

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 380 551**

51 Int. Cl.:
C07D 498/04 (2006.01)
C07F 9/6561 (2006.01)
A61K 31/5383 (2006.01)
A61K 31/675 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07864696 .5**
96 Fecha de presentación: **20.11.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2078026**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.07.2009**

54 Título: **Sales de profármaco de compuestos de 2,4-pirimidindiamina y sus usos**

30 Prioridad:
21.11.2006 US 866722 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:
BHAMIDIPATI, Somasekhar;
SINGH, Rajinder;
SUN, Thomas y
MASUDA, Esteban

74 Agente/Representante:
Linage González, Rafael

ES 2 380 551 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

Sales de profármaco de compuestos de 2,4-pirimidindiamina y sus usos

5 **Referencia a solicitudes de patente relacionadas****Antecedentes de la invención**1. Campo de la invención

10 La presente divulgación se refiere a profármacos de compuestos de 2,4-pirimidindiamina biológicamente activos, composiciones farmacéuticas que comprenden los profármacos, intermedios y métodos de síntesis de preparación de los profármacos y métodos de uso de los profármacos y composiciones en una variedad de contextos, tales como en el tratamiento o prevención de diversas enfermedades.

15 2. Descripción de la técnica relacionada

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 lugar a la liberación de mediadores químicos responsables de numerosos acontecimientos adversos. Por ejemplo, dicha reticulación conduce a la liberación de mediadores preformados de reacciones de hipersensibilidad anafiláctica de tipo I (inmediata), tales como la histamina, desde los sitios de almacenamiento en gránulos mediante desgranulación. También conduce a la síntesis y liberación de otros mediadores, incluidos leucotrienos, prostaglandinas y factores activadores plaquetarios (PAF), que desempeñan papeles importantes en reacciones inflamatorias. Los mediadores adicionales que se sintetizan y se liberan tras la reticulación de receptores de Fc incluyen citocinas y el óxido nítrico.

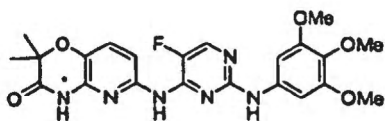
30 La(s) cascada(s) de señalización activada(s) por la reticulación de receptores de Fc, tales como FcεRI y/o FcγRI, comprende(n) un conjunto de proteínas celulares. Entre los propagadores de señal intracelular más importantes se encuentran las tirosina cinasas. Y una importante tirosina cinasa implicada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

35 Los mediadores liberados como resultado de la reticulación de receptores FcεRI y FcγRI son responsables de, o desempeñan papeles importantes en, la manifestación de numerosos acontecimientos adversos. Recientemente, se han descubierto diversas clases de compuestos de 2,4-pirimidindiamina que inhiben las cascadas de señalización de FcεRI y/o FcγRI y que tiene innumerables aplicaciones terapéuticas. Véanse, por ejemplo, la solicitud de EE.UU. con nº de serie 10/355.543 presentada el 31 de enero de 2003 (documento US 2004/0029902), la solicitud internacional con nº de serie PCT/US03/03022 presentada el 31 de enero de 2003 (documento WO 03/063794), la solicitud de EE.UU. nº 10/631.029 presentada el 29 de julio de 2003 (documento US 2005/0028212), la solicitud internacional con nº de serie PCT/US03/24087 (documento WO 2004/014382), la solicitud de EE.UU. nº 10/903.263 presentada el 30 de julio de 2004 (documento US2005/0234049), y la solicitud internacional con nº de serie PCT/US2004/24716 (documento WO 2005/016893). Aunque muchos de estos compuestos muestran buenas propiedades de biodisponibilidad, en algunos casos, puede ser deseable adaptar su solubilidad u otras propiedades, de manera que su biodisponibilidad se optimice a través de rutas de administración específicas. El documento WO 2006/078846 se refiere a profármacos de compuestos de 2,4-pirimidindiamina biológicamente activos y sus usos.

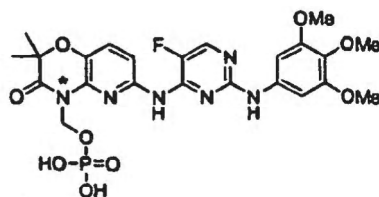
Sumario de la invención

50 La presente divulgación proporciona un cristal que comprende una sal de hidrato de profármaco de un compuesto de 2,4-pirimidindiamina que tiene innumerables actividades biológicas y, por tanto, usos terapéuticos, composiciones que comprenden el hidrato de sal de profármaco, métodos para preparar el hidrato de sal de profármaco y la forma cristalina del mismo y usos del hidrato de sal de profármaco en una variedad de contextos *in vitro* e *in vivo*, incluyendo en el tratamiento y/o prevención de enfermedades mediadas, al menos en parte, por la activación de cascadas de señalización de receptores de Fc.

60 Se ha descubierto que la solubilidad en agua y la biodisponibilidad oral de un compuesto de 2,4-pirimidindiamina biológicamente activo en particular, que se ilustra a continuación (compuesto 1), incrementó considerablemente cuando se formula para que incluya un progrupo R^p de fórmula -CH₂-O-P(O)(OH)₂ en el átomo de nitrógeno de anillo con el asterisco (compuesto 4):



Compuesto 1

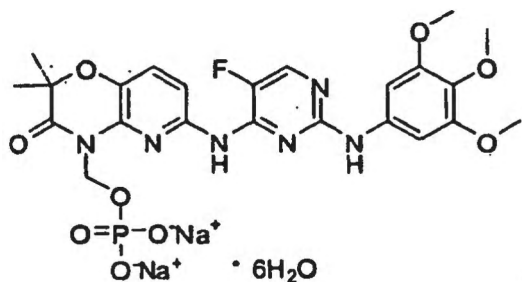


Compuesto 4

De forma significativa, mientras que la solubilidad en agua del fármaco activo (compuesto 1) está en el intervalo de aproximadamente <math><1 \mu\text{g/ml}</math> en tampón acuoso en condiciones fisiológicas, la solubilidad del profármaco de fosfato correspondiente (compuesto 4) es mayor de 5 mg/ml en las mismas condiciones, o aproximadamente 2000 veces mayor. Esta solubilidad en agua incrementada permite una mejor disolución en el intestino, facilitando de este modo la administración oral.

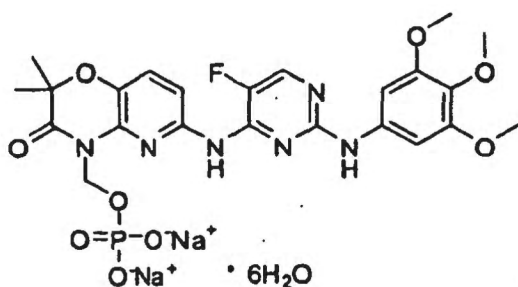
La presente invención proporciona un cristal que comprende un hidrato de sal del compuesto 4 de profármaco de fosfato mostrado anteriormente.

En consecuencia, la invención proporciona un cristal que comprende un hidrato de sal de profármaco con la estructura:



teniendo dicho cristal picos de difracción de rayos X en polvo característicos a valores de dos theta de $3,4^\circ \pm 0,1^\circ$, $6,6^\circ \pm 0,1^\circ$, $9,9^\circ \pm 0,1^\circ$, $13,2^\circ \pm 0,1^\circ$, $17,2^\circ \pm 0,1^\circ$, $19,7^\circ \pm 0,1^\circ$, $21,2^\circ \pm 0,1^\circ$ y $21,8^\circ \pm 0,1^\circ$ cuando se usa una longitud de onda de radiación de 1,54059 Å.

En otro aspecto, la invención proporciona un cristal que comprende un hidrato de sal de profármaco con la estructura:



teniendo dicho cristal simetría espacial de grupo $P2_1/c$ y parámetros de celda unitaria característicos de $a = 27,73 \text{ \AA}$; $b = 7,98 \text{ \AA}$; $c = 15,17 \text{ \AA}$; $\beta = 90^\circ$; alfa, beta = $103,2^\circ$; y gamma = 90° .

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el hidrato de sal de profármaco definido anteriormente y un vehículo, excipiente y/o diluyente farmacéuticamente aceptable. La naturaleza exacta del vehículo, excipiente o diluyente dependerá del uso deseado para la composición y puede variar desde ser adecuado o aceptable para usos veterinarios a ser adecuado o aceptable para uso humano. Opcionalmente, la composición puede incluir uno o más compuestos adicionales.

El profármaco definido anteriormente se metaboliza para proporcionar un compuesto de 2,4-pirimidindiamina que es

un potente inhibidor de la desgranulación de células inmunitarias, tales como mastocitos, basófilos, neutrófilos y/o eosinófilos.

5 Así, en otro aspecto más, la presente invención proporciona un cristal de la invención como se define anteriormente o una composición farmacéutica de la invención como se define anteriormente, para su uso en un método de inhibición de la desgranulación de células en un sujeto. En general, el método implica poner en contacto una célula que se desgranula con una cantidad de la composición o el hidrato de sal de profármaco, eficaz para inhibir la desgranulación de la célula. El método puede ponerse en práctica en contextos *in vivo* como un enfoque terapéutico para el tratamiento o prevención de enfermedades caracterizadas por, causadas por, o asociadas a, la desgranulación celular.

10 Sin pretender vincularse a ninguna teoría de funcionamiento, los datos bioquímicos confirman que muchos de estos compuestos de 2,4-pirimidindiamina activos ejercen su efecto inhibidor de la desgranulación, al menos en parte, bloqueando o inhibiendo la(s) cascada(s) de transducción de señales iniciada por la reticulación de los receptores de Fc de alta afinidad para IgE ("FcεRI") y/o IgG ("FcγRI") (véanse, por ejemplo, la solicitud de EE.UU. con nº de serie 10/631.029 presentada el 29 de julio de 2003 (documento US 2005/0028212), la solicitud internacional con nº de serie PCT/US03/24087 (documento WO2004/014382), la solicitud de EE.UU. con nº de serie 10/903.263 presentada el 25 de julio de 2004 (documento US2005/0234049) y la solicitud internacional con nº de serie PCT/US2004/24716 (documento WO 2005/016893), cuyas divulgaciones se incorporan en el presente documento por referencia). De hecho, estos compuestos de 2,4-pirimidindiamina activos son potentes inhibidores de la desgranulación, tanto mediada por FcεRI como mediada por FcγRI. Como consecuencia, el hidrato de sal de profármaco definido anteriormente se puede usar para inhibir estas cascadas de señalización de receptores de Fc en cualquier tipo de células que expresen tales receptores FcεRI y/o FcγRI, incluyendo, pero sin limitarse a, macrófagos, mastocitos, basófilos, neutrófilos y/o eosinófilos.

25 Los métodos también permiten la regulación de, y, en particular, la inhibición de, procesos posteriores que se producen como consecuencia de la activación de dicha(s) cascada(s) de señalización de receptores de Fc. Tales procesos posteriores incluyen, pero no se limitan a, la desgranulación mediada por FcεRI y/o la desgranulación mediada por FcγRI, la producción de citocinas y/o la producción y/o la liberación de mediadores lipídicos tales como leucotrienos y prostaglandinas. En general, el método implica poner en contacto una célula que expresa un receptor de Fc, tal como uno de los tipos de células analizadas anteriormente, con una cantidad del hidrato de sal de profármaco definido anteriormente o una composición farmacéutica del mismo, eficaz para regular o inhibir la cascada de señalización del receptor de Fc y/o un proceso posterior que tiene lugar mediante la activación de esta cascada de señalización. El método puede ponerse en práctica en contextos *in vitro* siempre que el contacto se realice en condiciones bajo las que el/los progrupo(s) se metabolice(n) para proporcionar el compuesto de 2,4-pirimidindiamina activo, o en contextos *in vivo* como un enfoque terapéutico para el tratamiento o prevención de enfermedades caracterizadas por, causadas por, o asociadas con, la cascada de señalización del receptor de Fc, tales como enfermedades provocadas por la liberación de mediadores químicos específicos de gránulo 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.

30 Como se analiza anteriormente, la activación de la cascada de señalización del receptor FcεRI o FcγRI en determinadas células inmunitarias da lugar a la liberación y/o la síntesis de una variedad de sustancias químicas que son mediadores farmacológicos de una amplia variedad de enfermedades. Se puede tratar o evitar cualquiera de estas enfermedades de acuerdo con los métodos de la invención.

45 Por ejemplo, en mastocitos y basófilos, la activación de la cascada de señalización de FcεRI o FcγRI conduce a la liberación inmediato (es decir, en un plazo de 1-3 min desde la activación del receptor) de mediadores preformados de reacciones de hipersensibilidad de tipo I y/o atópicas (por ejemplo, histamina, proteasas tales como triptasa, etc.) mediante el proceso de desgranulación. Tales reacciones de hipersensibilidad de tipo I o atópicas incluyen, pero no se limitan a, reacciones anafilácticas frente a alérgenos ambientales y otros alérgenos (por ejemplo, pólenes, venenos de insectos y/o animales, alimentos, fármacos, colorantes de contraste, etc.), reacciones anafilactoides, fiebre del heno, conjuntivitis alérgica, rinitis alérgica, asma alérgica, dermatitis atópica, eccema, urticaria, trastornos de la mucosa, trastornos tisulares y algunos trastornos gastrointestinales.

55 La liberación inmediata de los mediadores preformados mediante la desgranulación va seguida de la liberación y/o la síntesis de una variedad de otros mediadores químicos, incluyendo, entre otras cosas, el factor activador plaquetario (PAF), prostaglandinas y leucotrienos (por ejemplo, LTC₄), y de la síntesis *de novo* y la liberación de citocinas tales como TNFα, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, etc. El primero de estos dos procesos se produce aproximadamente 3-30 min después de la activación del receptor; el último, aproximadamente 30 min - 7 h después de la activación del receptor. Se cree que estos mediadores de "etapa tardía" son en parte responsables de los síntomas crónicos de las reacciones de hipersensibilidad de tipo I y atópicas enumeradas anteriormente y, además, son mediadores químicos de la inflamación y enfermedades inflamatorias (por ejemplo, artrosis, enfermedad inflamatoria intestinal, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria intestinal idiopática, síndrome del intestino irritable, colon espástico, etc.), cicatrización de bajo grado (por ejemplo, esclerodermia, fibrosis incrementada, queloides, cicatrices

postquirúrgicas, fibrosis pulmonar, espasmos vasculares, migraña, daño por reperfusión e infarto post-miocárdico) y complejo o síndrome de las mucosas secas. Se pueden tratar o evitar todas estas enfermedades de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento.

