del intestino y la vejiga; espasmos; y déficits sensoriales (sensibilidad al tacto, al dolor y a la temperatura). En el contexto de EM, se considera que los métodos proporcionan beneficio terapéutico cuando se logra una mejora o una reducción en la progresión de uno cualquiera o más de los efectos incapacitantes comúnmente asociados con EM, independientemente de si el tratamiento da como resultado un tratamiento concomitante de la EM subyacente.
- 10 Cuando se usan para tratar o prevenir tales enfermedades, los compuestos activos pueden administrarse de manera individual, como mezclas de uno o más compuestos activos o en mezcla o combinación con otros agentes útiles para tratar tales enfermedades y/o los síntomas asociados con tales enfermedades. Los compuestos activos también pueden administrarse en mezcla o en combinación con agentes útiles para tratar otros trastornos o enfermedades, tales como esteroides, estabilizantes de membrana, inhibidores de 5LO, inhibidores de síntesis y receptor de leucotrieno, inhibidores de cambio a isotipo IgE o síntesis de IgE, cambio a isotipo IgG o síntesis de IgG, β-agonistas, inhibidores de triptasa, aspirina, inhibidores de COX, metotrexato, fármacos anti-TNF, retuxina, inhibidores de PD4, inhibidores de p38, inhibidores de PDE4, y antihistamínicos, por nombrar unos pocos. Los
- 15 compuestos activos pueden administrarse en sí mismos en forma de profármacos o como composiciones farmacéuticas, que comprenden un compuesto activo o profármaco.
- 20 Composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos activos descritos en el presente documento (o profármacos de los mismos) pueden fabricarse por medio de procedimientos convencionales de mezclado, disolución, granulación, formación de grageas, trituración, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización. Las composiciones pueden formularse de una manera convencional usando uno o más portadores, diluyentes, excipientes o compuestos auxiliares fisiológicamente aceptables que facilitan el procesamiento de los compuestos activos para dar preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente.
- 25 El compuesto activo o profármaco puede formularse en las composiciones farmacéuticas en sí mismo, o en forma de un hidrato, solvato, N-óxido o sal farmacéuticamente aceptable, tal como se describió anteriormente. Normalmente, tales sales son más solubles en disoluciones acuosas que los correspondientes ácidos y bases libres, pero también pueden formarse sales que tienen una solubilidad menor que los correspondientes ácidos y bases libres.
- 30 Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden adoptar una forma adecuada para prácticamente cualquier modo de administración, incluyendo, por ejemplo, tópica, ocular, oral, bucal, sistémica, nasal, mediante inyección, transdérmica, rectal, vaginal, etc., o una forma adecuada para su administración mediante inhalación o insuflación.
- 35 Para la administración tópica, el/los compuesto(s) activo(s) o profármaco(s) puede(n) formularse como disoluciones, geles, pomadas, cremas, suspensiones, etc. tal como se conoce bien en la técnica.
- 40 Las formulaciones sistémicas incluyen aquellas diseñadas para su administración mediante inyección, por ejemplo, inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intratecal o intraperitoneal, así como las diseñadas para administración transdérmica, transmucosa, oral o pulmonar.
- 45 Preparaciones inyectables útiles incluyen suspensiones, disoluciones o emulsiones estériles del/de los compuesto(s) activo(s) en vehículos acuosos o aceitosos. Las composiciones también pueden contener agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma farmacéutica unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes de múltiples dosis, y pueden contener conservantes añadidos.
- 50 Alternativamente, la formulación inyectable puede proporcionarse en forma de polvo para su reconstitución con un vehículo adecuado, incluyendo, pero sin limitarse a, agua libre de pirógenos, tampón, disolución de dextrosa, etc., antes de su uso. Para ello, el/los compuesto(s) activo(s) puede(n) secarse mediante cualquier técnica conocida en la técnica, tal como liofilización, y reconstituirse antes de su uso.
- 55 Para la administración transmucosa, se usan agentes de penetración apropiados para la barrera que va a penetrarse en la formulación. Tales agentes de penetración se conocen en la técnica.
- 60 Para la administración oral, las composiciones farmacéuticas pueden adoptar la forma, por ejemplo, de pastillas para chupar, comprimidos o cápsulas preparados por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptable tales como aglutinantes (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); cargas (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o hidrogenofosfato de calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); disgregantes (por ejemplo, almidón de patata o glicolato sódico de almidón); o agentes humectantes (por ejemplo, laurilsulfato de sodio). Los comprimidos pueden recubrirse mediante métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, con azúcares, películas o recubrimientos entéricos.
- 65 Las preparaciones líquidas para administración oral pueden adoptar la forma, por ejemplo, de jarabes, disoluciones, siropes o suspensiones, o pueden presentarse como producto seco para su constitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Tales preparaciones líquidas pueden prepararse mediante medios convencionales con

- 5 aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (por ejemplo, sirope de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina o goma arábica); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendra, ésteres grasos, alcohol etílico, Cremophore™ o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (por ejemplo, p-hidroxibenzoatos de metilo o propilo o ácido sórbico). Las preparaciones también pueden contener sales tamponadas, conservantes, aromatizantes, colorantes y agentes edulcorantes según sea apropiado.
- 10 Las preparaciones para administración oral pueden formularse adecuadamente para proporcionar liberación controlada del compuesto activo o profármaco, tal como se conoce bien.
- 15 Para la administración bucal, las composiciones pueden adoptar la forma de comprimidos o pastillas para chupar formuladas de manera convencional.
- 20 Para las vías de administración rectal y vaginal, el/los compuesto(s) activo(s) puede(n) formularse como disoluciones (para enemas de retención), supositorios o pomadas que contienen bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.
- 25 Para la administración nasal o administración mediante inhalación o insuflación, el/los compuesto(s) activo(s) o profármaco(s) puede(n) administrarse convenientemente en forma de una pulverización de aerosol a partir de envases presurizados o un nebulizador con el uso de un propelente adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, fluorocarbonos, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para administrar una cantidad medida. Pueden formularse cápsulas y cartuchos para su uso en un inhalador o insuflador (por ejemplo cápsulas y cartuchos que comprenden gelatina) que contienen una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.
- 30 Un ejemplo específico de una formulación de suspensión acuosa adecuada para su administración nasal usando dispositivos de pulverización nasal comercialmente disponibles incluye los siguientes componentes: compuesto activo o profármaco (0,5-20 mg/ml); cloruro de benzalconio (0,1-0,2 mg/mL); polisorbato 80 (TWEEN® 80; 0,5-5 mg/ml); carboximetilcelulosa sódica o celulosa microcristalina (1-15 mg/ml); feniletanol (1-4 mg/ml); y dextrosa (20-50 mg/ml). El pH de la suspensión final puede ajustarse para oscilar entre aproximadamente pH 5 y pH 7, siendo típico un pH de aproximadamente pH 5,5.
- 35 Otro ejemplo específico de una suspensión acuosa adecuada para la administración de los compuestos mediante inhalación, y en particular para tal administración de un compuesto de la invención, contiene 1-20 mg/mL del compuesto o profármaco, de polisorbato 80 al 0,1-1% (v/v) (TWEEN®80), citrato 50 mM y/o cloruro de sodio al 0,9%.
- 40 Para la administración ocular, el/los compuesto(s) activo(s) o profármaco(s) puede(n) formularse como una disolución, emulsión, suspensión, etc. adecuada para la administración en el ojo. En la técnica se conoce una variedad de vehículos adecuados para administrar compuestos al ojo. Ejemplos específicos no limitativos se describen en la patente estadounidense n.º 6.261.547; patente estadounidense n.º 6.197.934; patente estadounidense n.º 6.056.950; patente estadounidense n.º 5.800.807; patente estadounidense n.º 5.776.445; patente estadounidense n.º 5.698.219; patente estadounidense n.º 5.521.222; patente estadounidense n.º 5.403.841; patente estadounidense n.º 5.077.033; patente estadounidense n.º 4.882.150; y patente estadounidense n.º 4.738.851.
- 45 Para una administración prolongada, el/los compuesto(s) activo(s) o profármaco(s) puede(n) formularse como una preparación de depósito para administración mediante implantación o inyección intramuscular. El principio activo puede formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados poco solubles, por ejemplo, como una sal poco soluble. Alternativamente, pueden usarse sistemas de administración transdérmica fabricados como un parche o disco adhesivo que libera lentamente el/los compuesto(s) activo(s) para su absorción percutánea. Para ello, pueden usarse potenciadores de la penetración para facilitar la penetración transdérmica del/de los compuesto(s) activo(s). Se describen parches transdérmicos adecuados por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 5.407.713; patente estadounidense n.º 5.352.456; patente estadounidense n.º 5.332.213; patente estadounidense n.º 5.336.168; patente estadounidense n.º 5.290.561; patente estadounidense n.º 5.254.346; patente estadounidense n.º 5.164.189; patente estadounidense n.º 5.163.899; patente estadounidense n.º 5.088.977; patente estadounidense n.º 5.087.240; patente estadounidense n.º 5.008.110; y patente estadounidense n.º 4.921.475.
- 50 Para una administración prolongada, el/los compuesto(s) activo(s) o profármaco(s) puede(n) formularse como una preparación de depósito para administración mediante implantación o inyección intramuscular. El principio activo puede formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados poco solubles, por ejemplo, como una sal poco soluble. Alternativamente, pueden usarse sistemas de administración transdérmica fabricados como un parche o disco adhesivo que libera lentamente el/los compuesto(s) activo(s) para su absorción percutánea. Para ello, pueden usarse potenciadores de la penetración para facilitar la penetración transdérmica del/de los compuesto(s) activo(s). Se describen parches transdérmicos adecuados por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 5.407.713; patente estadounidense n.º 5.352.456; patente estadounidense n.º 5.332.213; patente estadounidense n.º 5.336.168; patente estadounidense n.º 5.290.561; patente estadounidense n.º 5.254.346; patente estadounidense n.º 5.164.189; patente estadounidense n.º 5.163.899; patente estadounidense n.º 5.088.977; patente estadounidense n.º 5.087.240; patente estadounidense n.º 5.008.110; y patente estadounidense n.º 4.921.475.
- 55 Alternativamente, pueden emplearse otros sistemas de administración farmacéutica. Liposomas y emulsiones son ejemplos bien conocidos de vehículos de administración que pueden usarse para administrar compuesto(s) activo(s) o profármaco(s). También pueden usarse determinados disolventes orgánicos tales como dimetilsulfóxido (DMSO), aunque habitualmente a costa de una toxicidad superior.
- 60 Si se desea, las composiciones farmacéuticas pueden presentarse en un envase o dispositivo dispensador que puede contener una o más formas farmacéuticas unitarias que contienen el/los compuesto(s) activo(s). El envase
- 65

puede comprender, por ejemplo, lámina de metal o plástico, tal como un envase tipo blíster. El envase o dispositivo dispensador puede ir acompañado por instrucciones para la administración.