- 5 Otras enfermedades que se pueden tratar o evitar de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento incluyen enfermedades asociadas con patologías de basófilos y/o mastocitos. Los ejemplos de dichas enfermedades incluyen, pero no se limitan a, enfermedades de la piel como esclerodermia, enfermedades cardíacas tales como infarto post-miocárdico, enfermedades pulmonares tales como remodelación o cambios en el músculo pulmonar, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfermedades del intestino, tales como el síndrome inflamatorio intestinal (colon espástico), leucemia mielógena aguda (LMA) y púrpura trombocitopénica inmunitaria.

Muchos de los compuestos de 2,4-pirimidindiamina activos son también inhibidores potentes de la tirosina cinasa cinasa Syk. Ejemplos de tales 2,4-pirimidindiaminas se describen, por ejemplo, en la solicitud de EE.UU. con nº de serie 10/355.543 presentada el 31 de enero de 2003 (documento US 2004/0029902A1), en la solicitud internacional con nº de serie PCT/US03/03022 presentada el 31 de enero de 2003 (documento WO 03/063794), en la solicitud de EE.UU. nº 10/631.029 presentada el 29 de julio de 2003 (documento US 2005/0028212), en la solicitud internacional con nº de serie PCT/US03/24087 (documento WO 2004/014382), en la solicitud de EE.UU. con nº de serie 10/903.263 presentada el 30 de julio de 2004 (documento US2005/0234049) y en la solicitud internacional con nº de serie PCT/US2004/24716 (documento WO 2005/016893), cuyas divulgaciones se incorporan en el presente documento por referencia. Así, en otro aspecto más, la presente invención proporciona un cristal de la invención como se define anteriormente o una composición farmacéutica de la invención como se define anteriormente, para su uso en un método de inhibición de una actividad de una cinasa Syk en un sujeto. En general, el método implica poner en contacto la cinasa Syk o una célula que comprende una cinasa Syk con una cantidad de la composición o el hidrato de sal de profármaco, 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 ponerse en práctica en contextos *in vivo* como un enfoque terapéutico para el tratamiento o prevención de enfermedades caracterizadas por, causadas por, o asociadas a, la actividad cinasa Syk.

30 Sin pretender vincularse a ninguna teoría de funcionamiento en particular, se cree que dichos compuestos de 2,4-pirimidindiamina activos inhiben la desgranulación celular y/o la liberación de otros mediadores químicos principalmente mediante la inhibición de la cinasa Syk que se activa a través del homodímero de cadenas gamma de FcεRI. Este homodímero de cadenas gamma se comparte por otros receptores de Fc, incluyendo FcγRI, FcγRIII y FcαRI. Para todos estos receptores, la transducción de señales intracelular está mediada por el homodímero de cadenas gamma común. La unión y la agregación de esos receptores dan lugar al reclutamiento y la activación de tirosina cinasas tales como la cinasa Syk. Como consecuencia de estas actividades de señalización comunes, el hidrato de sal de profármaco descrito en el presente documento que se metaboliza a dicho compuesto de 2,4-pirimidindiamina activo se puede usar para regular y, en particular, inhibir, las cascadas de señalización de receptores de Fc que tienen este homodímero de cadenas gamma, tales como FcεRI, FcγRI, FcγRIII y FcαRI, así como las respuestas celulares producidas a través de estos receptores.

En consecuencia, en otro aspecto, la invención proporciona un cristal de la invención como se define anteriormente o una composición farmacéutica de la invención como se define anteriormente, para su uso en un método de inhibición de una cascada de transducción de señales de receptores Fc en un sujeto. Opcionalmente, el receptor de Fc se selecciona de entre FcαRI, FcγRI, FcγRIII y FcεRI.

Se sabe que la cinasa Syk desempeña un papel crucial en otras cascadas de señalización. Por ejemplo, la cinasa Syk es un efector de la señalización del receptor de linfocitos B (BCR) (Turner *et al.*, 2000, Immunology Today 21:148-154) y es un componente esencial de la señalización de las integrinas beta(1), beta(2) y beta(3) en neutrófilos (Mocsai *et al.*, 2002, Immunity 16:547-558). Los compuestos de 2,4-pirimidindiamina activos que son potentes inhibidores de la cinasa Syk se pueden usar para regular y, en particular, inhibir, cualquier cascada de señalización en la que la cinasa Syk desempeñe un papel, tales como, por ejemplo, las cascadas de receptores de Fc, BCR e integrinas, así como las respuestas celulares producidas a través de estas cascadas de señalización. Por tanto, el hidrato de sal de profármaco definido anteriormente que se metaboliza a dichos compuestos de 2,4-pirimidindiamina activos se puede usar para regular dichas actividades. La respuesta celular en particular regulada o inhibida dependerá, en parte, del tipo de célula y la cascada de señalización específicos, como se sabe bien en la técnica. Los ejemplos no limitantes de respuestas celulares que se pueden regular o inhibir con tales profármacos incluyen el estallido respiratorio, la adhesión celular, la desgranulación celular, la propagación celular, la migración celular, la fagocitosis (por ejemplo, en macrófagos), el flujo de iones de calcio (por ejemplo, en mastocitos, basófilos, neutrófilos, eosinófilos y linfocitos B), la agregación plaquetaria y la maduración celular (por ejemplo, en linfocitos B).

Estudios recientes han demostrado que la activación de plaquetas por colágeno está mediada a través de la misma ruta usada por los receptores inmunitarios, con un motivo tirosina cinasa de inmunorreceptor del FcRγ desempeñando un papel fundamental (Watson y Gibbons, 1998, Immunol. Today 19:260-264) y también que FcRγ desempeña un papel fundamental en la generación de la hiperplasia de la neófitima tras el daño por globo en

ratones, lo más probablemente a través de la activación inducida por colágeno del reclutamiento de plaquetas y leucocitos (Konichi *et al.*, 2002, *Circulation* 105:912-916). Por tanto, el hidrato de sal de profármaco definido anteriormente, también se puede usar para inhibir la activación plaquetaria inducida por colágeno y para tratar o evitar enfermedades asociadas con, o causado por, dicha activación plaquetaria, tales como, por ejemplo, hiperplasia de la íntima y reestenosis posterior a daño vascular.

Los datos celulares y de animales también confirman que muchos de estos compuestos de 2,4-pirimidindiamina activos también se pueden usar para tratar o evitar enfermedades autoinmunitarias y/o síntomas de dichas enfermedades (véanse, por ejemplo, la solicitud de EE.UU. con nº de serie 10/631.029 presentada el 29 de julio de 2003 (documento US 2005/0028212), la solicitud internacional con nº de serie PCT/US03/24087 (documento WO2004/014382), la solicitud de EE.UU. con nº de serie 10/903.263 presentada el 30 de julio de 2004 (documento US2005/0234049) y la solicitud internacional con nº de serie PCT/US2004/24716 (documento WO 2005/016893), cuyas divulgaciones se incorporan en el presente documento por referencia. Como consecuencia, los profármacos de dichos compuestos de 2,4-pirimidindiamina activos se pueden usar del mismo modo para tratar o evitar dichas enfermedades autoinmunitarias y/o síntomas.

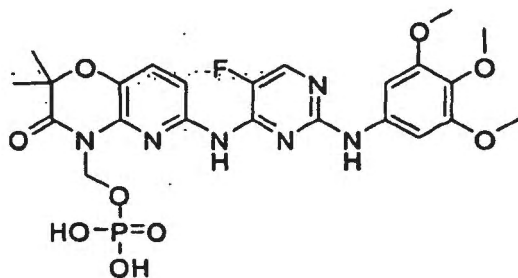
En consecuencia, en otro aspecto, la invención proporciona un cristal de la invención como se define anteriormente o una composición farmacéutica de la invención como se define anteriormente, para su uso en un método para tratar o evitar una enfermedad autoinmunitaria en un sujeto y/o uno o más síntomas asociados a ella.

En general, los métodos implican administrar a un sujeto que padece una enfermedad autoinmunitaria o con riesgo de desarrollar una enfermedad autoinmunitaria una cantidad de la composición o el hidrato de sal de profármaco, eficaz para tratar o evitar la enfermedad autoinmunitarias y/o sus síntomas asociados. Las enfermedades autoinmunitarias que se pueden tratar o evitar con los profármacos incluyen aquellas enfermedades que normalmente se asocian con reacciones de hipersensibilidad no anafilácticas (reacciones de tipo II, tipo III y/o tipo IV) y/o aquellas enfermedades mediadas, al menos en parte, por la activación de la cascada de señalización del FcγR en monocitos. Tales enfermedades autoinmunitarias incluyen, pero no se limitan a, aquellas enfermedades autoinmunitarias que se designan frecuentemente como trastornos autoinmunitarios de un sólo órgano o un sólo tipo de células y aquellas enfermedades autoinmunitarias que se designan frecuentemente como que implican un trastorno autoinmunitario sistémico. Los ejemplos no limitantes de enfermedades designadas frecuentemente como trastornos autoinmunitarios de un sólo órgano o un sólo tipo de células, incluyen: tiroiditis de Hashimoto, anemia hemolítica autoinmunitaria, gastritis atrófica autoinmunitaria de anemia perniciosa, encefalomielititis autoinmunitaria, orquitis autoinmunitaria, enfermedad de Goodpasture, trombocitopenia autoinmunitaria, oftalmia simpática, miastenia gravis, enfermedad de Graves, cirrosis biliar primaria, hepatitis crónica activa, colitis ulcerosa y glomerulopatía membranosa. Los ejemplos no limitantes de enfermedades designadas frecuentemente como que implican un trastorno autoinmunitario sistémico, incluyen: lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, síndrome de Sjögren, síndrome de Reiter, polimiositis-dermatomiositis, esclerosis sistémica, poliarteritis nodosa, esclerosis múltiple y penfigoide ampolloso. Otras enfermedades autoinmunitarias, que pueden estar basadas en linfocitos B (humoral) o basadas en linfocitos T, incluyen alopecia autoinmunitaria, diabetes de aparición juvenil o de tipo I y tiroiditis.

En otro aspecto, la invención proporciona un cristal de la invención como se define anteriormente o una composición farmacéutica de la invención como se define anteriormente, para su uso en un método de tratamiento de la artritis reumatoide en un sujeto.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para la preparación del hidrato de sal de profármaco definido anteriormente, comprendiendo el método:

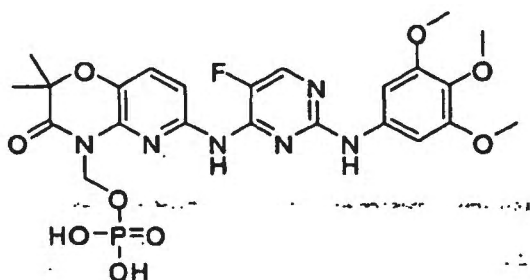
ajustar el pH de una solución acuosa del profármaco



a un valor en el intervalo de aproximadamente 8 a aproximadamente 11 con una base que contiene [Na⁺]; y precipitar el hidrato de sal de profármaco a partir de la solución acuosa.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para la preparación de una forma cristalina del hidrato de sal de profármaco definido anteriormente, comprendiendo el método:

(a) ajustar el pH de una solución acuosa del profármaco



5

a un valor en el intervalo de aproximadamente 9 a aproximadamente 11 con una base que contiene $[Na^+]$,

(b) precipitar un hidrato de sal de profármaco a partir de la solución acuosa, y

10 (c) exponer la sal de profármaco a la humedad, obteniéndose la forma cristalina del hidrato de sal de profármaco; opcionalmente en el que el método comprende además:

15 (i) antes de (b), 1) añadir un disolvente miscible con agua a la solución acuosa, y 2) calentar la solución acuosa, antes de añadir el disolvente miscible en agua, después de añadir el disolvente miscible con agua o antes y después de añadir el disolvente miscible con agua,

(ii) realizar (b) mediante el enfriamiento de la solución acuosa, y

20 (iii) antes de (c), 1) lavar el hidrato de sal de profármaco con un disolvente de lavado y 2) retirar, sustancialmente, todo el disolvente de lavado.

Breve descripción de las figuras

25 La figura 1 proporciona esquemas que ilustran rutas metabólicas de profármacos que contienen fósforo ejemplares;

la figura 2 proporciona un esquema que ilustra una ruta metabólica de un profármaco de éster de fosfato cíclico ejemplar;

30 la figura 3 ilustra una síntesis ejemplar de un profármaco de fosfato cíclico ejemplar; y

las figuras 4-11 proporcionan gráficas que ilustran diversos datos farmacocinéticos para el compuesto 1 de fármaco y/o el compuesto 4 de profármaco.

35 Las figuras 12-15 proporcionan gráficas que ilustran diversos datos estructurales para el hidrato de sal de profármaco 32.

Descripción detallada de la invención

40 Definiciones

Tal como se usan en el presente documento, se pretende que los términos y expresiones siguientes tengan los siguientes significados:

45 "Receptor de Fc" se refiere a un miembro de la familia de moléculas de superficie celular que se unen a la porción 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 $Fc\alpha$ ("Fc α R ") se une a IgA, el Fc ϵ R se une a IgE y el Fc γ R se une a IgG.

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

55

La familia de FcεR incluye dos tipos, denominados FcεRI y FcεRII (también conocido como CD23). El FcεRI es un receptor de alta afinidad (se une a IgE con una afinidad de aproximadamente $10^{10} M^{-1}$) que se encuentra en mastocitos, basófilos y eosinófilos, que ancla IgE monomérica a la superficie celular. El FcεRI posee una cadena alfa, una cadena beta y el homodímero de cadena gamma analizado anteriormente. El FcεRII es un receptor de baja afinidad expresado en fagocitos mononucleares, linfocitos B, eosinófilos y plaquetas. El FcεRII comprende una única cadena polipeptídica y no incluye el homodímero de cadena gamma.

La familia de FcγR incluye tres tipos, denominados FcγRI (también conocido como CD64), FcγRII (también conocido como CD32) y FcγRIII (también conocido como CD16). El FcγRI es un receptor de alta afinidad (se une a IgG1 con una afinidad de $10^8 M^{-1}$) que se encuentra en mastocitos, basófilos, células mononucleares, neutrófilos, eosinófilos, células dendríticas y fagocitos, que ancla IgG monomérica a la superficie celular. El FcγRI incluye una cadena alfa y el dímero de cadena gamma compartido por FcαRI y FcεRI.

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 analizado anteriormente.

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

Los expertos en la técnica reconocerán que la estructura de las subunidades y las propiedades de unión de estos receptores de Fc diversos, así como los tipos celulares que los expresan, no están completamente caracterizados. El análisis anterior simplemente refleja el estado de la técnica actual en cuanto a estos receptores (véase, por ejemplo, *Immunobiology: The Immune System in Health & Disease*, 5ª Edición, Janeway *et al.*, Ed., 2001, ISBN 0-8153-3642-x, figura 9.30 en la pág. 371) y no pretende ser limitantes con respecto a las innumerables cascadas de señalización de receptor que se pueden regular con los profármacos descritos en el presente documento.

"La desgranulación mediada por receptores de Fc" o "desgranulación inducida por receptores de Fc" se refiere a la desgranulación que se lleva a cabo por medio de una cascada de transducción de señales de un receptor de Fc iniciada por la reticulación de un receptor de Fc.

"Desgranulación inducida por IgE" o "desgranulación mediada por FcεRI" se refiere a la desgranulación que se lleva a cabo por medio de la cascada de transducción de señales del receptor de IgE iniciada por la reticulación de IgE unida a FcεRI. La reticulación se puede inducir por un alérgeno específico de IgE u otro agente de unión multivalente, tal como un anticuerpo anti-IgE. En mastocitos y/o basófilos, la cascada de señalización de FcεRI que conduce a la desgranulación puede dividirse en dos etapas: anterior y posterior. La etapa anterior incluye todos los procesos que se producen antes de la movilización de iones de calcio. La etapa posterior incluye la movilización de iones de 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 anterior mediada por FcεRI actúan para inhibir esa parte de la cascada de señalización de FcεRI anterior al punto en el que se induce la movilización de iones de calcio. En ensayos basados en células, los compuestos que inhiben selectivamente la desgranulación mediada por FcεRI anterior, inhiben la desgranulación de células tales como mastocitos o basófilos que se activan o estimulan con un agente de unión o un alérgeno específico de IgE (tal como un anticuerpo anti-IgE), pero no inhiben de manera apreciable la desgranulación de células que se activan o estimulan con agentes de desgranulación que sortean la ruta de señalización de FcεRI, tales como, por ejemplo, los ionóforos de calcio ionomicina y A23187.

"Desgranulación inducida por IgG" o "desgranulación mediada por FcγRI" se refiere a la desgranulación que se lleva a cabo por medio de la cascada de transducción de señales de FcγRI iniciada por la reticulación de IgG unida a FcγRI. La reticulación se puede inducir por un alérgeno específico de IgG u otro agente de unión multivalente, tal como un anticuerpo o un fragmento anti-IgG. Al igual que la cascada de señalización de FcεRI, en mastocitos y basófilos, la cascada de señalización de FcγRI también conduce a la desgranulación, que se puede dividir en las mismas dos etapas: anterior y posterior. Análogamente a la desgranulación mediada por FcγRI, los compuestos que inhiben selectivamente la desgranulación mediada por FcγRI anterior actúan antes del punto en el que se induce la movilización de iones de calcio. En ensayos basados en células, los compuestos que inhiben selectivamente la desgranulación mediada por FcγRI anterior, inhiben la desgranulación de células tales como mastocitos o basófilos que se activan o estimulan con un agente de unión o un alérgeno específico de IgG (tal como un anticuerpo o un fragmento anti-IgG), pero no inhiben de manera apreciable la desgranulación de células que se activan o estimulan con agentes de desgranulación que sortean la ruta de señalización de FcγRI, tales como, por ejemplo, los ionóforos de calcio ionomicina y A23187.

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

"Cinasa Syk" se refiere a la proteína tirosina cinasa del bazo no receptora (citoplásmica) de 72 kDa bien conocida que se expresa en linfocitos B y otras células hematopoyéticas. La cinasa Syk incluye dos dominios de consenso de homología Src 2 (SH2) en tándem que se unen a motivos de activación del inmunorreceptor basados en tirosina ("ITAM"), un dominio "enlazador" y un dominio catalítico (para una revisión de la estructura y la función de la 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 en profundidad como un efector de la señalización del receptor de linfocitos B (BCR) (Turner *et al.*, 2000, *supra*), la cinasa Syk también es crucial para la fosforilación de numerosas proteínas que regulan rutas importantes que parten de inmunorreceptores, tales como la movilización de Ca²⁺ y las cascadas de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) y la desgranulación. La cinasa Syk también desempeña un papel crucial en la señalización de integrinas en neutrófilos (véase, por ejemplo, Mocsai *et al.* 2002, *Immunity* 16:547-558).

Como se usa en el presente documento, cinasa Syk incluye cinasas de cualquier especie animal, incluyendo, pero sin limitarse a, homo sapiens, simios, bovinos, porcinos, roedores, etc., reconocidas como pertenecientes a la familia Syk. Se incluyen específicamente isoformas, variantes de ajuste, variantes alélicas, mutantes, tanto naturales como artificiales. Las secuencias de aminoácidos dichas cinasas Syk son bien conocidas y están disponibles en GENBANK. Se pueden encontrar ejemplos específicos de ARNm que codifican diferentes isoformas de cinasa Syk humana en GENBANK, con los n^o de acceso gi|21361552|ref|NM_003177.2|, gi|496899|emb|Z29630.1|HSSYKPTK[496899] y gi|15030258|gb|BC011399.1|BC011399|15030258]; que se incorporan en el presente documento por referencia.

Los expertos en la técnica apreciarán que tirosina cinasas pertenecientes a otras familias pueden tener sitios activos o bolsillos de unión que tienen una estructura tridimensional similar a la de Syk. Como consecuencia de esa similitud estructural, se espera que dichas cinasas, a las que se hace referencia en el presente documento como "miméticos de Syk", catalicen la fosforilación de sustratos fosforilados por Syk. Por tanto, se apreciará que dichos miméticos de Syk, las cascadas de transducción de señales en las que dichos miméticos de Syk desempeñen un papel y las respuestas biológicas efectuadas por dichos miméticos de Syk y las cascadas de señalización dependientes de miméticos de Syk se pueden regular y, en particular, inhibir, con muchos de los profármacos descritos en el presente documento.

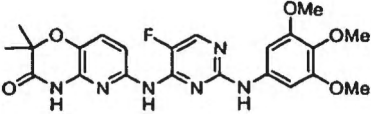
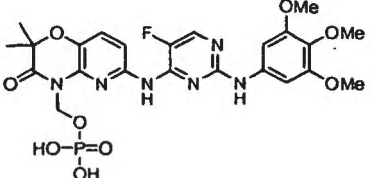
"Cascada de señalización dependiente de Syk" se refiere a una cascada de transducción de señales en la que la cinasa Syk desempeña un papel. Los ejemplos no limitantes de dichas cascadas de señalización dependientes de Syk incluyen las cascadas de señalización de Fc α RI, Fc ϵ RI, Fc γ RI, Fc γ RIII, BCR e integrina.

"Enfermedad autoinmunitaria" se refiere a aquellas enfermedades que se asocian habitualmente con las reacciones de hipersensibilidad no anafilácticas (reacciones de hipersensibilidad de tipo II, tipo III y/o tipo IV) que, en general, se producen como consecuencia de la propia respuesta inmunitaria humoral y/o mediada por células del sujeto frente a una o más sustancias inmunogénicas de origen endógeno y/o exógeno. Dichas enfermedades autoinmunitarias se distinguen de las enfermedades asociadas con reacciones de hipersensibilidad anafilácticas de tipo 1 o mediadas por IgE.

Los compuestos de profármaco

Como se describe en el sumario, la presente divulgación proporciona profármacos de compuestos de 2,4-pirimidindiamina biológicamente activos, tales como los diversos compuestos de 2,4-pirimidindiamina descritos, por ejemplo, en la solicitud de EE.UU. con n^o de serie 10/355.543 presentada el 31 de enero de 2003 (documento US 2004/0029902A1), en la solicitud internacional con n^o de serie PCT/US03/03022 presentada el 31 de enero de 2003 (documento WO 03/063794), en la solicitud de EE.UU. n^o 10/631.029 presentada el 29 de julio de 2003 (documento US 2005/0028212), en la solicitud internacional con n^o de serie PCT/US03/24087 (documento WO 2004/014382), en la solicitud de EE.UU. con n^o de serie 10/903.263 presentada el 30 de julio de 2004 (documento US2005/0234049) y en la solicitud internacional con n^o de serie PCT/US2004/24716 (documento WO 2005/016893), cuyas divulgaciones se incorporan en el presente documento por referencia. Los profármacos de estos compuestos de 2,4-pirimidindiamina son de especial interés, ya que estos compuestos inhiben cascadas de señalización de receptores de Fc anteriores, así como cascadas de señalización de cinasa Syk y dependientes de cinasa Syk. En general, los profármacos incluyen dichos compuestos de 2,4-pirimidindiamina activos en los que se enmascara uno o más de los grupos de amina primaria o secundaria disponibles con un progrupo R^p que se metaboliza *in vivo* para proporcionar el fármaco de 2,4-pirimidindiamina activo. Tal como se analizó también en la sección del sumario, y se analizará con mayor detalle a continuación, la naturaleza del progrupo puede variar y dependerá, entre otros factores, de la solubilidad en agua del profármaco deseada, su modo de administración pretendido y/o su mecanismo o sitio del metabolismo pretendidos para el compuesto de 2,4-pirimidindiamina activo.

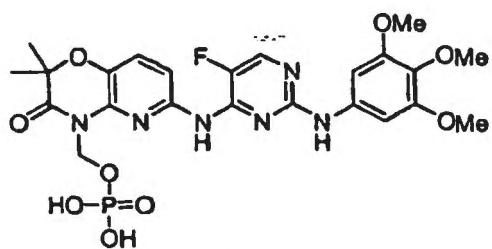
Por ejemplo, se ha descubierto que un fármaco de 2,4-pirimidindiamina activo específico (compuesto 1, a continuación), presenta una solubilidad en agua inmensamente mayor cuando se formula como un profármaco de fosfato (compuesto 4, a continuación):

Compuesto	Estructura	Solubilidad
Compuesto 1		<1 µg/ml
Compuesto 4		>5 mg/ml

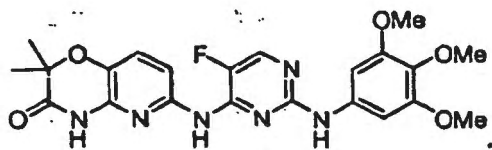
Este compuesto **4** de profármaco presenta también una biodisponibilidad mayor en comparación con el compuesto **1** de fármaco correspondiente cuando se administra por vía oral a animales de experimentación. De hecho, al contrario que para el compuesto **1** de profármaco, la absorción del compuesto **4** de profármaco no depende de formulación. En estudios farmacocinéticos llevados a cabo en ratas, el compuesto **4** de profármaco se absorbió igualmente bien a partir de soluciones (por ejemplo, soluciones de PEG-400 y carboximetilcelulosa) y polvos (envasados en cápsulas de gelatina dura). Sin pretender vincularse a ninguna teoría de funcionamiento en particular, se cree que la biodisponibilidad oral mejorada del compuesto **4** de profármaco, así como su absorción independiente de la formulación, se deben, al menos en parte, a su mayor solubilidad en agua. Se espera que otros compuestos de 2,4-pirimidindiamina activos que tienen solubilidades en agua igualmente bajas y, por tanto, biodisponibilidades orales, presenten incrementos similares de la solubilidad en agua y la biodisponibilidad oral al formularse como profármacos de fosfato. Tal como se describirá con más detalle a continuación, puede ser deseable formular los compuestos de 2,4-pirimidindiamina activos como sales de fosfato con el fin de proporcionar una alta solubilidad y estabilidad.

En cambio, cabría esperar que el profármaco de éster de fosfato correspondiente del compuesto **1** de fármaco activo tenga una solubilidad en agua menor que el compuesto **1** de compuesto activo. Por tanto, se espera que los profármacos de éster de fosfato de compuestos de 2,4-pirimidindiamina activos que tienen una solubilidad en agua menor que los compuestos de 2,4-pirimidindiamina activos sean especialmente útiles en aplicaciones y formulaciones en las que es deseable una solubilidad en agua baja, tales como las formulaciones adaptadas para su administración por inhalación.

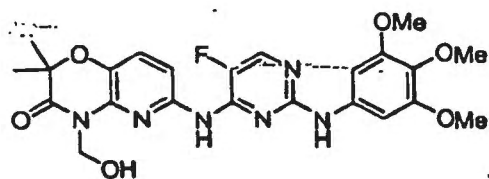
Se ha descubierto recientemente que un profármaco que contiene fosfato (compuesto **4**) de acuerdo con la estructura que se ilustra a continuación:



se metaboliza *in vivo* al compuesto de 2,4-pirimidindiamina activo correspondiente (compuesto **1**), que se ilustra a continuación:



Sin pretender vincularse a ninguna teoría de funcionamiento en particular, se cree que este profármaco se metaboliza al compuesto **1** a través del intermedio de hidroximetilamina correspondiente que se ilustra a continuación:



Se sabe que dichos compuestos de hidroximetilamina son inestables en condiciones fisiológicas y a diversos intervalos pH en los que se hidrolizan *in vivo* para proporcionar formaldehído y la sustancia de fármaco activo. El grupo que contiene fosfato del compuesto 4 es $-\text{CH}_2\text{-O-P(O)(OH)}_2$.

Aunque los profármacos que contienen fosfato adecuados para su administración por vía oral son de interés, los expertos en la técnica apreciarán que los profármacos que incluyen tales grupos que contienen fosfato pueden administrarse por otras vías de administración, ya que las fosfatasas se distribuyen por todo el organismo. Por ejemplo, se ha descubierto que el compuesto 4 de profármaco ejemplar se metaboliza al compuesto 1 de fármaco activo en experimentos *in vitro* llevados a cabo con plasma de rata, así como con preparaciones microsómicas hepáticas e intestinales de rata, lo que indica que las fosfatasas también están presentes en el plasma. Por tanto, el único requisito es que el grupo que contiene fosfato $-\text{CH}_2\text{-O-P(O)(OH)}_2$ debería poder retirarse en las condiciones de uso pretendidas.

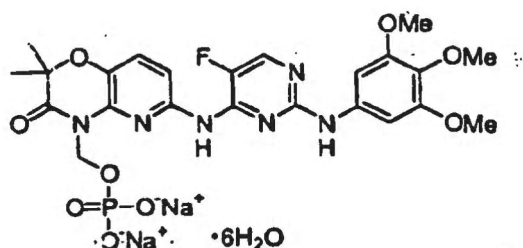
Sin pretender vincularse a ninguna teoría de funcionamiento, se cree que, los profármacos que contienen fosfato, tales como el compuesto 4, se metabolizan al compuesto de 2,4-pirimidindiamina activo a través de la hidroximetilamina correspondiente. Este metabolismo se ilustra en la figura 1A. Con referencia a la figura 1A, la retirada de ácido fosfórico del profármaco 16 de fosfato mediante hidrólisis enzimática proporciona la hidroximetilamina 18 correspondiente, que se somete a hidrólisis *in vivo* para proporcionar formaldehído y el compuesto 10 de 2,4-pirimidindiamina activo.