6.7 Dosificaciones eficaces

5 El/los compuesto(s) activo(s) o profármaco(s), o composiciones de los mismos, se usarán generalmente en una cantidad eficaz para lograr el resultado pretendido, por ejemplo en una cantidad eficaz para tratar o prevenir la enfermedad particular que está tratándose. El/los compuesto(s) puede(n) administrarse terapéuticamente para lograr un beneficio terapéutico o profilácticamente para lograr un beneficio profiláctico. Por beneficio terapéutico quiere decirse erradicación o mejora del trastorno subyacente que está tratándose y/o erradicación o mejora de uno o más de los síntomas asociados con el trastorno subyacente de modo que el paciente notifica una mejora en cómo se siente o su estado, independientemente de que el paciente todavía esté afectado por el trastorno subyacente. Por ejemplo, la administración de un compuesto a un paciente que padece una alergia proporciona beneficio terapéutico no sólo cuando se erradica o mejora la respuesta alérgica subyacente, sino también cuando el paciente notifica una disminución en la gravedad o duración de los síntomas asociados con la alergia tras la exposición al alérgeno. Como otro ejemplo, beneficio terapéutico en el contexto del asma incluye una mejora en la respiración tras el comienzo de un ataque asmático, o una reducción en la frecuencia o gravedad de episodios asmáticos. El beneficio terapéutico también incluye detener o ralentizar la progresión de la enfermedad, independientemente de si se logra una mejora.

20 Para la administración profiláctica, el compuesto puede administrarse a un paciente con riesgo de desarrollar una de las enfermedades descritas anteriormente. Por ejemplo, si se desconoce si un paciente es alérgico a un fármaco particular, el compuesto puede administrarse antes de la administración del fármaco para evitar o mejorar una respuesta alérgica al fármaco. Alternativamente, puede aplicarse administración profiláctica para evitar la aparición de síntomas en un paciente con diagnóstico de un trastorno subyacente. Por ejemplo, puede administrarse un compuesto a un paciente que padece alergia antes de una exposición anticipada al alérgeno. También pueden administrarse compuestos de manera profiláctica a individuos sanos que se exponen de manera repetida a agentes conocidos para una de las enfermedades descritas anteriormente para prevenir la aparición del trastorno. Por ejemplo, puede administrarse un compuesto a un individuo sano que se expone repetidamente a un alérgeno que se sabe que induce alergias, tal como látex, en un esfuerzo por prevenir que el individuo desarrolle una alergia. Alternativamente, puede administrarse un compuesto a un paciente que padece asma antes de emprender actividades que activan ataques de asma para reducir la gravedad de, o evitar completamente, un episodio asmático.

35 La cantidad de compuesto administrado dependerá de una variedad de factores, incluyendo, por ejemplo, la indicación particular que está tratándose, el modo de administración, si el beneficio deseado es profiláctico o terapéutico, la gravedad de la indicación que está tratándose y la edad y el peso del paciente, la biodisponibilidad del compuesto activo particular, etc. La determinación de una dosis eficaz está dentro de las capacidades de los expertos en la técnica.

40 Pueden estimarse dosificaciones eficaces inicialmente a partir de ensayos *in vitro*. Por ejemplo, puede formularse una dosificación inicial para su uso en animales para lograr una concentración en suero o sangre circulante de compuesto activo que es de, o superior a, una CI_{50} del compuesto particular medida en un ensayo *in vitro*, tal como el ensayo de CHMC o BMMC *in vitro* y otros ensayos *in vitro* descritos en la sección de ejemplos. Calcular dosificaciones para lograr tales concentraciones en suero o sangre circulante teniendo en cuenta la biodisponibilidad del compuesto particular está dentro de las capacidades de los expertos en la técnica. Para directrices, se remite al lector a Fingl & Woodbury, "General Principles", In: Goodman and Gilman's The Pharmaceutical Basis of Therapeutics, capítulo 1, págs. 1-46, última edición, Pergamon Press, y las referencias citadas en el mismo.

50 También pueden estimarse dosificaciones iniciales a partir de datos *in vivo*, tales como modelos animales. En la técnica se conocen bien modelos animales útiles para someter a prueba la eficacia de compuestos para tratar o prevenir las diversas enfermedades descritas anteriormente. Modelos animales adecuados de reacciones de hipersensibilidad o alérgicas se describen en Foster, 1995, *Allergy* 50(21 Sup.): 6-9, discusión 34-38 y Tumas *et al.*, 2001, *J. Allergy Clin. Immunol.* 107(6):1025-1033. Modelos animales adecuados de rinitis alérgica se describen en Szelenyi *et al.*, 2000, *Arzneimittelforschung* 50(11):1037-42; Kawaguchi *et al.*, 1994, *Clin. Exp. Allergy* 24(3):238-244 y Sugimoto *et al.*, 2000, *Immunopharmacology* 48(1):1-7. Modelos animales adecuados de conjuntivitis alérgica se describen en Carreras *et al.*, 1993, *Br. J. Ophthalmol.* 77(8):509-514; Saiga *et al.*, 1992, *Ophthalmic Res.* 24 (1):45-50; y Kunert *et al.*, 2001, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42(11):2483-2489. Modelos animales adecuados de mastocitosis sistémica se describen en O'Keefe *et al.*, 1987, *J. Vet. Intern. Med.* 1(2):75-80 y Bean-Knudsen *et al.*, 1989, *Vet. Pathol.* 26(1):90-92. Modelos animales adecuados de síndrome de hiper IgE se describen en Claman *et al.*, 1990, *Clin. Immunol. Immunopathol.* 56(1):46-53. Modelos animales adecuados de linfoma de células B se describen en Hough *et al.*, 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:13853-13858 y Hakim *et al.*, 1996, *J. Immunol.* 157(12):5503-5511. Modelos animales adecuados de trastornos atópicos tales como dermatitis atópica, eczema atópico y asma atópica se describen en Chan *et al.*, 2001, *J. Invest. Dermatol.* 117(4):977-983 y Suto *et al.*, 1999, *Int. Arch. Allergy Immunol.* 120 (Sup. 1): 70-75. Los expertos en la técnica pueden adaptar de manera rutinaria tal información para determinar dosificaciones adecuadas para la administración a seres humanos. En la sección de ejemplos se describen modelos animales adecuados adicionales.

Las cantidades de dosificación estarán normalmente en el intervalo de desde aproximadamente 0,0001 ó 0,001 ó 0,01 mg/kg/día hasta aproximadamente 100 mg/kg/día, pero pueden ser superiores o inferiores, dependiendo, entre otros factores, de la actividad del compuesto, su biodisponibilidad, el modo de administración y diversos factores comentados anteriormente. La cantidad de dosificación y el intervalo pueden ajustarse individualmente para proporcionar niveles en plasma del/de los compuesto(s) que son suficientes para mantener un efecto terapéutico o profiláctico. Por ejemplo, los compuestos pueden administrarse una vez por semana, varias veces por semana (por ejemplo, cada dos días), una vez al día o múltiples veces al día, dependiendo, entre otras cosas, del modo de administración, la indicación específica que está tratándose y el criterio del médico encargado. En casos de administración local o captación selectiva, tal como administración tópica local, la concentración local eficaz de compuesto(s) activo(s) puede no estar relacionada con la concentración en plasma. Los expertos en la técnica podrán optimizar las dosificaciones locales eficaces sin excesiva experimentación.

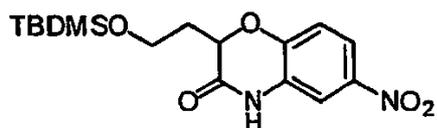
Preferiblemente, el/los compuesto(s) proporcionará(n) beneficio terapéutico o profiláctico sin provocar toxicidad sustancial. La toxicidad del/de los compuesto(s) puede determinarse usando procedimientos farmacéuticos convencionales. La razón de dosis entre el efecto tóxico y terapéutico (o profiláctico) es el índice terapéutico. Se prefiere(n) el/los compuestos(s) que presenta(n) índices terapéuticos superiores.

Habiéndose descrito la invención, los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no de limitación.

7. Ejemplos

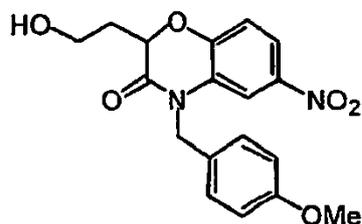
7.2 Compuestos de espiro-2,4-pirimidindiamina

7.2.1 2-(2-t-Butildimetilsiloxietil)-6-nitro-3-oxo-4H-benz[1,4]oxazina racémica



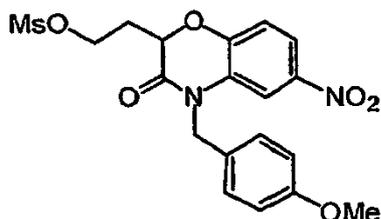
A una disolución de 4,8 g de 2-(2-hidroxietil)-6-nitro-3-oxo-4H-benz[1,4]oxazina racémica en dimetilformamida (100 mL) y 3,4 mL de dietilisopropilamina a 0°C se le añadieron 4,7 g de cloruro de terc-butildimetilsililo. Se agitó la mezcla de reacción a 0°C durante 20 minutos, a temperatura ambiente durante 3 horas, se concentró y se repartió el residuo resultante entre disolución de bicarbonato de sodio y EtOAc. Se extrajo la fase acuosa con EtOAc y se lavaron las fases orgánicas combinadas con agua, salmuera, después se secaron sobre MgSO₄. Se eliminó el disolvente a vacío y se purificó el material bruto mediante cromatografía en columna (hexanos/EtOAc) proporcionando 1 g del producto deseado 2-(2-t-butildimetilsiloxietil)-6-nitro-3-oxo-4H-benz[1,4]oxazina racémica; EM (m/e): 353 (MH⁺).

7.2.2 2-(2-t-Butildimetilsiloxietil)-6-nitro-3-oxo-4-(p-metoxibencil)-benz[1,4]oxazina racémica



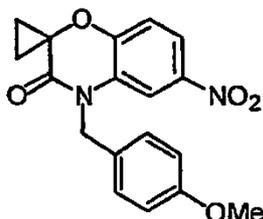
Se agitó durante 2 h una disolución de 450 mg de 2-(2-t-butildimetilsiloxietil)-6-nitro-3-oxo-4-(p-metoxibencil)-benz[1,4]oxazina racémica en 25 mL de HCl concentrado al 1% en EtOH. Se eliminó el disolvente mediante evaporación rotatoria proporcionando 370 mg del producto deseado 2-(2-hidroxietil)-6-nitro-3-oxo-4-(p-metoxibencil)-benz[1,4]oxazina racémica. EM (m/e): 357 (MH⁺).