Con referencia a la figura 1B, se cree que la hidrólisis *in vivo* del profármaco 26 de fosfato proporciona la 2,4-pirimidindiamina activa 10 y fosfato de enol, que después de hidroliza *in vivo* en acetaldehído y ácido fosfórico.

Con referencia a la figura 1A, el experto en la técnica apreciará que, aunque la hidroximetilamina 18 se metaboliza en condiciones fisiológicas para proporcionar el compuesto 10 de 2,4-pirimidindiamina activo, es estable a pH 7 y, por lo tanto, se puede preparar y administrar como un profármaco que contiene hidroxialquilo del compuesto activo 10.

Con referencia de nuevo a la figura 1A, los expertos en la técnica apreciarán también que los profármacos de fosfato se pueden generar mediante hidrólisis *in vivo* de profármacos de éster de fosfato, tales como los profármacos 20 de éster de fosfato, y/o mediante oxidación de profármacos de fosfito, tales como los profármacos 24 de fosfito. Tales profármacos de éster de fosfato y fosfito se pueden generar, a su vez, mediante oxidación o hidrólisis *in vivo* de profármacos de éster de fosfito, tales como los profármacos 22 de éster de fosfito. Los profármacos de éster de fosfato, fosfito y éster de fosfito correspondientes del profármaco 26 de fosfato se ilustran en la figura 1B como los compuestos 30, 34 y 32, respectivamente. Tal como se describe con más detalle a continuación, los inventores han determinado que los hidratos de sal de profármaco descritos en el presente documento tienen, sorprendentemente, características de estabilidad deseables, permaneciendo en un nivel estable de hidratación en intervalos amplios de humedades relativas. Los inventores suponen que las características de estabilidad de hidratación se deben a la alta energía de unión de las moléculas de agua al hidrato, así como a la especial estabilidad del orden tridimensional de la matriz cristalina y su incapacidad para redistribuirse espacialmente ella misma en respuesta a la deshidratación.

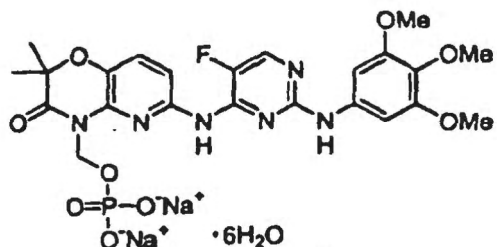
En particular, la invención se refiere al hidrato de sal de profármaco que tiene la estructura:



Es deseable controlar el pH en la formación de las sales. Los valores de pH deseables para la formación de la sal disódica del compuesto 4 varían desde aproximadamente 8 hasta aproximadamente 11, más preferentemente desde aproximadamente 9 hasta aproximadamente 11, incluso más preferentemente desde aproximadamente 9,3 hasta

aproximadamente 10,5.

En un aspecto, la invención proporciona un método para la preparación de un hidrato de sal de profármaco

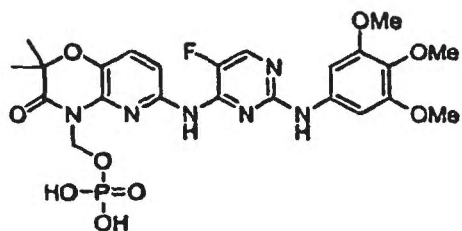


5

comprendiendo el método:

(i) ajustar el pH de una solución acuosa del profármaco

10



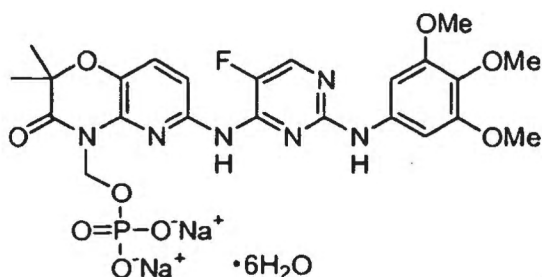
a un valor en el intervalo de aproximadamente 8 a aproximadamente 11 con una base que contiene $[\text{Na}^+]$; y

15 (ii) precipitar el hidrato de sal de profármaco a partir de la solución acuosa. En algunas realizaciones, el pH se ajusta a un valor de desde aproximadamente 9,3 hasta aproximadamente 10,5.

En algunas realizaciones de la invención, precipitar la sal de profármaco a partir de una solución acuosa comprende añadir un disolvente miscible con agua apropiado a la solución acuosa. De forma alternativa, se puede lograr la precipitación por medio de la formación de sal en, o la adición de sal a, una mezcla de agua/disolvente miscible con agua para disolver una sal de profármaco, seguida de la precipitación por proporcionar el hidrato de sal de profármaco. La adición de un disolvente miscible con agua a una solución acuosa de sal de profármaco puede acelerar la precipitación de una sal de profármaco. Un disolvente miscible con agua puede ser parcialmente miscible con agua o totalmente miscible con agua. Un disolvente miscible con agua puede ser una mezcla de uno o más disolventes, en la que uno o más de los disolventes son miscibles con agua.

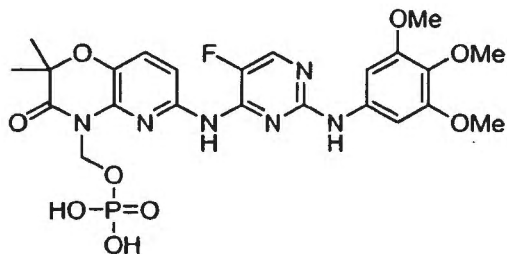
La sal de profármaco se puede precipitar a temperaturas elevadas, a temperatura ambiente o temperaturas inferiores a la ambiente. En una realización, la sal se precipita a temperatura ambiente. En otra realización, la sal se precipita a partir de una solución templada, bien directamente o después del enfriamiento. En una realización específica, se aplica calor a la solución salina antes de la precipitación. El calor se puede aplicar a la solución directamente o mediante la adición de un disolvente miscible con agua templado a la solución acuosa. En una realización, la solución de sal de profármaco se calienta justo antes y/o justo después de añadir el disolvente miscible con agua, después se deja enfriar para precipitar la sal de profármaco.

35 Otra realización de la invención proporciona un método para la preparación de un hidrato de sal de profármaco



comprendiendo el método:

(i) ajustar el pH de una solución acuosa del profármaco



5

a un valor en el intervalo de aproximadamente 9 a aproximadamente 11 con una base que contiene sodio;

(ii) añadir un disolvente miscible con agua a la solución acuosa;

10

(iii) calentar la solución acuosa antes de añadir el disolvente, después de añadir el disolvente miscible con agua, o ambos;

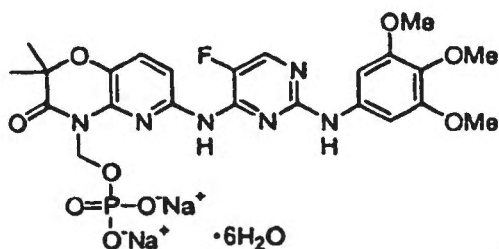
(iv) enfriar la solución acuosa para precipitar el hidrato de sal de profármaco. En algunas realizaciones, el pH se ajusta a un valor de desde aproximadamente 9,3 hasta aproximadamente 10,5.

15

En algunas realizaciones de la invención, uno de los métodos descritos anteriormente comprende además aislar el hidrato de sal de profármaco a partir de la solución. Aislar el hidrato de sal de profármaco puede incluir, por ejemplo, lavar el hidrato de sal de profármaco con al menos un disolvente de lavado. Posteriormente, se retira sustancialmente todo el disolvente de lavado del hidrato de sal de profármaco.

20

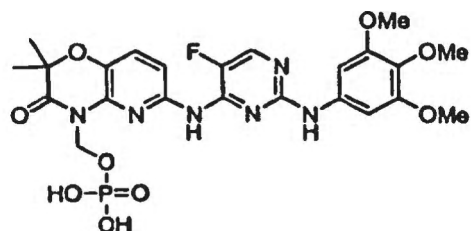
En otra realización, la invención proporciona un método para la preparación de un hidrato de sal de profármaco



25

comprendiendo el método:

(i) ajustar el pH de una solución acuosa del profármaco



30

a un valor en el intervalo de aproximadamente 9 a aproximadamente 11 con una base que contiene sodio;

(ii) añadir un disolvente miscible con agua a la solución acuosa;

35

(iii) calentar la solución acuosa, antes de añadir el disolvente miscible con agua, después de añadir el disolvente miscible con agua, o antes y después de añadir el disolvente miscible con agua;

(iv) enfriar la solución acuosa para dejar que precipite el hidrato de sal de profármaco; y

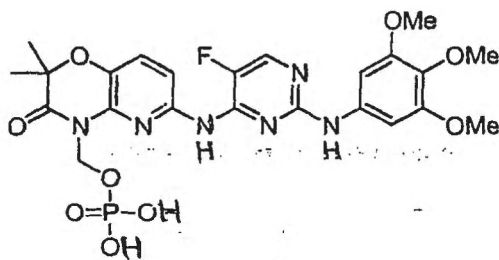
(v) lavar el hidrato de sal de profármaco con al menos un disolvente de lavado. En algunas realizaciones, el pH se ajusta a un valor de desde aproximadamente 9,3 hasta aproximadamente 10,5.

5 En algunas realizaciones de la invención, la sal de profármaco aislada (por ejemplo, a partir de la formación de sal in situ y precipitación) no es una forma de hidrato y/o forma cristalina deseada. Por ejemplo, una sal de profármaco de la invención sólida pueden ser amorfa (solvatado o no) o cristalina (solvatada o no).

10 Otro aspecto de la invención se refiere al método definido anteriormente de preparación de una forma cristalina del hidrato de la sal de profármaco descrito anteriormente. En estas realizaciones, la sal de profármaco se manipula adicionalmente para convertirla en la forma cristalina y el hidrato de sal de profármaco deseados. Por ejemplo, en una realización la sal de profármaco se aísla y, posteriormente, se expone a condiciones en las que el sólido se convierte en una forma cristalina y/o de hidrato deseada. Por ejemplo, usando métodos descritos en el presente documento, se puede aislar una sal de profármaco en una forma cristalina que tenga menos de una cantidad de agua deseable. Esta forma cristalina se expone, por ejemplo, a un entorno que contiene humedad (por ejemplo, una atmósfera humedecida o húmeda) para convertirla en un forma de hidrato deseable. En otro ejemplo, se puede aislar una sal de profármaco en forma amorfa, por ejemplo mediante la retirada de disolvente de una solución de la sal a vacío. La sal amorfa se expone a una atmósfera húmeda y, de este modo, se convierte con el tiempo en un hidrato cristalino.

Dependiendo de la composición, la manipulación y las técnicas de aislamiento, las sales de profármaco pueden ser cristalinas o amorfas. Asimismo, los factores mencionados anteriormente pueden determinar el contenido de agua de la forma de sal. El método de la invención para la preparación de una forma cristalina del hidrato de sal de profármaco definido anteriormente comprende:

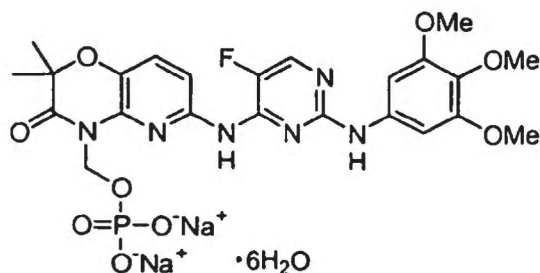
(a) ajustar el pH de una solución acuosa del profármaco con la fórmula,



30 a un valor en el intervalo de aproximadamente 9 a aproximadamente 11 con una base que contiene $[Na^+]$; precipitar una sal de profármaco a partir de la solución acuosa; y

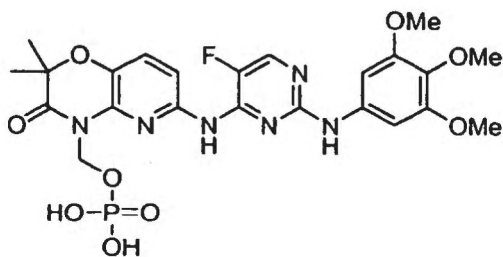
35 (c) exponer la sal de profármaco a la humedad, obteniéndose la forma cristalina del hidrato de sal de profármaco. El hidrato de sal de profármaco se expone a un entorno húmedo que, con el tiempo, convierte el hidrato de sal de profármaco en una forma cristalina con un nivel de hidratación deseado. Los entornos húmedos incluyen, por ejemplo, aire húmedo o gas inerte húmedo; en general, "humedad" se usa para describir entornos que tienen un grado de humedad suficiente para dar como resultado la hidratación de la sal de profármaco anhidra o el incremento de la hidratación del hidrato de sal de profármaco. En una realización particularmente preferida, el hidrato de sal de profármaco cristalino es la forma de hexahidrato disódico.

En otra realización, la invención proporciona un método para la preparación de una forma cristalina del hidrato de sal de profármaco



45 comprendiendo el método:

(i) ajustar el pH de una solución acuosa del profármaco



5 a un valor en el intervalo de aproximadamente 9 a aproximadamente 11 con una base que contiene sodio;

(ii) añadir un disolvente miscible con agua a la solución acuosa;

10 (iii) calentar la solución acuosa, antes de añadir el disolvente miscible con agua, después de añadir el disolvente miscible con agua, o antes y después de añadir el disolvente miscible con agua;

(iv) precipitar una sal de profármaco a partir de la solución acuosa mediante enfriamiento;

15 (v) lavar la sal de profármaco con al menos un disolvente de lavado;

(vi) retirar sustancialmente la totalidad del disolvente de lavado de la sal de profármaco; y

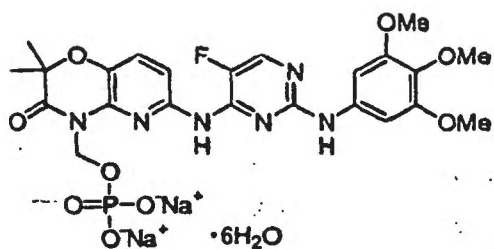
(vii) exponer la sal de profármaco a la humedad, obteniéndose la forma cristalina del hidrato de sal de profármaco.

20 En algunas realizaciones, el pH se ajusta a un valor de desde aproximadamente 9,3 hasta aproximadamente 10,5. Normalmente, se usa aire húmedo como fuente de humedad.

25 En los métodos descritos anteriormente, el disolvente miscible con agua puede ser, por ejemplo, acetonitrilo, acetona, isopropanol, metanol o etanol. En determinadas realizaciones de los métodos descritos anteriormente, el disolvente miscible con agua es isopropanol. Tal como menciona, el disolvente miscible con agua puede ser una mezcla de dos o más disolventes, en la que al menos uno es él mismo miscible con agua.

30 En los métodos descritos anteriormente, el disolvente de lavado puede ser, por ejemplo, isopropanol, metanol, etanol, acetona o acetonitrilo o mezclas de los mismos. En determinadas realizaciones de los métodos descritos anteriormente, los cristales precipitados se lavan con dos disolventes de lavado.

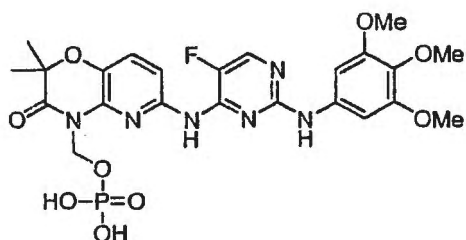
En una realización, la invención proporciona un método para preparar una forma cristalina del hidrato de sal de profármaco



35

método que comprende:

40 (i) ajustar el pH de una solución acuosa del profármaco



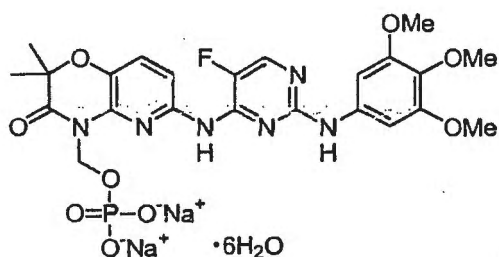
a un valor en el intervalo de aproximadamente 9 a aproximadamente 11 con una base que contiene $[\text{Na}^+]$;

5 (ii) precipitar una sal de profármaco a partir de la solución acuosa; y

(iii) exponer la sal de profármaco a la humedad, obteniéndose la forma cristalina del hidrato de sal de profármaco.

10 En algunas realizaciones, el pH se ajusta a un valor de desde aproximadamente 9,3 hasta aproximadamente 10,5. Normalmente, se usa aire húmedo como fuente de humedad.

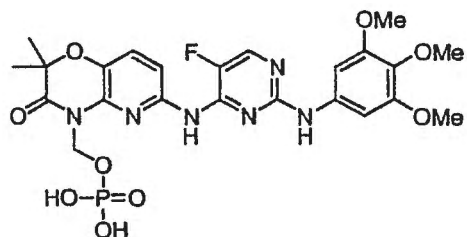
En una realización preferida, la invención proporciona el método para la preparación de una forma cristalina del hidrato de sal de profármaco



15

comprendiendo el método:

20 (i) ajustar el pH de una solución acuosa del profármaco



a un valor en el intervalo de aproximadamente 9 a aproximadamente 11 con NaOH;

25 (ii) añadir isopropanol a la solución acuosa

(iii) calentar la solución acuosa, antes de añadir el isopropanol, después de añadir el isopropanol o antes y después de añadir el isopropanol;

30 (iv) enfriar la solución acuosa para dejar que precipite la sal de profármaco;

(iv) lavar la sal de profármaco con isopropanol y acetona;

(v) retirar sustancialmente la totalidad del disolvente de la sal de profármaco; y

35

(vi) exponer la sal de profármaco a la humedad.

En algunas realizaciones, el pH se ajusta a un valor de desde aproximadamente 9,3 hasta aproximadamente 10,5. Normalmente, se usa aire húmedo o gas inerte húmedo como fuente de humedad.

En los métodos descritos anteriormente, las etapas de calentamiento se pueden llevar a cabo, por ejemplo, a temperaturas por encima de aproximadamente 50 °C; por encima de aproximadamente 75 °C; o por encima de aproximadamente 90 °C. En determinadas realizaciones de la invención, la etapa de calentamiento se realiza a

5 aproximadamente el punto de ebullición de la solución.

En los métodos descritos anteriormente, el aire húmedo o el gas inerte húmedo tiene, preferentemente, una humedad relativa de al menos aproximadamente el 10 %. En realizaciones de los métodos descritos anteriormente, el aire húmedo o el gas inerte húmedo tiene una humedad relativa de al menos aproximadamente el 20 %. En otras

10 realizaciones de los métodos descritos anteriormente, el aire húmedo o el gas inerte húmedo tiene una humedad relativa de al menos aproximadamente el 30 %. En determinadas realizaciones de los métodos descritos anteriormente, el aire húmedo o el gas inerte húmedo tiene una humedad relativa de desde aproximadamente el 30 % hasta aproximadamente el 60 %.

En los métodos descritos anteriormente, la base que contiene [Na⁺] puede ser, por ejemplo, un hidróxido, un alcóxido o un carbonato. En los métodos descritos anteriormente, la base que contiene sodio puede ser, por ejemplo, NaOH, NaOMe o Na₂CO₃. En determinadas realizaciones, la base que contiene sodio es NaOH.

15

Otro aspecto de la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un hidrato de sal de profármaco preparado mediante cualquiera de los métodos descritos anteriormente y un vehículo, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

20

Métodos de síntesis

Los profármacos y sales de profármaco descritos en el presente documento, así como los intermedios de los mismos, pueden sintetizarse por medio de una variedad de rutas sintéticas diferentes usando materiales de partida comercialmente disponibles y/o materiales de partida preparados mediante métodos sintéticos convencionales. Se pueden encontrar métodos ejemplares adecuados que se pueden usar y/o adaptar de forma rutinaria para sintetizar compuestos de 2,4-pirimidindiamina activos en la patente de EE.UU. n° 5.958.935, en la solicitud de EE.UU. con n° de serie 10/355.543 presentada el 31 de enero de 2003 (documento US 2004/0029902A1), en la solicitud internacional con n° de serie PCT/US03/03022 presentada el 31 de enero de 2003 (documento WO 03/063794), en la solicitud de EE.UU. n° 10/631.029 presentada el 29 de julio de 2003 (documento US 2005/0028212), en la solicitud internacional con n° de serie PCT/US03/24087 (documento WO 2004/014382), en la solicitud de EE.UU. con n° de serie 10/903.263 presentada el 30 de julio de 2004 (documento US2005/0234049) y en la solicitud internacional con n° de serie PCT/US2004/24716 (documento WO 2005/016893), cuyas divulgaciones se incorporan en el presente documento por referencia. Estos compuestos de 2,4-pirimidindiamina activos se pueden usar como materiales de partida para sintetizar los profármacos. En la sección de ejemplos se proporcionan ejemplos específicos que describen la síntesis del compuesto 4 de profármaco de fosfato, así como un intermedio sintético del mismo. Todos los profármacos descritos en el presente documento se pueden sintetizar mediante la adaptación rutinaria de este método.

25
30
35
40

Inhibición de cascadas de señales de receptores Fc

Muchos de los profármacos descritos en el presente documento, y en particular el compuesto 4, se metabolizan a compuestos de 2,4-pirimidindiamina activos que inhiben las cascadas de señalización de receptores Fc que conducen, entre otros, a la desgranulación de células. Como ejemplo específico, estos compuestos activos 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 central en trastornos inducidos por alérgenos, incluyendo, por ejemplo, rinitis alérgica y asma. Tras la exposición a alérgenos, que pueden ser, entre otros, polen o parásitos, se sintetizan anticuerpos IgE específicos de alérgeno por linfocitos B activados por IL-4 (o IL-13) y otros mensajeros para cambiar a la síntesis de anticuerpos específicos de tipo IgE. Estas IgE específicas de alérgeno 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 señal del receptor de IgE, lo que conduce a la desgranulación de las células y a la consiguiente liberación y/o síntesis de un huésped de mediadores químicos, incluyendo histamina, proteasas (por ejemplo, tripsina y quimasa), mediadores lipídicos tales como leucotrienos (por ejemplo, LTC₄), factor de activación 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 de mastocitos y/o basófilos explica las respuestas de estadio temprano y tardío inducidas por alérgenos, y está directamente vinculada a acontecimientos posteriores que conducen a un estado inflamatorio sostenido.

45
50
55
60

Los acontecimientos moleculares en la ruta de transducción de señales de FcεRI que conducen a la liberación de mediadores preformados por medio de la desgranulación y/o la síntesis de otros mediadores químicos son muy conocidos. El FcεRI es un receptor heterotetramérico compuesto de un subunidad alfa, una subunidad beta y dos subunidades gamma (homodímero gamma) de unión a IgE. La reticulación de IgE unido a FcεRI por agentes de

65

unión multivalentes (incluyendo, por ejemplo alérgenos específicos de IgE o anticuerpos anti-IgE o fragmentos) induce la rápida asociación y activación de la cinasa relacionada con Src, Lyn. Lyn fosforila motivos de activación del inmunorreceptor basados en tirosina (ITAM) en las subunidades beta y gamma intracelulares, lo que conduce al reclutamiento de Lyn adicional para la subunidad beta y cinasa Syk para el homodímero gamma. Estas cinasas asociadas a receptores, que se activan por 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 proteína cinasa C y a la movilización de Ca^{2+} , ambas 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, Junk1/2, 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 C4 (LTC4).

Se cree que la cascada de señalización de FcγRI comparte algunos elementos comunes con la cascada de señalización de FcεRI. De forma importante, al igual que FcεRI, el FcγRI incluye un homodímero gamma que está fosforilado y mejora la Syk, y al igual que FcεRI, la activación de la cascada de señalización FcγRI conduce, entre otros, a la desgranulación. Otros receptores Fc que comparten el homodímero gamma y que se pueden regular por los compuestos de 2,4-pirimidindiamina activos incluyen, pero no se limitan a, FcαRI y FcγRIII.

Los ensayos *in vitro* y celulares adecuados para confirmar la actividad de un compuesto de 2,4-pirimidindiamina particular se describen en detalle en la solicitud de EE.UU. con n° de serie 10/355.543 presentada el 31 de enero de 2003 (documento US 2004/0029902A1), en la solicitud internacional con n° de serie PCT/US03/03022 presentada el 31 de enero de 2003 (documento WO 03/063794), en la solicitud de EE.UU. n° 10/631.029 presentada el 29 de julio de 2003 (documento US 2005/0028212), en la solicitud internacional con n° de serie PCT/US03/24087 (documento WO 2004/014382), en la solicitud de EE.UU. con n° de serie 10/903.263 presentada el 30 de julio de 2004 (documento US2005/0234049) y en la solicitud internacional con n° de serie PCT/US2004/24716 (documento WO 2005/016893).

La capacidad de un profármaco para metabolizarse a un compuesto de 2,4-pirimidindiamina activo bajo las condiciones deseadas de uso se puede confirmar en ensayos *in vitro* y/o *in vivo*, tal como se describe previamente.

Usos y composiciones

Como se analiza previamente, los profármacos y las sales de profármacos descritas en el presente documento, tales como el compuesto 4 se metabolizan cuando se administran a animales y seres humanos en compuestos activos que inhiben las cascadas de señalización de receptores Fc, en especial los receptores Fc que incluyen un homodímero gamma, tal como las cascadas de señalización de FcεRI y/o FcγRI, que conducen, entre otros, a la liberación y/o la síntesis de mediadores químicos de células, por medio de desgranulación o bien de otros procesos. Como se analiza también, los compuestos activos también son potentes inhibidores de cinasa Syk. Como consecuencia de estas actividades, se pueden usar profármacos de estos compuestos activos en muchos contextos *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo* para regular o inhibir la cinasa Syk, cascadas de señalización en las que cinasa Syk desempeña un papel, cascadas de señalización de receptores Fc y las respuestas biológicas efectuadas por estas cascadas de señalización. Por ejemplo, en una realización, se pueden usar los profármacos y las sales de profármacos para inhibir la cinasa Syk, *in vitro* o bien *in vivo*, prácticamente en cualquier tipo de célula que expresa cinasa Syk. También se pueden usar para regular cascadas de transducción de señales en las que la cinasa Syk desempeña un papel. Estas cascadas de transducción de señales dependientes de Syk incluyen, pero no se limitan a, las cascadas de transducción de señales de FcεRI, FcγRI, FcγRIII, BCR e integrina. También se pueden usar los profármacos y las sales de profármacos *in vitro* o *in vivo* para regular y, en particular, inhibir, respuestas celulares o biológicas efectuadas por estas cascadas de transducción de señales dependientes de Syk. Estas respuestas celulares o biológicas incluyen, pero no se limitan a, estallido respiratorio, adhesión celular, desgranulación celular, propagación celular, migración celular, agregación celular, fagocitosis, síntesis y liberación de citocinas, maduración celular y flujo de Ca^{2+} . Notablemente, se pueden usar los profármacos y las sales de profármacos para inhibir cinasa Syk *in vivo* como un enfoque terapéutico para el tratamiento o prevención de enfermedades mediadas, totalmente o en parte, por una actividad de cinasa Syk. Ejemplos no limitantes de enfermedades mediadas por cinasa Syk que se pueden tratar o evitar con los profármacos y las sales de profármacos son los que se analizan con más detalle, a continuación.

En otra realización, se pueden usar los profármacos y las sales de profármacos para regular o inhibir las cascadas de señalización de receptores Fc y/o la desgranulación mediada por FcεRI y/o FcγRI como enfoque terapéutico para el tratamiento o la prevención de enfermedades caracterizadas por, causadas por y/o asociadas con la liberación o la síntesis de mediadores químicos de estas cascadas de señalización de receptores Fc o desgranulación. Estos tratamientos se pueden administrar a animales en un contexto veterinario o a seres humanos. Las enfermedades que se caracterizan por, causadas por o asociadas con esta liberación de mediadores, síntesis o desgranulación, y que, por lo tanto, se pueden tratar o evitar con los compuestos activos incluyen, a modo de ejemplo y sin limitación, reacciones alérgicas o de hipersensibilidad anafiláctica o de atopía, alergias (por ejemplo, conjuntivitis alérgica, rinitis alérgica, asma atópica, dermatitis atópica y alergias alimentarias), cicatrices de bajo grado (por ejemplo, de

esclerodermia, fibrosis incrementada, queloides, cicatrices post-quirúrgicas, fibrosis pulmonar, espasmos vasculares, migraña, daño por reperfusión e infarto post-miocárdico), enfermedades asociadas con la destrucción de tejidos (por ejemplo, de COPD, cardiobronquitis e infarto post-miocárdico), enfermedades asociadas con inflamación de tejido (por ejemplo, síndrome del intestino irritable, colon espástico y enfermedad inflamatoria intestinal), inflamación y cicatrices.