7.2.3 2-(2-Metanosulfoniletil)-6-nitro-3-oxo-4-(p-metoxibencil)-benz[1,4]oxazina racémica



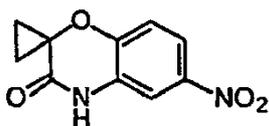
5 A una disolución de 640 mg de 2-(2-hidroxietil)-6-nitro-3-oxo-4-(p-metoxibencil)-benz[1,4]oxazina racémica en THF (30 mL) y 1 mL de DIEA a 0°C se le añadieron 330 μ L de MsCl. Se agitó la mezcla de reacción a 0°C durante 20 minutos, a temperatura ambiente durante 3 horas y después se concentró. Se repartió el residuo resultante entre disolución de bicarbonato y EtOAc. Se extrajo la fase acuosa con EtOAc y se lavaron las fases orgánicas combinadas con agua, salmuera, después se secaron sobre MgSO₄. Se eliminó el disolvente a vacío y se purificó el material bruto mediante cromatografía en columna (hexanos/EtOAc) proporcionando 1 g del compuesto del título. EM (m/e): 437 (MH⁺).

10 7.2.4 2-(2-Ciclopropil-6-nitro-3-oxo-4-p-metoxibencil)-benz[1,4]oxazina



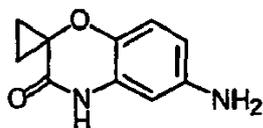
15 A una disolución de 500 mg de 2-(2-metanosulfoniletil)-6-nitro-3-oxo-4-(p-metoxibencil)-benz[1,4]oxazina racémica en THF (30 mL) a -15°C se le añadieron lentamente (gota a gota) 2,5 mL de una disolución de hexametsililazida de litio 1,0 M y se agitó la mezcla de reacción a -15°C durante 3 horas. Se concentró la mezcla de reacción y se repartió el residuo resultante entre disolución de bicarbonato y EtOAc. Se extrajo la fase acuosa con EtOAc y se lavaron las fases orgánicas combinadas con agua, salmuera, después se secaron sobre MgSO₄. Se eliminó el disolvente a vacío y se purificó el material bruto mediante cromatografía en columna (hexanos/EtOAc) proporcionando 150 mg del producto deseado 2-(2-ciclopropil-6-nitro-3-oxo-4-(p-metoxibencil)-benz[1,4]oxazina; EM (m/e): 341 (MH⁺).

20 7.2.5 2-(2-Ciclopropil)-6-nitro-3-oxo-4H-benz[1,4]oxazina



25 A una disolución de 400 mg de 2-(2-ciclopropil)-6-nitro-3-oxo-4-(p-metoxibencil)-benz[1,4]oxazina en acetonitrilo / agua (50 mL) se le añadieron 2,5 eq. de nitrato de amonio cérico. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiental durante 18 horas, se filtró, se concentró y se repartió el residuo resultante entre disolución de bicarbonato y EtOAc. Se extrajo la fase acuosa con EtOAc y se lavaron las fases orgánicas combinadas con agua, salmuera y después se secaron sobre MgSO₄. Se eliminó el disolvente a vacío y se purificó el material bruto mediante cromatografía en columna (hexanos/EtOAc) proporcionando 250 mg del producto deseado 2-(2-ciclopropil)-6-nitro-3-oxo-4H-benz[1,4]oxazina. EM (m/e): 341 (MH⁺).

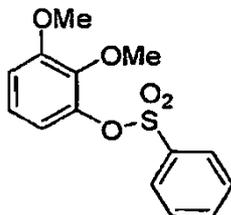
30 7.2.6 6-Amino-2-(2-ciclopropil)-3-oxo-4H-benz[1,4]oxazina



35 40 A una disolución de 200 mg de 2-(2-ciclopropil)-6-nitro-3-oxo-4H-benz[1,4]oxazina (1 g) en EtOH/agua (20 mL; 2:1 v/v) se le añadieron 5 eq. de hierro y 5 eq. de cloruro de amonio y se calentó la reacción a 90°C durante 4 h. Se enfrió la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente, se diluyó con diclorometano y se filtró. Se separaron las fases, se extrajo la acuosa una vez con diclorometano, se secaron las fases orgánicas combinadas sobre sulfato de

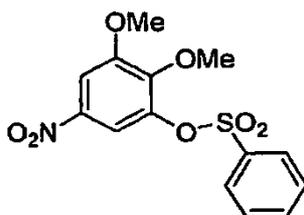
magnesio, se filtró la disolución y se evaporó el filtrado a vacío proporcionando el producto deseado 6-amino-2-(2-ciclopropil)-3-oxo-4H-benz[1,4]. EM (m/e): 191 (MH⁺).

5 7.2.7 2,3-Dimetil éter de 1-bencenosulfonato de pirogalol



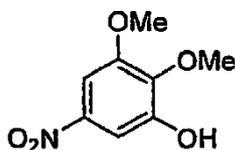
10 A una disolución de 10 mL de 2,3-dimetoxifenol y 13,3 mL de TEA en 150 mL de DCM a 0°C se le añadieron 11,25 mL de cloruro de bencenosulfonilo lentamente gota a gota con agitación. Se dejó calentar la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se agitó durante la noche. Se filtró la mezcla de reacción y se redujo el volumen mediante evaporación rotatoria. Se lavó la disolución de DCM con disolución de HCl diluida, disolución de bicarbonato saturada al 50% y después salmuera, se secó con sulfato de magnesio, se filtró y se evaporó el disolvente proporcionando 11 g del producto deseado 2,3-dimetil éter de 1-bencenosulfonato de pirogalol. EM (m/e): 295 (MH⁺).

15 7.2.8 2,3-Dimetil éter de 1-bencenosulfonato de 5-nitro-pirogalol



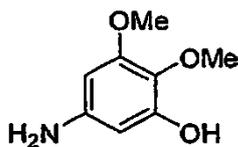
20 A una disolución de 6,26 g de 2,3-dimetil éter de 1-bencenosulfonato de pirogalol en 60 mL de ácido acético glacial a 0°C se le añadieron 12 mL de ácido nítrico fumante. Se dejó calentar la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se agitó durante la noche y después se añadió a 400 mL de agua helada. Se neutralizó la disolución con bicarbonato de sodio sólido y se extrajo con acetato de etilo. Se lavaron las fases orgánicas combinadas con disolución de bicarbonato saturada, salmuera, se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y se evaporaron y se purificó el residuo resultante mediante cromatografía en columna de gel de sílice (hexanos/EtOAc 85:15) proporcionando 6 g del producto deseado 2,3-dimetil éter de 1-bencenosulfonato de 5-nitro-pirogalol. EM (m/e): 340 (MH⁺).

30 7.2.9 2,3-Dimetoxi-5-nitrofenol



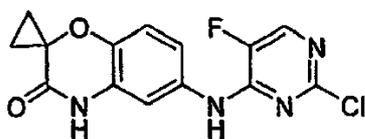
35 Se calentó a 50 grados centígrados durante 30 minutos con agitación una suspensión de 6 g de 2,3-dimetil éter de 1-bencenosulfonato de (±)-5-nitro-pirogalol en 60 mL de metanol y 36 mL de disolución acuosa de KOH al 20% en peso, después se enfrió, se diluyó con 350 mL de agua D.l. y se acidificó con HCl conc. en exceso proporcionando un precipitado que se recogió mediante filtración por succión y se secó proporcionando 4,6 g del producto deseado 2,3-dimetoxi-5-nitrofenol. EM (m/e): 200 (MH⁺).

40 7.2.10 4,5-Dimetoxi-3-hidroxianilina



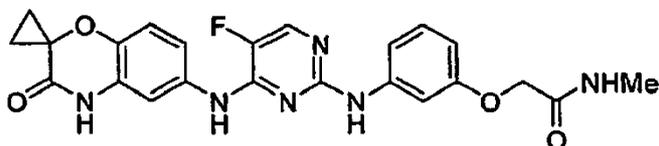
Se hidrogenó bajo un globo de hidrógeno durante la noche una disolución de 1,1 g de 2,3-dimetoxi-5-nitrofenol en 45 mL de metanol anhidro con 200 mg de Pd al 10% /C (Degussa). Se filtró la reacción a través de un lecho de Celite y se evaporó y se sometió el residuo a cromatografía sobre gel de sílice (gradiente de acetato de etilo/hexanos 3:2 hasta el 100% de acetato de etilo). Se evaporaron las fracciones apropiadas hasta sequedad proporcionando un aceite que se llevó a metanol al que se le añadió una disolución metanólica de HCl y se evaporó el disolvente proporcionando 1,0 g del producto deseado cloruro de 4,5-dimetoxi-3-hidroxianilina. EM (m/e): 170 (MH⁺).

7.2.11 2-Cloro-N4-[2-(2-ciclopropil)-3-oxo-4H-benz[1,4]oxazin-6-il]-5-fluoro-4-pirimidinamina



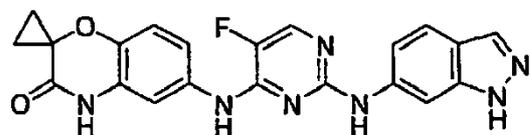
Se calentó durante la noche a 80°C una mezcla de 325 mg de 2,4-dicloro-5-fluoropirimidina y 124 mg de 6-amino-2-(2-ciclopropil)-3-oxo-4H-benz[1,4]oxazina en 20 mL de metanol/agua 1:1 y tras enfriarse se diluyó con una disolución de HCl 1 N. Se recogió el precipitado mediante filtración por succión, se secó, se trituró con hexanos y se secó de nuevo proporcionando 170 mg del producto deseado 2-cloro-N4-[2-(2-ciclopropil)-3-oxo-4H-benz[1,4]oxazin-6-il]-5-fluoro-4-pirimidinamina. ¹H-RMN (DMSO-d₆): δ 8,24 (d, 1H), 7,22 (d, 1H), 7,19 (dd, 1H), 6,83 (d, 2H), 1,20 (m, 2H); CL-EM: tiempo de retención 11,30 min.; pureza del 94%; EM (m/e): 321 (MH⁺).

7.2.12 N4-[2-(2-Ciclopropil)-3-oxo-4H-benz[1,4]oxazin-6-il]-5-fluoro-N2-[3-(N-metilamino)carbonilmetilenoifenil]-2,4-pirimidindiamina (compuesto 1)



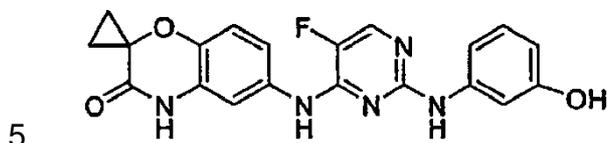
Se calentó en el microondas a 180°C durante 4200 segundos una mezcla de 40 mg de 2-cloro-N4-[2-(2-ciclopropil)-3-oxo-4H-benz[1,4]oxazin-6-il]-5-fluoro-4-pirimidinamina y 48 mg de 3-(N-metilamino)carbonilmetilenoanilina en 700 uL de EtOH. Se recogió el precipitado formado mediante filtración por succión, se secó, se suspendió en una disolución de bicarbonato diluida, se sometió a sonicación, se recogió mediante filtración por succión y se secó proporcionando 25 mg del producto deseado N4-[2-(2-ciclopropil)-3-oxo-4H-benz[1,4]oxazin-6-il]-5-fluoro-N2-[3-(N-metilamino)carbonilmetileno-oxifenil]-2,4-pirimidindiamina. ¹H-RMN (DMSO-d₆): δ 8,08(d, 1H), 7,92 (m, 1H), 7,32 (m, 4H), 7,04 (t, 1H), 6,81 (d, 1H), 6,43 (dd, 1H), 4,33 (s, 2H), 2,62 (d, 3H), 1,19 (m, 4H); CL-EM: tiempo de retención 9,35 min.; pureza del 96%; EM (m/e): 465 (MH⁺).

7.2.13 N4-[2-(2-Ciclopropil)-3-oxo-4H-benz[1,4]oxazin-6-il]-5-fluoro-N2-(indazol-6-il)-2,4-pirimidindiamina (compuesto 2)



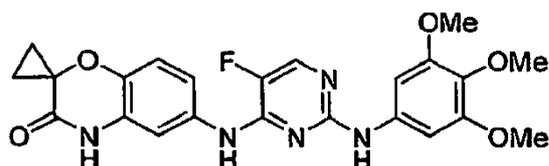
De una manera similar a la preparación de N4-[2-(2-ciclopropil)-3-oxo-4H-benz[1,4]oxazin-6-il]-5-fluoro-N2-[3-(N-metilamino)carbonilmetilenoifenil]-2,4-pirimidindiamina, se hicieron reaccionar 2-cloro-N4-[2-(2-ciclopropil)-3-oxo-4H-benz[1,4]oxazin-6-il]-5-fluoro-4-pirimidinamina y 6-aminoindazol proporcionando el producto deseado N4-[2-(2-ciclopropil)-3-oxo-4H-benz[1,4]oxazin-6-il]-5-fluoro-N2-(indazol-6-il)-2,4-pirimidindiamina. ¹H-RMN (DMSO-d₆): δ 8,06 (m, 2H), 7,82 (s, 1H), 7,53 (d, 4H), 7,39 (dd, 1H), 7,22 (m, 2H), 6,83(d, 1H), 1,19 (m, 4H); CL-EM: tiempo de retención 9,29 min.; pureza del 90%; EM (m/e): 418 (MH⁺).

7.2.14 N4-[2-(2-Ciclopropil)-3-oxo-4H-benz[1,4]oxazin-6-il]-5-fluoro-N2-(3-hidroxifenil)-2,4-pirimidindiamina (compuesto 3)



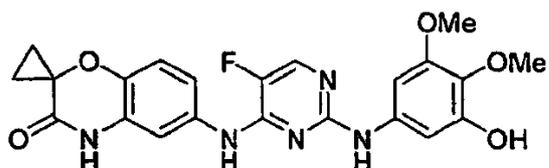
10 De una manera similar a la preparación de N4-[2-(2-ciclopropil)-3-oxo-4H-benz[1,4]oxazin-6-il]-5-fluoro-N2-[3-(N-metilamino)carbonilmetilenoifenil]-2,4-pirimidindiamina, se hicieron reaccionar 2-cloro-N4-[2-(2-ciclopropil)-3-oxo-4H-benz[1,4] oxazin-6-il]-5-fluoro-4-pirimidinamina y 3-hidroxianilina proporcionando el producto deseado N4-[2-(2-ciclopropil)-3-oxo-4H-benz[1,4]oxazin-6-il]-5-fluoro-N2-(3-hidroxifenil)-2,4-pirimidindiamina. ¹H-RMN (DMSO-d6): δ 8,09 (d, 1H), 7,23 (m, 2H), 7,01 (m, 3H), 6,82 (d, 1H), 6,39 (m, 1H), 1,20 (m, 4H); CL-EM: tiempo de retención 9,30 min; pureza del 96%; EM (m/e): 394 (MH⁺).

15 7.2.15 N4-[2-(2-Ciclopropil)-3-oxo-4H-benz[1,4]oxazin-6-il]-5-fluoro-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidindiamina (compuesto 4)



20 De una manera similar a la preparación de N4-[2-(2-ciclopropil)-3-oxo-4H-benz[1,4]oxazin-6-il]-5-fluoro-N2-[3-(N-metilamino)carbonilmetilenoifenil]-2,4-pirimidindiamina, se hicieron reaccionar 2-cloro-N4-[2-(2-ciclopropil)-3-oxo-4H-benz[1,4] oxazin-6-il]-5-fluoro-4-pirimidinamina y 3,4,5-trimetoxianilina proporcionando el producto deseado N4-[2-(2-ciclopropil)-3-oxo-4H-benz[1,4]oxazin-6-il]-5-fluoro-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidindiamina. ¹H-RMN (DMSO-d6): δ 8,12 (d, 1H), 7,21 (m, 2H), 6,87 (s, 2H), 6,77 (d, 1H), 3,58 (s, 6H), 3,56 (s, 3H), 1,20 (m, 4H); CL-EM: tiempo de retención 10,25 min; pureza del 96,5%; EM (m/e): 468 (MH⁺).

25 7.2.16 N4-[2-(2-Ciclopropil)-3-oxo-4H-benz[1,4]oxazin-6-il]-5-fluoro-N2-(3,4-dimetoxi-5-hidroxifenil)-2,4-pirimidindiamina (compuesto 5)



30 De una manera similar a la preparación de N4-[2-(2-ciclopropil)-3-oxo-4H-benz[1,4]oxazin-6-il]-5-fluoro-N2-[3-(N-metilamino)carbonilmetilenoifenil]-2,4-pirimidindiamina, se hicieron reaccionar 2-cloro-N4-[2-(2-ciclopropil)-3-oxo-4H-benz[1,4] oxazin-6-il]-5-fluoro-4-pirimidinamina y clorhidrato de 5-dimetoxi-3-hidroxianilina proporcionando el producto deseado N4-[2-(2-ciclopropil)-3-oxo-4H-benz[1,4]oxazin-6-il]-5-fluoro-N2-(3-hidroxi-4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidindiamina. ¹H-RMN (DMSO-d6): δ 8,22 (s, 1H), 8,02 (d, 2H), 7,33 (m, 2H), 6,83 (m, 3H), 3,56 (s, 6H), 1,20 (m, 4H); pureza del 99%; EM (m/e): 454 (MH⁺).

40 7.3 Ensayos para determinar si los compuestos de espiro-2,4-pirimidindiamina inhiben la desgranulación mediada por receptor FcεR1

45 La capacidad de los compuestos de espiro-2,4-pirimidindiamina para inhibir la desgranulación inducida por IgE puede demostrarse en una variedad de ensayos celulares con mastocitos humanos en cultivo (CHMC) y/o células derivadas de médula ósea de ratón (BMMC). La inhibición de la desgranulación se mide a densidad celular tanto baja como alta cuantificando la liberación de los factores específicos de gránulos triptasa, histamina y hexosaminidasa. La inhibición de la liberación y/o la síntesis de mediadores lipídicos se somete a ensayo midiendo la liberación de leucotrieno LTC4 y la inhibición de la liberación y/o la síntesis de citocinas se monitorizó cuantificando TNFα, IL-6 y IL-13. Se cuantifican la triptasa y la hexosaminidasa usando sustratos fluorogénicos tal como se describe en sus ejemplos respectivos. Se cuantifican la histamina, TNFα, IL-6, IL-13 y LTC4 usando los siguientes kits de ELISA comerciales: histamina (Immunotech n.º 2015, Beckman Coulter), TNFα (Biosource n.º

KHC3011), IL-6 (Biosource n.º KMC0061), IL-13 (Biosource n.º KHC0132) y LTC4 (Cayman Chemical n.º 520211). A continuación se proporcionan los protocolos de los diversos ensayos.

7.3.1 Cultivo de mastocitos y basófilos humanos

5 Se cultivan mastocitos y basófilos humanos a partir de células progenitoras negativas para tal como se describe a continuación (véanse también los métodos descritos en la solicitud estadounidense en tramitación junto con la presente con n.º de serie 10/053.355, presentada el 8 de noviembre de 2001).

10 7.3.2 Preparación de medio completo STEMPRO-34

15 Para preparar medio completo STEMPRO-34 ("CM"), se añaden 250 mL de medio libre de suero STEMPRO-34™ ("SFM"; GibcoBRL, n.º de catálogo 10640) a un matraz de filtración. A esto se le añaden 13 mL de complemento de nutrientes STEMPRO-34 ("NS"; GibcoBRL, n.º de catálogo 10641) (preparado tal como se describe más detalladamente a continuación). Se aclara el recipiente de NS con aproximadamente 10 mL de SFM y se añade el líquido de aclarado al matraz de filtración. Tras la adición de 5 mL de L-glutamina (200 mM; Mediatech, n.º de catálogo MT 25-005-CI y 5 mL de 100X penicilina/estreptomicina ("pen-strep"; HyClone, n.º de catálogo SV30010), se lleva el volumen a 500 mL con SFM y se filtra la disolución.

20 El aspecto más variable de preparar el CM es el método mediante el cual se descongela el NS y se mezcla antes de la adición al SFM. El NS debe descongelarse en un baño de agua a 37°C y se gira en círculos, sin vórtice ni agitación, hasta que está en disolución. Mientras se gira en círculos, obsérvese si hay algún lípido que aún no está en disolución. Si hay lípidos presentes y el NS no tiene un aspecto uniforme, se devuelve al baño de agua y se repite el proceso de girar en círculos hasta que su aspecto es uniforme. Algunas veces este componente pasa
25 inmediatamente a disolución, algunas veces tras un par de ciclos de girar en círculos, y algunas veces no se consigue. Si tras un par de horas el NS todavía no está en disolución, se desecha y se descongela una nueva unidad. No debe usarse un NS que parece no ser uniforme tras descongelarse.