Estudios recientes han demostrado que la activación de plaquetas por colágeno está mediada a través de la misma ruta usada por los receptores inmunitarios, con un motivo tirosina cinasa de inmunorreceptor del FcR γ desempeñando un papel fundamental (Watson y Gibbons, 1998, *Immunol. Today* 19:260-264) y también que FcR γ desempeña un papel fundamental en la generación de la hiperplasia de la neóitima tras daño por globo en ratones, lo más probablemente a través de la activación inducida por colágeno del reclutamiento de plaquetas y leucocitos (Konichi *et al.*, 2002, *Circulation* 105:912-916). Por tanto, los profármacos descritos en el presente documento también se pueden usar para inhibir la activación plaquetaria inducida por colágeno y para tratar o evitar enfermedades asociadas con, o causadas por, dicha activación plaquetaria, tales como, por ejemplo, hiperplasia de la íntima y reestenosis posterior a daño vascular.

Además de las innumerables enfermedades analizadas anteriormente, los datos empíricos celulares y de animales confirman que los compuestos de 2,4-pirimidindiamina activos descritos en la solicitud de EE.UU. con nº de serie 10/631.029 presentada el 29 de julio de 2003 (documento US 2005/0028212), la solicitud internacional con nº de serie PCT/US03/24087 (documento WO2004/014382), la solicitud de EE.UU. con nº de serie 10/903.263 presentada el 30 de julio de 2004 (documento US2005/0234049) y la solicitud internacional con nº de serie PCT/US2004/24716 (documento WO 2005/016893), también son útiles para el tratamiento o la prevención de enfermedades autoinmunitarias, así como los diversos síntomas asociados con estas enfermedades. Por tanto, los profármacos y las sales de profármacos de estos compuestos activos son útiles para tratar o evitar estas enfermedades y/o síntomas. En general, los tipos de enfermedades autoinmunitarias que se pueden tratar o evitar con estos profármacos incluyen los trastornos que implican el daño tisular que se produce como resultado de una respuesta humoral y/o mediada por células a inmunógenos o antígenos de origen endógeno y/o exógeno. Estas enfermedades se denominan con frecuencia enfermedades que implican las reacciones de hipersensibilidad no anafilácticas (es decir, de tipo II, tipo III y/o tipo IV).

Como se analizó previamente, las reacciones de hipersensibilidad de tipo I, en general, resultan de la liberación de sustancias farmacológicamente activas, tales como histamina, de mastocitos y/o basófilos después del contacto con un antígeno exógeno específico. Como se menciona anteriormente, estas reacciones de tipo I desempeñan un papel en numerosas enfermedades, incluyendo asma alérgica, rinitis alérgica, etc.

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

Las reacciones de hipersensibilidad de tipo III (también denominadas reacciones de hipersensibilidad por complejos tóxicos, por complejos solubles o por complejos inmunitarias) resultan del depósito de complejos antígeno-inmunoglobulina circulantes solubles en los vasos o en tejidos, acompañando las reacciones inflamatorias agudas al lugar del depósito del complejo inmunitario. Ejemplos no limitantes de enfermedades por reacciones 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.

Las reacciones de hipersensibilidad de tipo IV (denominadas con frecuencia reacciones de hipersensibilidad celulares, mediadas por células, retardadas o de tipo tuberculina) están causadas por linfocitos T sensibilizados que resultan del contacto con un antígeno específico. Ejemplos no limitantes de enfermedades citadas por implicar reacciones de tipo IV son dermatitis de contacto y rechazo de aloinjerto.

Las enfermedades autoinmunitarias asociadas con cualquiera de las reacciones de hipersensibilidad no anafilácticas anteriores se puede tratar o evitar con los profármacos y las sales de profármacos de acuerdo con las fórmulas estructurales (I), (Ia), (IX) y (IXa). En particular, se pueden usar los métodos para tratar o evitar las enfermedades autoinmunitarias caracterizadas con frecuencia como trastornos autoinmunitarios de un sólo órgano o de un solo tipo de células, incluyendo, pero sin limitarse a: tiroiditis de Hashimoto, anemia hemolítica autoinmunitaria, gastritis atrófica autoinmunitaria de anemia perniciosa, encefalomiелitis autoinmunitaria, orquitis autoinmunitaria, enfermedad de Goodpasture, trombocitopenia autoinmunitaria, oftalmia simpática, miastenia gravis, enfermedad de Graves, cirrosis biliar primaria, hepatitis crónica activa, colitis ulcerosa y glomerulopatía membranosa, así como las enfermedades autoinmunitarias caracterizadas con frecuencia por implicar trastorno autoinmunitario sistémico, que incluyen, pero no se limitan a: lupus eritematoso sistémico (LES), artritis reumatoide, síndrome de Sjögren, síndrome de Reiter, polimiositis-dermatomiositis, esclerosis sistémica, poliarteritis nodosa, esclerosis múltiple y penfigoide ampolloso.

Se apreciará por expertos en la técnica que muchas de las enfermedades autoinmunitarias subyacentes anteriormente están asociadas con síntomas graves, cuya mejora proporciona un beneficio terapéutico significativo incluso en casos en los que la enfermedad autoinmunitaria subyacente no se puede mejorar. Muchos de estos síntomas, así como sus estados de enfermedad subyacente, se producen como consecuencia de la activación de la cascada de señalización de Fc γ R en monocitos. Ya que el compuesto 4 de profármaco se metaboliza al compuesto de 2,4-pirimidindiamina que es un potente inhibidor de esta señalización de Fc γ R en monocitos y otras células, los métodos encuentran un uso en el tratamiento y/o la prevención de innumerables síntomas adversos asociados con las enfermedades autoinmunitarias enumeradas anteriormente.

Como ejemplo específico, normalmente la artritis reumatoide (AR) da como resultado hinchazón, dolor, pérdida de movimiento y sensibilidad en articulaciones diana en todo el cuerpo. La AR se caracteriza por una membrana sinovial inflamada de forma crónica que está densamente llena con linfocitos. La membrana sinovial, que normalmente es de espesor de una capa celular, se vuelve intensamente celular y adquiere una forma similar al tejido linfático, incluyendo células dendríticas, linfocitos T, B y NK, macrófagos y clústeres de células plasmáticas. Este proceso, así como una plétora de mecanismos inmunopatológicos que incluyen la formación de complejos antígeno-inmunoglobulina, dan como resultado finalmente 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. Se pueden usar los métodos para tratar o mejorar uno cualquiera, varios o todos estos síntomas de AR. Por tanto, en el contexto de la AR, se considera que los métodos proporcionan un beneficio terapéutico (analizado de forma más general, infra) cuando se logra una reducción o mejora de cualquiera de los síntomas asociados comúnmente con la 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 circulante ("FR").

El Colegio americano de reumatología (ACR) ha desarrollado criterios para definir la mejora y la remisión clínica en la AR. Uno de estos parámetros, el ACR20 (criterio de ACR para una mejora clínica de un 20 %), requiere una mejora de un 20 % en el recuento de articulaciones doloridas e inflamadas, así como una mejora de un 20 % en 3 de los siguientes 5 parámetros: evaluación general del paciente, evaluación global del médico, evaluación del dolor del paciente, grado de discapacidad, y nivel de reactivo de fase aguda. Estos criterios se han ampliado para una mejora de un 50 % y un 70 % en ACR50 y ACR70, respectivamente. Otros criterios incluyen los criterios de Paulu y la progresión radiográfica (por ejemplo, puntuación de Sharp).

En algunas realizaciones, se logra el beneficio terapéutico en pacientes que padecen AR cuando el paciente presenta un ARC20. En realizaciones específicas, se puede lograr un ARC de ARC50 o incluso de ARC70.

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

La esclerosis múltiple ("EM"), incapacita al paciente alterando la agudeza visual, estimulando la visión doble; alterando las funciones motoras que afecta a la capacidad de caminar y al uso de las manos; produciendo incontinencia de colon y vejiga, espasticidad, y déficits sensoriales (tacto, dolor y sensibilidad a la temperatura). En el contexto de la EM, se considera que los métodos proporcionan un beneficio terapéutico cuando se logra una mejora o reducción en la progresión de uno cualquiera o más de los efectos de incapacidad comúnmente asociados con la EM, independientemente de si el tratamiento da como resultado un tratamiento concomitante de la EM subyacente.

Cuando se usa para tratar o evitar estas enfermedades, los profármacos y sales de profármacos descritos en el presente documento se pueden administrar de forma individual, como mezclas de uno o más profármacos y sales de profármacos o en mezcla o combinación con otros agentes útiles para tratar estas enfermedades y/o los síntomas asociados con estas enfermedades. Los profármacos y las sales de profármacos también se pueden administrar en mezcla o en combinación con otros agentes útiles para tratar otros trastornos o enfermedades, tales como esteroides, estabilizadores de membrana, inhibidores de 5-LO, inhibidores de receptores y de la síntesis de leucotrienos, inhibidores del cambio del isotipo de IgE o de la síntesis de IgE, cambio de isotipo de 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 algunos. Los profármacos y las sales de profármacos se pueden administrar en forma de compuestos *per se*, o como composiciones farmacéuticas que comprenden un profármaco.

Otro aspecto de la invención se refiere a composiciones farmacéuticas del hidrato de sal del profármaco descritas en el presente documento. En consecuencia, una realización de la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el hidrato de sal del profármaco definido anteriormente en el presente documento y un vehículo, excipiente y/o diluyente farmacéuticamente aceptable. El hidrato de sal del profármaco se puede preparar, por ejemplo, por cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. Preferentemente, la proporción molar

hidroxipropilmetilcelulosa); cargas (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o hidrógenofosfato 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, lauril sulfato de sodio). Los comprimidos se pueden recubrir por métodos muy conocidos en la técnica, por ejemplo, con azúcares, películas o recubrimientos.

5 Los profármacos de fosfato en los que el/los progrupo(s) es/son de la fórmula $-(CR)^dR^d)_y-O-P(O)(OH)_2$ y varias sales de profármacos de fosfato en las que el/los progrupo(s) es/son de la fórmula $-(CR)^dR^d)_y-O-P(O)(O^-)_2[M^+]_2$ o $-(CR)^dR^d)_y-O-P(O)(OH)(O^-)[M^+]$, en los que cada R^d , independientemente de los demás, se selecciona de hidrógeno y alquilo inferior e y es 1 ó 2 y que presenta una solubilidad en agua en el intervalo de aproximadamente 0,1 a 1000 mg/ml a pH fisiológico, son especialmente adecuados para la administración oral por medio de comprimidos y

10 cápsulas. Cuando se administra a ratas Sprague-Dawley por vía oral a partir de cápsulas, el compuesto **4** de profármaco presenta una biodisponibilidad del compuesto **1** de fármaco de aproximadamente un 30 % (véase la figura 5), siendo la absorción casi idéntica a la del compuesto **1** de fármaco activo (véase la figura 6). Se espera que otros profármacos de fosfato y sales de profármacos que tienen propiedades de solubilidad en agua similares a las del compuesto **4** de profármaco presenten propiedades farmacocinéticas similares.

15 Una formulación de comprimidos ejemplar específica para el compuesto **4** de profármaco (así como otros profármacos que contienen fosfato) contiene aproximadamente 50-400 mg de compuesto de profármaco (o una sal del mismo), aproximadamente de un 0,05 a un 0,5 % en peso de dióxido de silicio coloidal, aproximadamente de un 0,5 a un 5,0 % en peso de croscarmelosa de sodio, aproximadamente de un 0,25 a un 5,0 % en peso de estearato de magnesio y aproximadamente de un 20 a un 80 % en peso de celulosa microcristalina. Si se desea, se pueden recubrir los comprimidos con una película, tal como una película de hipromelosa, carboximetilcelulosa o fructosa, que puede contener opcionalmente agentes colorantes, tales como, por ejemplo, FD&C azul nº 1, FD&C verde nº 3, FD&C amarillo nº 6 y dióxido de titanio.

25 Las preparaciones líquidas orales pueden adoptar la forma, por ejemplo, de elixires, soluciones, jarabes o suspensiones, o se pueden presentar como un producto seco para su reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Estas preparaciones líquidas se pueden preparar por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables, tales como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas hidrogenadas comestibles); agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina o goma arábica); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendra, ésteres oleosos, 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 tamponadoras, conservantes y agentes saborizantes, colorantes y edulcorantes según convenga.

35 Los preparativos para la administración oral se pueden formular adecuadamente para dar una liberación controlada del profármaco o de la sal de profármaco, como es bien conocido.

Para la administración bucal, las composiciones pueden adoptar la forma de comprimidos o pastillas para chupar formulados de modo convencional.

40 Para las vías de administración rectal y vaginal, el/los profármaco(s) o la(s) sal(es) de profármaco(s) se puede(n) formular como soluciones (para enemas de retención), supositorios o pomadas que contienen bases de supositorios convencionales, tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

45 Para la administración nasal o la administración por inhalación o insuflación, el/los profármaco(s) o la(s) sal(es) de profármaco(s) que puede(n) suministrar convenientemente en forma de pulverización de aerosol a partir de envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorofluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, fluorocarbonos, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación se puede determinar proporcionando una válvula para administrar una cantidad medida. Se pueden formular cápsulas y cartuchos para su uso en un inhalador o insuflador (por

50 ejemplo, cápsulas y cartuchos compuestos de gelatina) que contengan una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada, tal como lactosa o almidón.

55 Para la administración ocular, el/los profármaco(s) o la/las sal(es) de profármaco(s) se puede(n) formular como una solución, emulsión, suspensión, etc., adecuadas para su administración en el ojo. En la técnica se conocen muchos vehículos adecuados para administrar compuestos en el ojo. Los ejemplos no limitantes específicos se describen en la patente de los EE.UU. nº 6.261.547; la patente de los EE.UU. nº 6.197.934; la patente de los EE.UU. nº 6.056.950; la patente de los EE.UU. nº 5.800.807; la patente de los EE.UU. nº 5.776.445; la patente de los EE.UU. nº 5.698.219; la patente de los EE.UU. nº 5.521.222; la patente de los EE.UU. nº 5.403.841; la patente de los EE.UU. nº 5.077.033; la patente de los EE.UU. nº 4.882.150; y la patente de los EE.UU. nº 4.738.851.