30 7.3.3 Expansión de células CD34+

35 Se expande una población inicial de células positivas para CD34 (CD34+) de número relativamente pequeño (1-5 x 10⁶ células) hasta un número relativamente grande de células progenitoras negativas para CD34 (aproximadamente 2-4 x 10⁹ células) usando los medios de cultivo y métodos descritos a continuación. Las células CD34+ (de un único donante) se obtienen de Allcells (Berkeley, CA). Dado que hay un grado de variación en la calidad y el número de células CD34+ que Allcells proporciona normalmente, se transfieren las células recién entregadas a un tubo cónico de 15 mL y se llevan a 10 mL en CM antes de su uso.

40 En el día 0, se realiza un recuento celular sobre las células viables (fase brillante) y se centrifugaron las células a 1200 rpm hasta sedimentación. Se resuspenden las células hasta una densidad de 275.000 células/mL con CM que contiene 200 ng/mL de factor de células madre humano recombinante ("SCF"; Peprotech, n.º de catálogo 300-07) y 20 ng/mL de ligando flt-3 humano (Peprotech, n.º de catálogo 300-19) ("medio CM/SCF/flt-3"). Aproximadamente en el día 4 ó 5, se comprueba la densidad del cultivo realizando un recuento celular y se diluye el cultivo hasta una densidad de 275.000 células/mL con medio CM/SCF/flt-3 nuevo. Aproximadamente en el día 7, se transfiere el cultivo a un tubo estéril y se realiza un recuento celular. Se centrifugan las células a 1200 rpm y se resuspenden
45 hasta una densidad de 275.000 células/mL con medio CM/SCF/flt-3 nuevo.

Se repite el ciclo, comenzando desde el día 0, un total de 3-5 veces a lo largo del periodo de expansión.

50 Cuando el cultivo es grande y está manteniéndose en múltiples matraces y va a resuspenderse, se combina el contenido de todos los matraces en un único recipiente antes de realizar un recuento celular. Esto garantiza que se logra un recuento celular preciso y proporciona un grado de uniformidad de tratamiento para toda la población. Cada matraz se comprueba por separado para detectar contaminación con el microscopio antes de combinarlos para impedir la contaminación de toda la población.

55 Entre los días 17-24, el cultivo puede comenzar a disminuir (es decir, aproximadamente el 5-10% del número total de células mueren) y no logra expandirse tan rápidamente como antes. Entonces se monitorizan las células diariamente durante este tiempo, ya que un fallo completo del cultivo puede tener lugar en tan sólo 24 horas. Una vez que ha comenzado la disminución, se cuentan las células, se centrifugan a 850 rpm durante 15 minutos, y se resuspenden a una densidad de 350.000 células/mL en medio CM/SCF/flt-3 para inducir una o dos divisiones más
60 del cultivo. Se monitorizan las células diariamente para evitar un fallo del cultivo.

Cuando es evidente más del 15% de muerte celular en el cultivo de células progenitoras y hay algo de residuo presente en el cultivo, las células progenitoras negativas para CD34 están listas para diferenciarse.

65 7.3.4 Diferenciación de células progenitoras negativas para CD34 en mastocitos de la mucosa

- Se realiza una segunda fase para convertir las células progenitoras negativas para CD34 expandidas en mastocitos de la mucosa diferenciados. Estos mastocitos humanos cultivados ("CHMC") de la mucosa se derivan de células CD34+ aisladas de sangre del cordón umbilical y se tratan para formar una población proliferada de células progenitoras negativas para CD34, tal como se describió anteriormente. Para producir las células progenitoras negativas para CD43, el ciclo de resuspensión para el cultivo es el mismo que el descrito anteriormente, excepto porque se siembra el cultivo a una densidad de 425.000 células/mL y se añade un 15% de medios adicionales aproximadamente en el día cuatro o cinco sin realizar un recuento celular. Además, se modifica la composición de citocina del medio de modo que contiene SCF (200 ng/mL) e IL-6 humana recombinante (200 ng/mL; Peprotech, n.º de catálogo 200-06 reconstituida hasta 100 ug/mL en ácido acético 10 mM estéril) ("medio CM/SCF/IL-6").
- Las fases I y II juntas abarcan aproximadamente 5 semanas. Algo de muerte y residuo en el cultivo resulta evidente durante las semanas 1-3 y hay un periodo durante las semanas 2-5 durante el cual un pequeño porcentaje del cultivo ya no está en suspensión, sino que en vez de eso está fijado a la superficie del recipiente de cultivo.
- Como durante la fase I, cuando el cultivo tiene que resuspenderse en el día siete de cada ciclo, se combina el contenido de todos los matraces en un único recipiente antes de realizar un recuento celular para garantizar la uniformidad de toda la población. Se comprueba cada matraz por separado para detectar contaminación con el microscopio antes de la combinación para impedir la contaminación de toda la población.
- Cuando se combinan los matraces, aproximadamente el 75% del volumen se transfiere al recipiente común, dejando atrás aproximadamente 10 mL más o menos en el matraz. El matraz que contiene el volumen restante se golpea brusca y lateralmente para desplazar las células fijadas. El golpeo se repite con un ángulo recto con respecto al primer golpe para desplazar completamente las células.
- Se inclina el matraz a un ángulo de 45 grados durante un par de minutos antes de transferir el volumen restante al recipiente de recuento. Se centrifugan las células a 950 rpm durante 15 min antes de sembrar a 35-50 mL por matraz (a una densidad de 425.000 células/mL).
- ### 7.3.5 Diferenciación de células progenitoras negativas para CD34 en mastocitos de tipo tejido conjuntivo
- Se prepara una población proliferada de células progenitoras negativas para CD34 tal como anteriormente y se trata para formar un fenotipo positivo para triptasa / quimasa (tejido conjuntivo). Los métodos se realizan tal como se describió anteriormente para los mastocitos de la mucosa, pero con la sustitución de IL-6 por IL-4 en el medio de cultivo. Las células obtenidas son típicas de mastocitos de tejido conjuntivo.
- ### 7.3.6 Diferenciación de células progenitoras negativas para CD34 en basófilos
- Se prepara una población proliferada de células progenitoras negativas para CD34 tal como se describió en la sección 7.2.1.3, anteriormente, y se usa para formar una población proliferada de basófilos. Las células negativas para CD34 se tratan tal como se describió para mastocitos de la mucosa, pero con la sustitución de IL-6 por IL-3 (a 20-50 ng/mL) en el medio de cultivo.
- ### 7.3.7 Activación mediante IgE a baja densidad celular CHMC: ensayos de triptasa y LTC4
- A placas de fondo en U de 96 pocillos por duplicado (Costar 3799) se les añaden 65 ul de diluciones de compuesto o muestras control que se han preparado en MT [NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, CaCl₂ 1,8 mM, MgCl₂ 1,0 mM, glucosa 5,6 mM, Hepes 20 mM (pH 7,4), albúmina de suero bovino al 0,1%, (Sigma A4503)] que contenía MeOH al 2% y DMSO al 1%. Se sedimentan células CHMC (980 rpm, 10 min.) y se resuspenden en MT previamente calentado. Se añaden 65 ul de células a cada placa de 96 pocillos. Dependiendo de la actividad de desgranulación para cada donante de CHMC particular, se cargan 1000-1500 células/pocillo. Se mezclan cuatro veces seguido por una incubación de 1 h a 37°C. Durante la incubación de 1 h, se prepara una disolución de anticuerpo anti-IgE 6X [anticuerpo de conejo anti-IgE humana (1 mg/ml, Betil Laboratories A80-109A) diluido 1:167 en tampón MT]. Se estimulan las células añadiendo 25 ul de disolución de anticuerpo anti-IgE 6X a las placas apropiadas. Se añaden 25 ul de MT a pocillos control no estimulados. Se mezcla dos veces tras la adición del anticuerpo anti-IgE. Se incuba a 37°C durante 30 minutos. Durante la incubación de 30 minutos, se diluye la disolución madre de sustrato triptasa 20 mM [(Z-Ala-Lys-Arg-AMC2TFA; Enzyme Systems Products, n.º AMC-246)] 1:2000 en tampón de ensayo triptasa [Hepes 0,1 M (pH 7,5), glicerol 10% p/v, heparina 10 uM (Sigma H-4898) 0,01 NaN₃]. Se centrifugan las placas a 1000 rpm durante 10 min para sedimentar células. Se transfieren 25 ul de sobrenadante a una placa de fondo negro de 96 pocillos y se añaden 100 ul de disolución de sustrato triptasa recién diluida a cada pocillo. Se incuban las placas a temperatura ambiente durante 30 min. Se lee la densidad óptica de las placas a 355 nm/460 nm en un lector de placas espectrofotométrico.
- También se cuantifica leucotrieno C4 (LTC4) usando un kit ELISA en muestras de sobrenadante diluidas apropiadamente (determinado empíricamente para cada población de células de donante de modo que la medición de la muestra se encuentra dentro de la curva patrón) siguiendo las instrucciones del proveedor.

7.3.8 Activación mediante IgE a alta densidad celular CHMC: ensayos de desgranulación (triptasa, histamina), leucotrieno (LTC₄), y citocina (TNF α , IL-13)

5 Se sensibilizan mastocitos humanos cultivados (CHMC) durante 5 días con IL-4 (20 ng/ml), SCF (200 ng/ml), IL-6 (200 ng/ml), e IgE humana (CP 1035K de Cortx Biochem, 100-500 ng/ml dependiendo de la generación) en medio CM. Tras la sensibilización, se cuentan las células, se sedimentan (1000 rpm, 5-10 minutos), y se resuspenden a 1-2 x10⁶ células/ml en tampón MT. Se añaden 100 ul de suspensión celular a cada pocillo y 100 ul de diluciones de compuesto. La concentración de vehículo final es del 0,5% de DMSO. Se incuban a 37°C (CO₂ al 5%) durante 1 hora. Tras 1 hora de tratamiento de compuesto, se estimulan las células con anticuerpo anti-IgE 6X. Se mezclan los pocillos con las células y se dejan incubar las placas a 37°C (CO₂ al 5%) durante una hora. Tras una incubación de 1 hora, se sedimentan las células (10 minutos, 1000 RPM) y se recogen 200 ul por pocillo del sobrenadante, con cuidado de no alterar el sedimento. Se coloca la placa de sobrenadante sobre hielo. Durante la etapa de 7 horas (véase a continuación) se realiza un ensayo de triptasa con el sobrenadante que se ha diluido 1:500. Se resuspende el sedimento celular en 240 ul de medios CM que contienen el 0,5% de DMSO y una concentración correspondiente de compuesto. Se incuban células CHMC durante 7 horas a 37°C (CO₂ al 5%). Tras la incubación, se sedimentan células (1000 RPM, 10 minutos) y se recogen 225 ul por pocillo y se colocan a -80°C hasta que están listas para realizar ensayos ELISA. Se realizan ensayos ELISA en muestras diluidas apropiadamente (determinado empíricamente para cada población de células de donante de modo que la medición de la muestra se encuentra dentro de la curva patrón) siguiendo las instrucciones del proveedor.

20 7.4 Los compuestos de 2,4-pirimidindiamina de la invención pueden inhibir selectivamente la cascada del receptor de IgE aguas arriba

25 Los compuestos de espiro-2,4-pirimidindiamina pueden someterse a prueba en ensayos celulares para determinar la desgranulación inducida por ionomicina, tal como se describe a continuación, para determinar si bloquean o inhiben la cascada de transducción de señales del receptor de IgE de manera temprana.

7.4.1 Activación mediante ionomicina a baja densidad celular de CHMC: ensayo de triptasa

30 Se llevan a cabo ensayos para determinar la desgranulación de mastocitos inducida por ionomicina tal como se describió para los ensayos de activación mediante IgE a baja densidad de CHMC (sección 7.2.2, citado anteriormente), con la excepción de que durante la incubación de 1 hora, se prepara una disolución de ionomicina 6X [ionomicina 5 mM (Sigma I-0634) en MeOH (disolución madre) diluida 1:416,7 en tampón MT (2 μ M final)] y se estimulan las células añadiendo 25 μ l de la disolución de ionomicina 6X a las placas apropiadas.

35 7.5 Los compuestos de espiro-2,4-pirimidindiamina inhiben la cascada de señalización del receptor de IgE

40 Se sometieron a prueba los compuestos 1-5 para determinar su capacidad para inhibir la cascada de señalización del receptor de IgE en un ensayo de 8 puntos con células CHMC. Para el ensayo se midió la cantidad de liberación de triptasa. Los cinco compuestos mostraron CI₅₀ inferiores a 100 nM.

7.6 Los compuestos de 2,4-pirimidindiamina inhiben la cinasa Syk en ensayos bioquímicos

45 Pueden someterse a prueba los compuestos de espiro-2,4-pirimidindiamina para determinar su capacidad para inhibir la fosforilación catalizada por la cinasa Syk de un sustrato peptídico en un ensayo de polarización de fluorescencia bioquímico con cinasa Syk aislada. En este experimento, se diluyen compuestos hasta DMSO al 1% en tampón cinasa (HEPES 20 mM, pH 7,4, MgCl₂ 5 mM, MnCl₂ 2 mM, DTT 1 mM, gamma-globulina bovina acetilada 0,1 mg/mL). Se mezclan compuestos en DMSO al 1% (0,2% de DMSO final) con disolución de ATP/sustrato a temperatura ambiente. Se añade cinasa Syk (Upstate, Lake Placid NY) hasta un volumen de reacción final de 20 μ L, y se incuba la reacción durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las condiciones de reacción enzimática finales son HEPES 20 mM, pH 7,4, MgCl₂ 5 mM, MnCl₂ 2 mM, DTT 1 mM, gamma-globulina bovina acetilada 0,1 mg/mL, 0,125 ng de Syk, ATP 4 μ M, sustrato peptídico 2,5 μ M (biotina-EQEDEPEGDYEEVLE-CONH₂, SynPep Corporation). Se añade EDTA (10 mM final)/anticuerpo anti-fosfotirosina (1X final)/indicador fosfopeptídico fluorescente (0,5X final) en tampón de dilución FP para detener la reacción hasta un volumen total de 40 μ L según instrucciones del fabricante (PanVera Corporation). Se incuba la placa durante 30 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Se leen las placas en un lector de placas de polarización de fluorescencia Polarion (Tecan). Se convierten los datos en una cantidad de fosfopeptido presente usando una curva de calibración generada mediante competición con el competidor fosfopeptídico proporcionado en el kit de ensayo de tirosina cinasa, Green (PanVera Corporation).

60 Se sometieron a prueba los compuestos 1-4 en este ensayo. Todos los compuestos mostraron una CI₅₀ de inhibición de Syk inferior a 125 nM.

65 7.7 La eficacia *in vivo* de compuestos frente a enfermedades autoinmunitarias puede demostrarse en un modelo de ratón de artritis inducida por anticuerpo frente al colágeno (CAIA).

7.7.1 Modelo

5 La artritis inducida por colágeno (CIA) en roedores se usa con frecuencia como uno de los modelos experimentales para lesión tisular mediada por IC. La administración de colágeno tipo II en ratones o ratas da como resultado una reacción inmunitaria que implica de manera característica la destrucción inflamatoria de cartílago y hueso de las articulaciones distales con hinchamiento concomitante de tejidos circundantes. La CIA se usa comúnmente para evaluar compuestos que pueden tener un uso potencial como fármacos para el tratamiento de artritis reumatoide y otros estados inflamatorios crónicos.

10 En los últimos años, surgió una nueva técnica en la modelización de CIA, en la que se aplican los anticuerpos anti-colágeno tipo II para inducir una CIA mediada por anticuerpos. Las ventajas del método son: tiempo corto para la inducción de enfermedad (que se desarrolla en el plazo de 24-48 h tras una inyección intravenosa (i.v.) de anticuerpos); la artritis puede inducirse en cepas de ratón tanto susceptibles de CIA como resistentes a CIA; y el procedimiento es ideal para una selección rápida de agentes terapéuticos antiinflamatorios.

15 Se administra cóctel de anticuerpos monoclonales inductores de artritis Arthrogen-CIA® (Chemicon International Inc.) por vía intravenosa a ratones Balb/c (2 mg/ratón) en el día 0. Cuarenta y ocho horas después, se inyectan por vía intraperitoneal 100 µl de LPS (25 µg). En el día 4, los dedos pueden aparecer hinchados. En el día 5, una o dos patas (particular las patas traseras) comienzan a aparecer rojas e hinchadas. En el día 6, y posteriormente, seguirá habiendo patas rojas e hinchadas durante al menos 1-2 semanas. Durante el estudio, se puntúan los signos clínicos de inflamación para evaluar la intensidad de edema en las patas. Se registra la gravedad de artritis como la puntuación suma de ambas patas traseras para cada animal (puntuación máxima posible de 8). Se evalúa el grado de inflamación con patas afectadas midiendo el diámetro de las patas. Se monitorizan cambios en el peso corporal.

25 Pueden tratarse los animales en el momento de inducción de artritis, comenzando en el día 0. Pueden administrarse compuestos de prueba y compuestos control una vez al día (q.d.) o dos veces al día (b.i.d.), por vía oral (v.o.), dependiendo de perfiles de PK previamente establecidos.

30 Al final del estudio (1-2 semanas tras la inducción de artritis), se sacrifican los ratones y se transeccionan las patas en la tibia distal usando una guillotina y se pesan. Se determina la media \pm error estándar de la media (EEM) para cada grupo cada día a partir de puntuaciones clínicas de animales individuales, y se calculan pesos de pata trasera para cada grupo experimental y se registran al terminar el estudio. Se obtiene una evaluación histopatológica de las patas.

35 7.7.2 Resultados

La reducción de la inflamación y el hinchamiento debe ser evidente en animales tratados con compuestos descritos en el presente documento, y la artritis avanzará más lentamente. El tratamiento con compuestos (b.i.d.) debe reducir significativamente la artritis clínica en comparación con animales tratados sólo con vehículo.

40 7.8 Los Compuestos pueden ser eficaces en la artritis inducida por colágeno en ratas

Puede demostrarse la eficacia *in vivo* de compuestos descritos en el presente documento frente a enfermedades autoinmunitarias en un modelo de rata de artritis inducida por colágeno (CIA).

45 7.8.1 Descripción del modelo

50 La artritis reumatoide (AR) se caracteriza por inflamación de articulaciones crónica que conduce eventualmente a una destrucción irreversible del cartílago. IC que contiene IgG son abundantes en el tejido sinovial de pacientes con AR. Aunque todavía se debate qué papel desempeñan estos complejos en la etiología y patología de la enfermedad, IC se comunica con las células hematopoyéticas mediante el Fc γ R.

55 La CIA es un modelo animal ampliamente aceptado de AR que da como resultado sinovitis inflamatoria crónica caracterizada por formación de paño y degradación de articulaciones. En este modelo, la inmunización por vía intradérmica con colágeno tipo II nativo, emulsionado con adyuvante incompleto de Freund, da como resultado una poliartritis inflamatoria en el plazo de 10 u 11 días y posterior destrucción de las articulaciones en de 3 a 4 semanas.

7.8.2 Protocolo del estudio

60 Se inmunizan ratas LOU sinérgicas en el día 0 con CII de pollo nativo/IFA (realizado en UCLA; E. Brahn, investigador principal). Comenzando en el día de aparición de la artritis (día 10), se trató un total de 59 ratas o bien con un control de vehículo o bien con un compuesto descrito en el presente documento a uno de cuatro niveles de dosis (1, 3, 10 y 30 mg/kg, q.d. mediante alimentación por sonda v.o.).

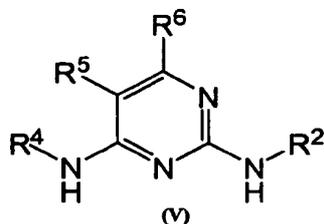
65 7.8.3 Resultados

5 Se puntúan diariamente las extremidades traseras para la gravedad de la artritis clínica usando un método normalizado basado en el grado de inflamación de articulaciones. Pueden obtenerse radiografías digitales de alta resolución de las extremidades traseras al terminar el estudio (día 28). Estas extremidades también pueden analizarse para detectar cambios histopatológicos. Pueden medirse anticuerpos de IgG frente a CII nativo por cuádruplicado mediante ELISA.