60 Para la administración prolongada, el/los profármaco(s) o la(s) sal(es) de profármaco(s) se puede(n) formular como una preparación de depósito para la administración por implantación o inyección intramuscular. El/los profármaco(s) o la(s) sal(es) de profármaco(s) se puede(n) formular con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados moderadamente solubles, por ejemplo, como una sal moderadamente soluble. De forma alternativa, se pueden usar

- sistemas de administración transdérmica fabricados como un disco o parche adhesivo que libera lentamente el/los profármaco(s) o la(s) sal(es) de profármaco(s) para absorción percutánea. Con este fin, se pueden usar potenciadores de permeación para facilitar la penetración del/de los profármaco(s) o la(s) sal(es) de profármaco(s). Los parches transdérmicos adecuados se describen, por ejemplo, en la patente de los EE.UU. nº 5.407.713.; la
- 5 patente de los EE.UU. nº 5.352.456; la patente de los EE.UU. nº 5.332.213; la patente de los EE.UU. nº 5.336.168; la patente de los EE.UU. nº 5.290.561; la patente de los EE.UU. nº 5.254.346; la patente de los EE.UU. nº 5.164.189; la patente de los EE.UU. nº 5.163.899; la patente de los EE.UU. nº 5.088.977; la patente de los EE.UU. nº 5.087.240; la patente de los EE.UU. nº 5.008.110; y la patente de los EE.UU. nº 4.921.475.
- 10 De forma alternativa, se pueden emplear otros sistemas de administración farmacéutica. Los liposomas y las emulsiones son ejemplos muy conocidos de vehículos de administración que se pueden usar para suministrar el/los profármaco(s) o la(s) sal(es) de profármaco(s). También se pueden emplear determinados disolventes orgánicos, tales como dimetilsulfóxido (DMSO), aunque normalmente a costa de una mayor toxicidad.
- 15 Las composiciones farmacéuticas se pueden presentar, si se desea, en un envase o dispositivo dispensador que puede contener una o más formas de dosificación unitarias que contienen el/los profármaco(s) o la(s) sal(es) de profármaco(s). El envase puede comprender, por ejemplo, lámina de metal o de plástico, tal como un envase tipo blíster. El envase o dispositivo dispensador se puede acompañar por instrucciones para su administración.

20 Dosificaciones eficaces

El/los profármaco(s) o la(s) sal(es) de profármaco(s) descritas en el presente documento, o composiciones de las mismas, se usarán en general en una cantidad eficaz para lograr el resultado previsto, por ejemplo en una cantidad eficaz para tratar o evitar la enfermedad particular que se va a tratar. El/los profármaco(s) o la(s) sal(es) de

25 profármaco(s) se puede(n) administrar de forma terapéutica para lograr un beneficio terapéutico o de forma profiláctica para lograr un beneficio profiláctico. Pro beneficio terapéutico se quiere decir la erradicación o mejora del trastorno subyacente que se está tratando y/o la erradicación o mejora de uno o más de los síntomas asociados con el trastorno subyacente, de modo que el paciente informe de una mejora en la sensación o el estado, a pesar de que el paciente aún pueda estar afectado con el trastorno subyacente. Por ejemplo, la administración de un compuesto a

30 un paciente que padece de una alergia proporciona un beneficio terapéutico no sólo cuando se erradica o se mejora la respuesta alérgica subyacente, sino también cuando el paciente informa de un descenso en la gravedad o la duración de los síntomas asociados con la alergia después de la exposición al alérgeno. Como otro ejemplo, el beneficio terapéutico en el contexto del asma incluye una mejora en la respiración después del inicio de un ataque asmático, o una reducción en la frecuencia o gravedad de episodios asmáticos. El beneficio terapéutico en el

35 contexto de la AR también incluye el ACR20 o ACR50 o ACR70 o, como se describe previamente. En general, el beneficio terapéutico también incluye detener o ralentizar la progresión de la enfermedad, independientemente de si se consigue una mejora.

Para la administración profiláctica, el/los profármaco(s) o la(s) sal(es) de profármaco(s) se puede(n) administrar a un

40 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/los profármaco(s) o la(s) sal(es) de profármaco(s) se puede(n) administrar antes de la administración del fármaco para evitar o mejorar una respuesta alérgica al fármaco. De forma alternativa, la administración profiláctica se puede aplicar para evitar la aparición de síntomas en un paciente diagnosticado con el trastorno subyacente. Por ejemplo, el/los profármaco(s) o la(s) sal(es) de profármaco(s) se

45 puede(n) administrar a un paciente alérgico antes de la exposición esperada al alérgeno. El/los profármaco(s) o la(s) sal(es) de profármaco(s) también se pueden administrar de forma profiláctica a individuos sanos que se exponen repetidamente a agentes conocidos de una de las enfermedades descritas anteriormente para evitar la aparición del trastorno. Por ejemplo, el/los profármaco(s) o la(s) sal(es) de profármaco(s) se puede(n) administrar a un individuo sano que se expone repetidamente a un alérgeno conocido por inducir alergias, tales como látex, en un esfuerzo por

50 evitar que el individuo desarrolle una alergia. De forma alternativa, el/los profármaco(s) o la(s) sal(es) de profármaco(s) se puede(n) administrar a un paciente que padecen de asma antes de tomar parte en actividades que desencadenan ataques de asma para disminuir la gravedad de, o evitar por completo, un episodio asmático.

La cantidad del/de los profármaco(s) o la(s) sal(es) de profármaco(s) administrada dependerá de muchos factores, incluyendo, por ejemplo, la indicación particular que se trata, el modo de administración, si el beneficio deseado es

55 profiláctico o terapéutico, la gravedad de la indicación que se trata y la edad y el peso del paciente, la biodisponibilidad del/de los profármaco(s) o la(s) sal(es) de profármaco(s) particular(es), la tasa de conversión y la eficacia en compuesto de fármaco activo en la vía de administración seleccionada, etc. La determinación de una dosificación efectiva del/de los profármaco(s) o la(s) sal(es) de profármaco(s) para un uso y modo de administración

60 particulares está dentro de las capacidades de los expertos en la técnica.

Las dosificaciones eficaces se pueden estimar inicialmente a partir de la actividad *in vitro* y ensayos de metabolismo. Por ejemplo, se puede formular una dosificación inicial de profármaco o sal de profármaco para su uso en animales para lograr una concentración sanguínea o sérica circulante del compuesto activo de metabolito que sea de o

65 superior a una CI_{50} del compuesto particular como se mide en un ensayo *in vitro*, tal como CHMC o BMMC *in vitro* y otros ensayos *in vitro* descritos en la solicitud de los EE.UU. con nº de serie 10/355.543 presentada el 31 de enero

de 2003 (US2004/0029902A1), la solicitud internacional con nº de serie PCT/US03/03022 presentada el 31 de enero de 2003 (documento WO 03/063794), la solicitud de los EE.UU. con nº de serie 10/631.029 presentada el 29 de julio de 2003 (documento US 2005/0028212), la solicitud internacional con nº de serie PCT/US03/24087 (documento WO2004/014382), la solicitud de los EE.UU. con nº de serie 10/903.263 presentada el 30 de julio de 2004 (US2005/0234049), y la solicitud internacional con nº de serie PCT/US2004/24716 (documento WO 2005//016893). El cálculo de las dosificaciones para lograr estas concentraciones sanguíneas o séricas circulantes teniendo en cuenta la biodisponibilidad del profármaco particular por medio de la vía de administración deseada está dentro de las capacidades de los expertos en la técnica. Para que sirva de guía, se remite al lector a Fingl y Woodbury, "General Principles", en: Goodman and Gilman's The Pharmaceutical Basis of Therapeutics, capítulo 1, p. 1-46, última edición, Pagamonon Press, y las referencias citadas en éste.

También se pueden estimar las dosificaciones iniciales de profármaco o sal de profármaco a partir de datos *in vivo*, tales como modelos animales. Los modelos animales útiles para someter a prueba la eficacia de los metabolitos activos para tratar o evitar las diferentes enfermedades descritas anteriormente son muy conocidos en la técnica. Los modelos animales adecuados de hipersensibilidad o reacciones alérgicas se describen en Foster, 1995, Allergy 50(21 Supl):6-9, análisis 34-38 y en Tumas *et al.*, 2001, J. Allergy Clin. Immunol. 107(6):1025-1033. Los 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 en Sugimoto *et al.*, 2000, Immunopharmacology 48(1):1-7.

Los 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 en Kunert *et al.*, 2001, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 42(11):2483-2489. Los modelos animales adecuados de mastocitosis sistémica se describen en O'Keefe *et al.*, 1987, J. Vet. Intern. Med. 1 (2):75-80 y en Bean-Knudsen *et al.*, 1989, Vet. Pathol. 26(1):90-92. Los modelos animales adecuados de síndrome de hiper IgE se describen en Claman *et al.*, 1990, Clin. Immunol. Immunopathol. 56(1):46-53. Los modelos animales adecuados de linfoma de linfocitos B se describen en Hough *et al.*, 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:13853-13858 y en Hakim *et al.*, 1996, J. Immunol. 157 (12):5503-5511. Los modelos animales adecuados de trastornos atópicos tales como dermatitis atópica, eccema atópico y asma atópica se describen en Chan *et al.*, 2001, J. Invest. Dermatol. 1 J 7(4):977-983 y en Suto *et al.*, 1999, Int. Arch. Allergy Immunol. 120 (Supl. 1): 70-75. Los modelos animales adecuados para someter a prueba la biodisponibilidad y/o el metabolismo de profármacos en metabolitos activos también son muy conocidos. Los expertos en la técnica pueden adaptar de forma rutinaria esta información para determinar dosificaciones las dosificaciones de profármacos y sales de profármacos particulares adecuados para la administración humana. Otros modelos animales adecuados se describen en la sección de ejemplos.

Las cantidades de dosificación estarán normalmente en el intervalo de desde aproximadamente 0,0001 mg/kg/día, 0,001 mg/kg/día o 0,01 mg/kg/día a aproximadamente 100 mg/kg/día, pero pueden ser mayores o menores, dependiendo, entre otros factores, de la actividad del compuesto de metabolito activo, la biodisponibilidad del profármaco o sal de profármaco, su cinética de metabolismo y otras propiedades farmacocinéticas, el modo de administración y otros diversos factores, analizados anteriormente. La cantidad y el intervalo de dosificación se puede ajustar individualmente para proporcionar concentraciones plasmáticas del/de los profármaco(s), sal(es) de profármaco(s) y/o su compuesto(s) de metabolito activo(s) que son suficientes para mantener el efecto terapéutico o profiláctico. Por ejemplo, los profármacos se pueden administrar una vez por semana, varias veces por semana (por ejemplo, en días alternos), una vez al día o varias veces al día, dependiendo, entre otras cosas, del modo de administración, la indicación específica que se trata y el criterio del médico. En casos de administración o captación selectiva local, tal como la administración tópica local, la concentración local eficaz de profármaco(s), sal(es) de profármaco(s) y/o compuesto(s) de metabolito activo(s) puede no estar relacionada con la concentración plasmática. Los expertos en la técnica podrán optimizar las dosificaciones locales eficaces sin experimentación indebida.

Preferentemente, los profármacos se metabolizarán en compuesto(s) activo(s), que proporcionarán un beneficio terapéutico o profiláctico sin provocar toxicidad sustancial.

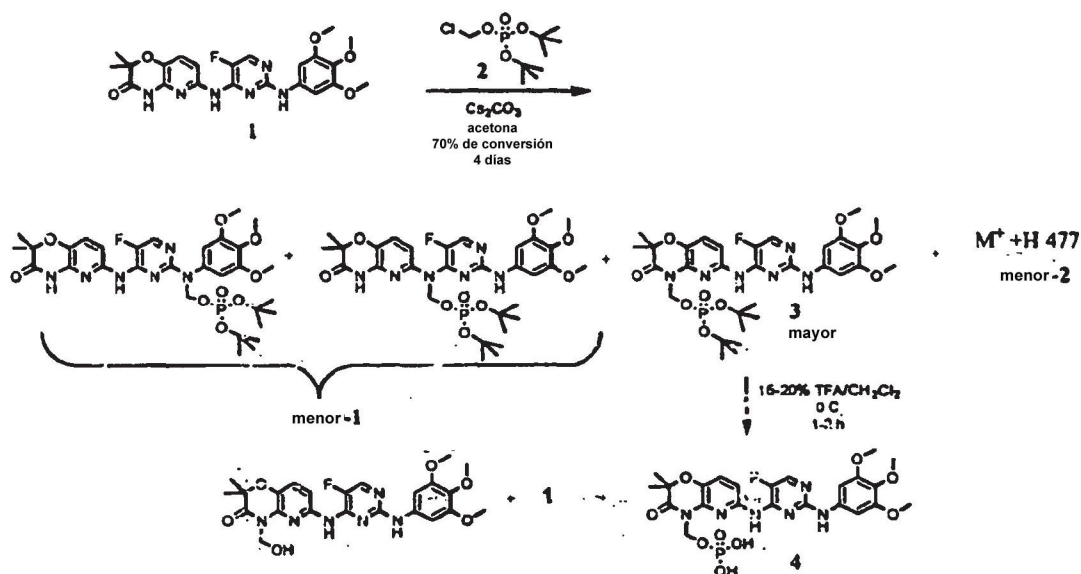
La toxicidad de los metabolitos activos y otros, así como el profármaco no metabolizado se puede determinar usando métodos farmacéuticos estándar. La proporción de dosis entre el efecto tóxicos y terapéuticos (o profilácticos) es el índice terapéutico. Se prefieren profármaco(s) y sal(es) de profármaco(s) que presenten altos índices terapéuticos.

Las invenciones que se han descrito, los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y sin limitación.

Ejemplos

1. Síntesis del compuesto 4 de profármaco (intermedio de síntesis)

1.1 N4-(2,2-dimetil-4-[(di-terc-butil-fosfonoxi)metil]-3-oxo-5-pirido[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro- N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidindiamina (compuesto 3)



Se agitó N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-5-pirido[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidindiamina (1, 1,0 g, 2,12 mmol), Cs₂CO₃ (1,0 g, 3,07 mmol) y clorometilfosfato de di-terc-butilo (2, 0,67 g, 2,59 mmol) en acetona (20 ml) a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno. Se monitorizó el progreso de la reacción por CL/EM. La mezcla de reacción en bruto presentó tres picos de producto con tiempos de retención próximos con M⁺ + H 693 (menor-1) 693 (mayor; 3) y 477 (menor-2) además de material de partida (compuesto 1). Después de agitar el contenido durante 4 días (consumo de un 70 %), se concentró la mezcla de reacción y se diluyó con agua. Se recogió el precipitado amarillo pálido resultante formado por filtración y se secó. Se purificó el sólido en bruto por cromatografía en columna de gel de sílice (pretratado con 10 % de NEt₃/CH₂Cl₂ seguido de elución con hexanos) por gradiente de elución con 70 % de EtOAc/hexanos 100 % EtOAc. Se recogieron y se concentraron las fracciones que contenían el compuesto 1 y M⁺ + H 693. Se sometió a repurificación el sólido blanco en bruto resultante de forma similar como se describe previamente pero eluyendo con un 30 % -50 % -75 % -100 % de EtOAc/hexanos. Se recogió el pico de producto principal con M⁺ + H 693 como un sólido blanco (270 mg, 18 %) y se caracterizó como N4-(2,2-dimetil-4-[(di-terc-butil-fosfonoxi)metil]-3-oxo-5-pirido[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidindiamina (compuesto 3). RMN de H¹ (DMSO-d₆): δ 9,21 (s, 1H), 9,17 (s, 1H), 8,16 (d, 1H, J = 2,6 Hz), 7,76 (d, 1H, J = 8,5 Hz), 7,44 (d, 1H, J = 8,5 Hz), 7,02 (s, 2H), 5,78 (d, 1H, J³PH = 6,1 Hz), 3,64 (s, 6H), 3,58 (s, 3H), 1,45 (s, 6H), 1,33 (s, 9H). CLEM: tiempo de ret.: 14,70 min; pureza: 95 %; EM (m/e): 693 (MH⁺). RMN de P³¹ (DMSO-d₆): -11,36.