10 Aunque se ha descrito la invención anterior en cierto detalle para facilitar su comprensión, resultará evidente que pueden realizarse determinados cambios y modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Por consiguiente, las realizaciones descritas deben considerarse como ilustrativas y no limitativas, y la invención no debe limitarse a los detalles facilitados en el presente documento, sino que pueden modificarse dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto según la fórmula estructural (V):

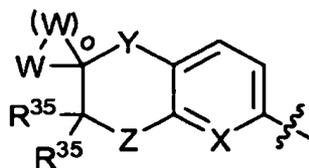


5

incluyendo sales, hidratos, solvatos y N-óxidos del mismo, en el que:

10 R^2 se selecciona del grupo que consiste en arilo (C_5-C_{15}) opcionalmente sustituido con uno o más de los grupos R^8 iguales o diferentes, y heteroarilo de 5 a 15 miembros opcionalmente sustituido con uno o más de los grupos R^8 iguales o diferentes;

R^4 es



15

cada W es, independientemente del otro, $-CR^{31}R^{31}-$;

20 X se selecciona del grupo que consiste en -N- y -CH-;

Y y Z se seleccionan cada uno independientemente entre sí del grupo que consiste en -O-, -S-, -SO-, -SO₂-, -SONR³⁰-, -NH-, y -NR³⁵-;

25 R^5 se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, -OR^d, -SR^d, haloalquilo (C₁-C₃), perhaloalquilo (C₁-C₃), -NR^cR^c, halógeno, haloalquilo (C₁-C₃), perhaloalquilo (C₁-C₃), -CN, -NC, -OCN, -SCN, -NO, -NO₂, -N₃, -S(O)R^d, -S(O)₂R^d, -S(O)₂OR^d, -S(O)NR^cR^c, -S(O)₂NR^cR^c, -OS(O)R^d, -OS(O)₂R^d, -OS(O)₂OR^d, -OS(O)NR^cR^c, -OS(O)₂NR^cR^c, -C(O)R^d, -C(O)OR^d, -C(O)NR^cR^c, -C(NH)NR^cR^c, -OC(O)R^d, -SC(O)R^d, -OC(O)OR^d, -SC(O)OR^d, -OC(O)NR^cR^c, -SC(O)NR^cR^c, -OC(NH)NR^cR^c, -SC(NH)NR^cR^c, -[NHC(O)]_nR^d, -[NHC(O)]_nOR^d, -[NHC(O)]_nNR^cR^c y -[NHC(NH)]_nNR^cR^c, arilo (C₅-C₁₀) opcionalmente sustituido con uno o más de los grupos R^8 iguales o diferentes, arilalquilo (C₆-C₁₆) opcionalmente sustituido con uno o más de los grupos R^8 iguales o diferentes, heteroarilo de 5 a 10 miembros opcionalmente sustituido con uno o más de los grupos R^8 iguales o diferentes y heteroarilalquilo de 6 a 16 miembros opcionalmente sustituido con uno o más de los grupos R^8 iguales o diferentes, alquilo (C₁-C₆) opcionalmente sustituido con uno o más de los grupos R^8 iguales o diferentes, alcanilo (C₁-C₄) opcionalmente sustituido con uno o más de los grupos R^8 iguales o diferentes, alquínilo (C₂-C₄) opcionalmente sustituido con uno o más de los grupos R^8 iguales o diferentes y alquénilo (C₂-C₄) opcionalmente sustituido con uno o más de los grupos R^8 iguales o diferentes;

40 R^6 se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, -OR^d, -SR^d, haloalquilo (C₁-C₃), perhaloalquilo (C₁-C₃), -NR^cR^c, halógeno, haloalquilo (C₁-C₃), perhaloalquilo (C₁-C₃), -CN, -NC, -OCN, -SCN, -NO, -NO₂, -N₃, -S(O)R^d, -S(O)₂R^d, -S(O)₂OR^d, -S(O)NR^cR^c, -S(O)₂NR^cR^c, -OS(O)R^d, -OS(O)₂R^d, -OS(O)₂OR^d, -OS(O)NR^cR^c, -OS(O)₂NR^cR^c, -C(O)R^d, -C(O)OR^d, -C(O)NR^cR^c, -C(NH)NR^cR^c, -OC(O)R^d, -SC(O)R^d, -OC(O)OR^d, -SC(O)OR^d, -OC(O)NR^cR^c, -SC(O)NR^cR^c, -OC(NH)NR^cR^c, -SC(NH)NR^cR^c, -[NHC(O)]_nR^d, -[NHC(O)]_nOR^d, -[NHC(O)]_nNR^cR^c y -[NHC(NH)]_nNR^cR^c, arilo (C₅-C₁₀) opcionalmente sustituido con uno o más de los grupos R^8 iguales o diferentes, arilalquilo (C₆-C₁₆) opcionalmente sustituido con uno o más de los grupos R^8 iguales o diferentes, heteroarilo de 5 a 10 miembros opcionalmente sustituido con uno o más de los grupos R^8 iguales o diferentes y heteroarilalquilo de 6 a 16 miembros opcionalmente sustituido con uno o más de los grupos R^8 iguales o diferentes;

50 R^8 se selecciona del grupo que consiste en R^a, R^b, R^a sustituido con uno o más de R^a o R^b iguales o diferentes, -OR^a sustituido con uno o más de R^a o R^b iguales o diferentes, -B(OR^a)₂, -B(NR^cR^c)₂, -(CH₂)_m-R^b, -(CHR^a)_m-R^b, -O-(CH₂)_m-R^b, -S-(CH₂)_m-R^b, -O-CHR^aR^b, -O-CR^a(R^b)₂, -O-(CHR^a)_m-R^b, -O-(CH₂)_m-CH[(CH₂)_mR^b]₂, -S-(CHR^a)_m-R^b, -C(O)NH-

$(\text{CH}_2)_m\text{-R}^b$, $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-(\text{CHR}^a)_m\text{-R}^b$, $-\text{O}-(\text{CH}_2)_m\text{-C}(\text{O})\text{NH}-(\text{CH}_2)_m\text{-R}^b$, $-\text{S}-(\text{CH}_2)_m\text{-C}(\text{O})\text{NH}-(\text{CH}_2)_m\text{-R}^b$, $-\text{O}-(\text{CHR}^a)_m\text{-C}(\text{O})\text{NH}-(\text{CHR}^a)_m\text{-R}^b$, $-\text{S}-(\text{CHR}^a)_m\text{-C}(\text{O})\text{NH}-(\text{CHR}^a)_m\text{-R}^b$, $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_m\text{-R}^b$, $-\text{NH}-(\text{CHR}^a)_m\text{-R}^b$, $-\text{NH}[(\text{CH}_2)_m\text{R}^b]$, $-\text{N}[(\text{CH}_2)_m\text{R}^b]_2$, $-\text{NH}-\text{C}(\text{O})\text{NH}-(\text{CH}_2)_m\text{-R}^b$, $-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_m\text{-CHR}^b\text{R}^b$ y $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_m\text{-C}(\text{O})\text{NH}-(\text{CH}_2)_m\text{-R}^b$;

5 cada R^{31} es, independientemente de los demás, hidrógeno o alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$) opcionalmente sustituido con uno o más de los grupos R^8 iguales o diferentes;

cada R^{35} se selecciona independientemente del otro del grupo que consiste en hidrógeno y R^8 , o, alternativamente, los dos grupos R^{35} se toman juntos para formar un grupo oxo ($=\text{O}$) o $=\text{NR}^{38}$;

10 cada R^{36} se selecciona independientemente de los demás del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$);

R^{38} se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$) y arilo ($\text{C}_5\text{-C}_{14}$);

15 cada R^a se selecciona independientemente de los demás del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$), cicloalquilo ($\text{C}_3\text{-C}_8$), cicloalquilalquilo ($\text{C}_4\text{-C}_{11}$), arilo ($\text{C}_5\text{-C}_{10}$), arilalquilo ($\text{C}_6\text{-C}_{16}$), heteroalquilo de 2 a 6 miembros, cicloheteroalquilo de 3 a 8 miembros, cicloheteroalquilalquilo de 4 a 11 miembros, heteroarilo de 5 a 10 miembros y heteroarilalquilo de 6 a 16 miembros;

20 cada R^b se selecciona independientemente de los demás del grupo que consiste en $=\text{O}$, $-\text{OR}^d$, haloalquiloxilo ($\text{C}_1\text{-C}_3$), $=\text{S}$, $-\text{SR}^d$, $=\text{NR}^d$, $=\text{NOR}^d$, $-\text{NR}^c\text{R}^c$, halógeno, $-\text{CF}_3$, $-\text{CN}$, $-\text{NC}$, $-\text{OCN}$, $-\text{SCN}$, $-\text{NO}$, $-\text{NO}_2$, $=\text{N}_2$, $-\text{N}_3$, $-\text{S}(\text{O})\text{R}^d$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}^d$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{OR}^d$, $-\text{S}(\text{O})\text{NR}^c\text{R}^c$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{NR}^c\text{R}^c$, $-\text{OS}(\text{O})\text{R}^d$, $-\text{OS}(\text{O})_2\text{R}^d$, $-\text{OS}(\text{O})_2\text{OR}^d$, $-\text{OS}(\text{O})_2\text{NR}^c\text{R}^c$, $-\text{C}(\text{O})\text{R}^d$, $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^d$, $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^c\text{R}^c$, $-\text{C}(\text{NH})\text{NR}^c\text{R}^c$, $-\text{C}(\text{NR}^8)\text{NR}^c\text{R}^c$, $-\text{C}(\text{NOH})\text{R}^a$, $-\text{C}(\text{NOH})\text{NR}^c\text{R}^c$, $-\text{OC}(\text{O})\text{R}^d$, $-\text{OC}(\text{O})\text{OR}^d$, $-\text{OC}(\text{O})\text{NR}^c\text{R}^c$, $-\text{OC}(\text{NH})\text{NR}^c\text{R}^c$, $-\text{OC}(\text{NR})\text{NR}^c\text{R}^c$, $-\text{[NHC}(\text{O})\text{]}_n\text{R}^d$, $-\text{[NR}^a\text{C}(\text{O})\text{]}_n\text{R}^d$, $-\text{[NHC}(\text{O})\text{]}_n\text{OR}^d$, $-\text{[NR}^a\text{C}(\text{O})\text{]}_n\text{OR}^d$, $-\text{[NHC}(\text{O})\text{]}_n\text{NR}^c\text{R}^c$, $-\text{[NR}^a\text{C}(\text{O})\text{]}_n\text{NR}^c\text{R}^c$, $-\text{[NHC}(\text{NH})\text{]}_n\text{NR}^c\text{R}^c$ y $-\text{[NR}^a\text{C}(\text{NR}^a)\text{]}_n\text{NR}^c\text{R}^c$;

25 cada R^c es, independientemente de los demás, R^a , o, alternativamente, cada R^c se toma junto con el átomo de nitrógeno al que está unido para formar un cicloheteroalquilo o heteroarilo de 5 a 8 miembros que puede incluir opcionalmente uno o más de los heteroátomos adicionales iguales o diferentes y que puede estar opcionalmente sustituido con uno o más de los grupos R^8 o R^b iguales o diferentes;

30 cada R^d es, independientemente de los demás, R^a ;

cada m es, independientemente de los demás, un número entero desde 1 hasta 3;

35 cada n es, independientemente de los demás, un número entero desde 0 hasta 3; y
es un número entero desde 1 hasta 6.

40 2. Compuesto según la reivindicación 1, en el que R^5 es halo o $-\text{CF}_3$.

3. Compuesto según la reivindicación 1, en el que R^5 es fluoro.

45 4. Compuesto según la reivindicación 1, en el que R^6 es hidrógeno.

5. Compuesto según la reivindicación 1, en el que Y y Z se seleccionan independientemente del grupo que consiste en O y NH .

50 6. Compuesto según la reivindicación 1, en el que X es $-\text{CH}-$.

7. Compuesto según la reivindicación 1, en el que cada R^{35} es hidrógeno.

8. Compuesto según la reivindicación 1, en el que los dos grupos R^{35} forman un grupo oxo.

55 9. Compuesto según la reivindicación 1, en el que Y es O y Z es NH .

10. Compuesto según la reivindicación 1, en el que o es un número entero desde 1 hasta 4.

11. Compuesto según la reivindicación 1, en el que o es 1.

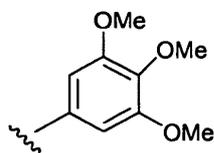
60 12. Compuesto según la reivindicación 1, en el que cada R^{31} es independientemente hidrógeno o alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$).

13. Compuesto según la reivindicación 1, en el que cada R^{31} es hidrógeno.

65 14. Compuesto según la reivindicación 1, en el que R^2 es fenilo opcionalmente sustituido con uno o más de los grupos R^8 iguales o diferentes.

15. Compuesto según la reivindicación 1, en el que R² es un grupo fenilo disustituido con dos grupos R^b o R² es un grupo fenilo trisustituido con tres grupos R^b.

5 16. Compuesto según la reivindicación 1 en el que R² es



10 17. Compuesto según la reivindicación 1, en el que R⁵ es halo o -CF₃ y R⁶ es hidrógeno.

18. Compuesto según la reivindicación 1, en el que R⁵ es fluoro y R⁶ es hidrógeno.

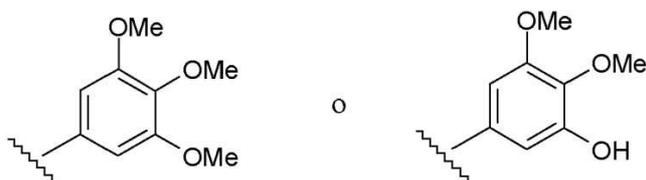
15 19. Compuesto según la reivindicación 1, en el que los dos grupos R³⁵ forman un grupo oxo, Y es O, Z es NH, X es CH y cada R³¹ es hidrógeno.

20 20. Compuesto según la reivindicación 19, en el que R⁵ es fluoro y R⁶ es hidrógeno.

25 21. Compuesto según la reivindicación 20, en el que R² es fenilo opcionalmente sustituido con uno o más de los grupos R⁸ iguales o diferentes.

30 22. Compuesto según la reivindicación 21, en el que R² es un grupo fenilo disustituido con dos grupos R^b o R² es un grupo fenilo trisustituido con tres grupos R^b.

35 23. Compuesto según la reivindicación 21, en el que R² es



y o es 1.

30 24. Compuesto según la reivindicación 1, que comprende además un excipiente, diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.

35 25. Compuesto de 2,4-pirimidindiamina según la reivindicación 1, para su uso en un método de tratamiento o prevención de una enfermedad autoinmunitaria y/o uno o más síntomas asociados con la misma, en un sujeto que padece una enfermedad autoinmunitaria o en riesgo de desarrollar una enfermedad autoinmunitaria.

FIG. 1

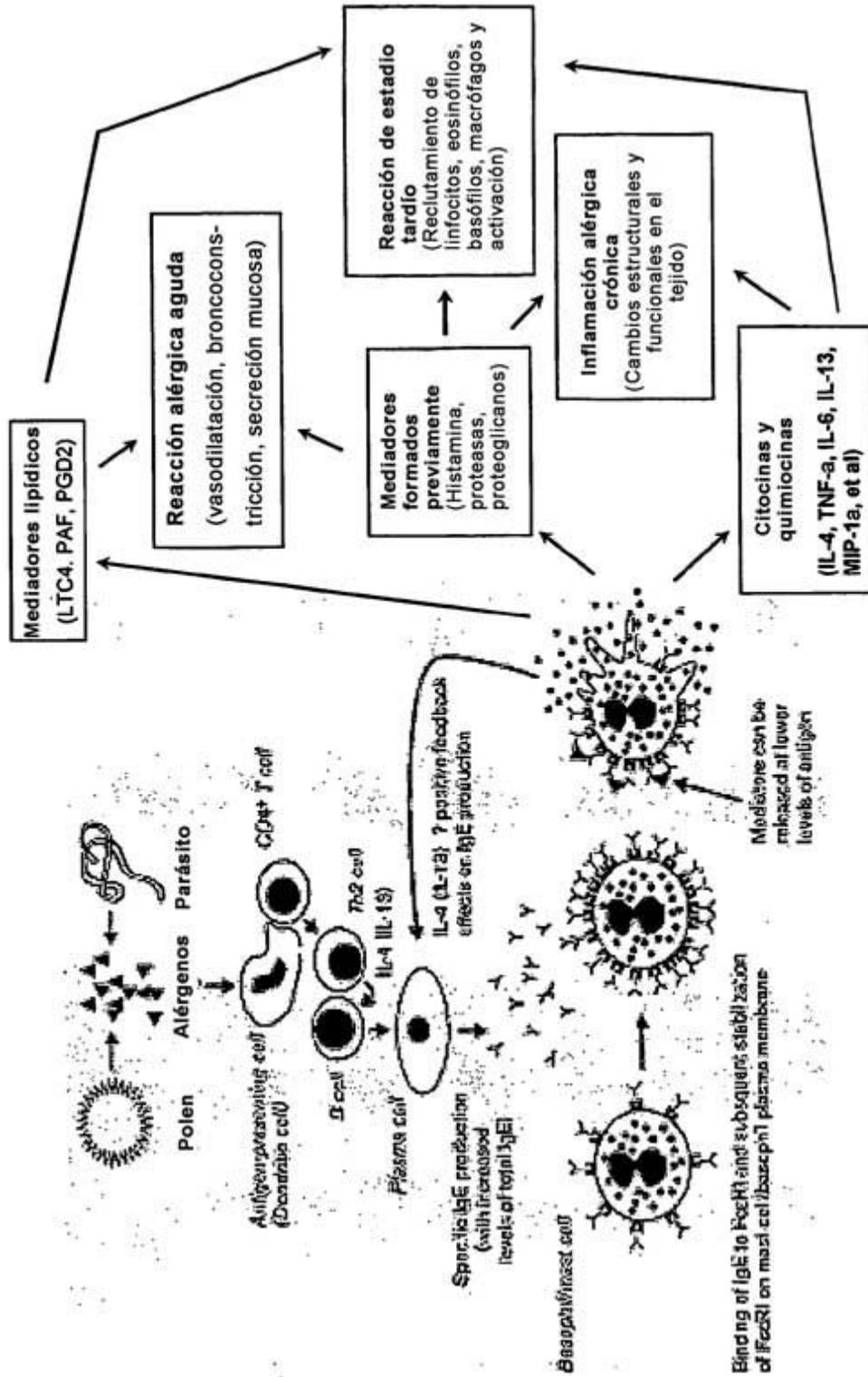


FIG. 2
Ruta de señalización de FcεR1 de mastocitos

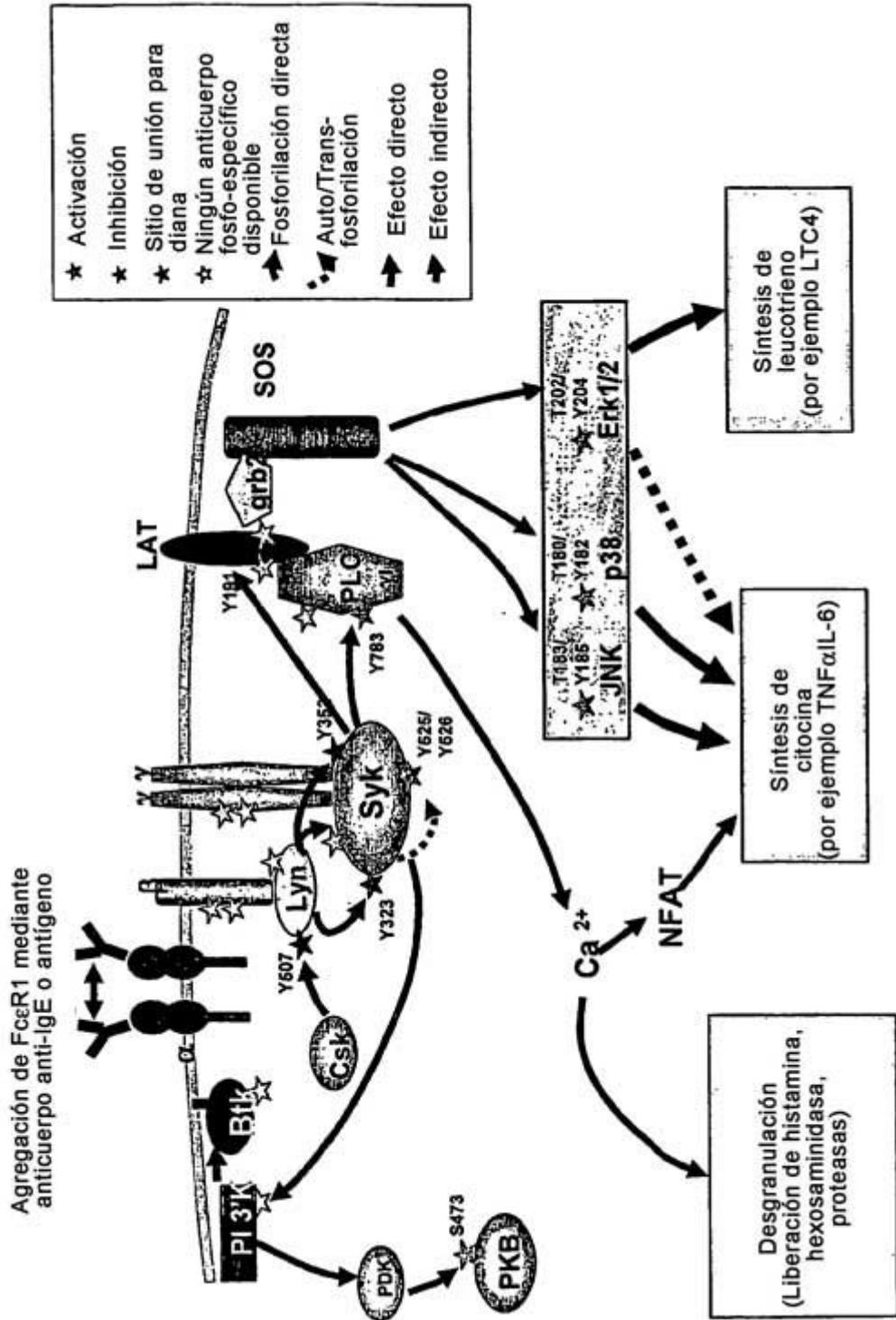


FIG. 3