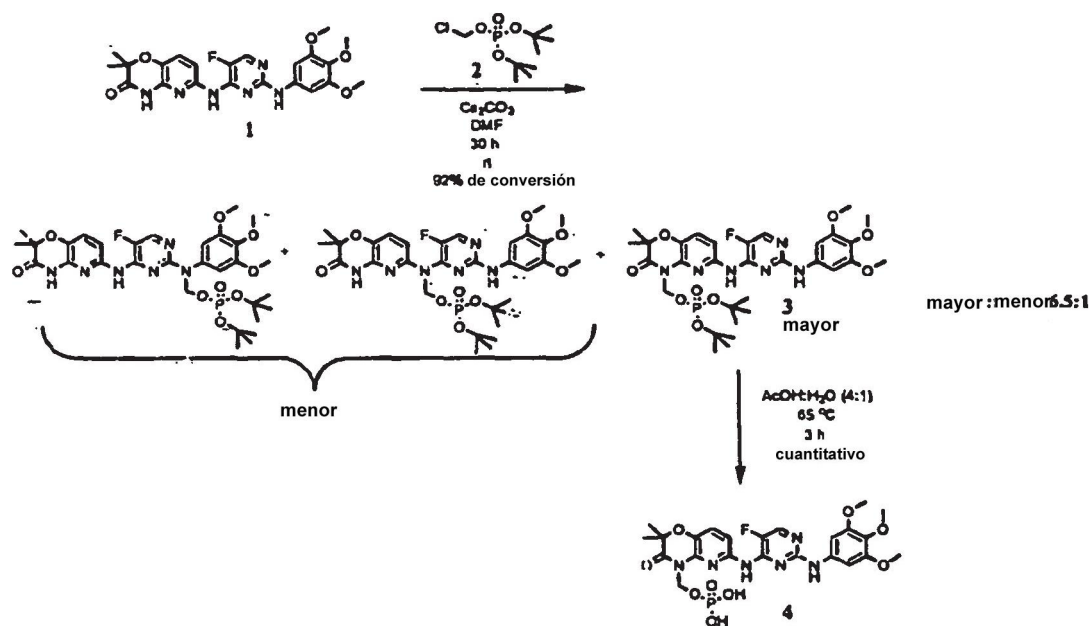
1.2. N4-(2,2-dimetil-4-[(dihidrogen-fosfonoxi)metil]-3-oxo-5-pirido[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidindiamina (compuesto 4)

Se añadió gota a gota ácido trifluoroacético (1,5 ml) se añadió gota a gota solo durante 5 minutos a N4-(2,2-dimetil-4-[(di-terc-butil-fosfonoxi)metil]-3-oxo-5-pirido[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidindiamina (compuesto 3, 120 mg, 0,173 mmol) disuelto en CH₂Cl₂ (10 ml) a 0 °C bajo atmósfera de nitrógeno. Se dejó el contenido agitando durante 1,5 h. Se monitorizó el progreso de la mezcla de reacción por CL/EM. Después de completar el consumo del material de partida, se concentró la mezcla de reacción, se secó y se trituró con éter. Se decantó la capa etérea y se secó para proporcionar el sólido en bruto. El análisis de CL/EM del bruto presentó tres picos con M⁺ + H 581, 471 y 501. El pico correspondiente a M⁺ + H 581 se recogió por purificación cromatográfica de HPLC preparativa. Se liofilizaron y se secaron las fracciones para proporcionar 53 mg (52 %) de un sólido esponjoso blanquecino y se caracterizó como N4-(2,2-dimetil-4-[(dihidrogen-fosfonoxi)metil]-3-oxo-5-pirido[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidindiamina (compuesto 4). RMN de H¹ (DMSO-d₆): δ 9,21 (s, 2H), 8,16 (d, 1H, J = 2,6 Hz), 7,93 (d, 1H, J = 8,5 Hz), 7,39 (d, 1H, J = 8,5 Hz), 7,05 (s, 2H), 5,79 (d, 1H, J³PH = 6,6 Hz), 3,67 (s, 6H), 3,59 (s, 3H), 1,44 (s, 6H). CLEM: tiempo de ret.: 8,52 min; pureza: 95 %; EM (m/e): 581 (MH⁺). RMN de P³¹ (DMSO-d₆): -2,17.

2. Síntesis alternativa del compuesto 4 de profármaco (intermedio de síntesis)

A continuación, se proporciona un método alternativo de síntesis del compuesto 4 de profármaco que atenúa la necesidad de uso de cromatografía en columna y purificación por HPLC.

2.1 Síntesis de N4-(2,2-dimetil-4-[(di-terc-butil-fosfonoxi)metil]-3-oxo-5-pirido[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidindiamina (compuesto 3)



Se agitó N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-5-pirido[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidindiamina (compuesto 1, 19,73 g, 41,97 mmol), Cs₂CO₃ (15,04 g, 46,16 mmol) y clorometilfosfato de di-terc-butilo (13,0 g, 50,38 mmol) en DMF (100 ml) a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno. Se monitorizó el progreso de la reacción por CL/EM en proceso. La mezcla de reacción en bruto presentó dos picos de producto (proporción 1;6,5) con tiempos de retención próximos con M⁺+ H 693 (menor) y 693 (mayor) además de material de partida (compuesto 1). La mezcla de reacción amarilla inicial se volvió verde oliva al avanzar la reacción. Se llevó a cabo el tratamiento como sigue

1) Después de agitar el contenido durante 30 h (consumo de un 92 %), se vertió la mezcla de reacción sobre hielo-agua (400 ml) y se agitó el contenido añadiendo solución de salmuera (200 ml). El sólido amarillo tostado fino formado se filtró, se lavó con agua y se secó durante toda una noche.

2) Se disolvió el sólido (35 g) en MTBE (500 ml) y se lavó con agua (400 ml). Se extrajo la capa acuosa con MTBE (2X 350 ml) hasta la ausencia de UV en TLC. Se secaron las capas orgánicas combinadas sobre Na₂SO₄ anhidro y se decantó.

Nota: la etapa 2 se puede realizar directamente, sin embargo, la extracción de DMF de nuevo en solución da lugar a dificultades en la etapa de cristalización.

3) La solución transparente de color rojo oscuro se sometió a tratamiento con 10 g de carbón activado, se calentó hasta ebullición y se filtró.

4) Se concentró la solución transparente de color rojo oscuro por calentamiento normal hasta 400 ml de su volumen y se dejó para cristalización. Se filtró el sólido cristalizado en forma de gránulos, se golpearon los gránulos hasta polvo, se lavó con MTBE (400 ml) y se secó bajo alto vacío. Véase la etapa 7 para el tratamiento de licor madre. Peso del sólido: 17 g; pureza: 90 % (compuesto 3), 6,26 % (compuesto 1), 1,8 % (menor M+ 693).

5) En esta fase, se llevó el sólido a 500 ml de éter etílico y se calentó hasta ebullición. Se enfrió y se filtró para retirar el material no disuelto. Se concentró el filtrado.

6) Se sometió el concentrado superior a cristalización en MTBE (300 ml). El sólido blanco formado se filtró, se lavó con MTBE (100 ml) y se secó bajo alto vacío para proporcionar la N4-(2,2-dimetil-4-[(di-terc-butil-fosfonoxi)metil]-3-oxo-5-pirido[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidindiamina deseada (compuesto 3) con una pureza de un 97 %. RMN de H¹ (DMSO-d₆): δ 9,21 (s, 1H), 9,17 (s, 1H), 8,16 (d, 1H, J = 2,6 Hz), 7,76 (d, 1H, J = 8,5 Hz), 7,44 (d, 1H, J = 8,5 Hz), 7,02 (s, 2H), 5,78 (d, 1H, J_{PH}³ = 6,1 Hz), 3,64 (s, 6H), 3,58 (s, 3H), 1,45 (s, 6H), 1,33 (s, 9H), CLEM: tiempo de ret.: 14,70 min; pureza: 95 %; EM (m/e): 693 (MH⁺). RMN de P³¹ (DMSO-d₆): -11,36. Peso del sólido: 15,64 g (rendimiento: 55 %), pureza: 97 % (compuesto 3), 3 % (compuesto 1).

7) Se concentró el licor madre y se repitieron las etapas 5 y 6 para proporcionar el compuesto 3.

2.2. Síntesis de N4-(2,2-dimetil-4-[(dihidrogen-fosfonoxi)metil]-3-oxo-5-pirido[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-

(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidindiamina (compuesto 4)

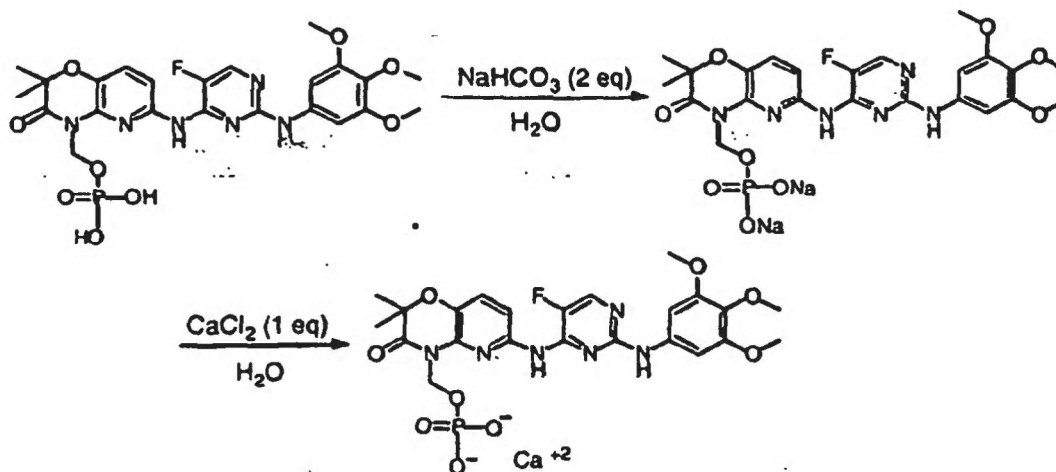
Se calentó N4-(2,2-dimetil-4-[(di-terc-butil-fosfonoxi)metil]-3-oxo-5-pirido[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidindiamina (compuesto 3); (15,0 g, 21,67 mmol) disuelto en AcOH:H₂O (225 ml, 4:1) a 65 °C (temp. del baño de aceite). Se monitorizó el progreso de la reacción por CL/EM en proceso. La mezcla de reacción se transformó en un sólido blanco tostado ligero después de 1 h de calentamiento. En este punto, la mayoría del compuesto 3 se convirtió en producto mono des t-butilado. Después de 3 horas de calentamiento, se observó el consumo de MP y la conversión completa del intermedio (mono des t-butilado).

Se enfrió la mezcla de reacción, se vertió en agua helada (200 ml) se agitó durante 20 min y se filtró. Se lavó la torta del filtro de color blanco transparente con agua (600 ml) y acetona (200 ml), sucesivamente, se secó durante 2 h seguido de secado bajo alto vacío sobre P₂O₅ en un desecador. Peso del sólido: 12,70 g; pureza: 97 % (compuesto 3) y 3 % (compuesto 1) RMN de H¹ indicó la presencia de ácido acético (1:1)

Para retirar el ácido acético, se llevó el sólido a acetonitrilo (300 ml) y se concentró por vacío en evaporador rotatorio. Se repitió este proceso dos veces con acetonitrilo y tolueno (3 X 300 ml). Se secó el sólido obtenido bajo alto vacío a 500 °C.

Finalmente, se llevó el sólido a acetona (400 ml), se filtró y se secó para proporcionar N4-(2,2-dimetil-4-[(dihidrogen-fosfonoxi)metil]-3-oxo-5-pirido[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidindiamina sólida (compuesto 4). RMN de H¹ (DMSO-d₆): δ 9,21 (s ancho, 2H), 8,16 (d, 1H, J = 2,6 Hz), 7,93 (d, 1H, J = 8,5 Hz), 7,39 (d, 1H, J = 8,5 Hz), 7,05 (s, 2H), 5,79 (d, 1H, J³_{PH} = 6,6 Hz), 3,67 (s, 6H), 3,59 (s, 3H), 1,44 (s, 6H). CLEM: tiempo de ret.: 8,52 min; pureza: 95 %; EM (m/e): 581 (MH⁺). RMN de P³¹ (DMSO-d₆): -2,17.

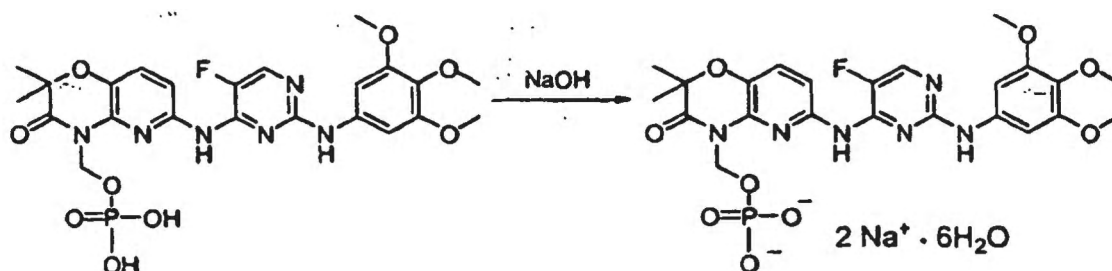
3. Síntesis de sal de monocalcio de N4-(1,2-dimetil-4-[(dihidrogen-fosfonoxi)metil]-3-oxo-5-pirido[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidindiamina (sal de profármaco 6) (no de acuerdo con la invención)



Se añadieron gota a gota (10 ml) de solución acuosa de NaHCO₃ (0,17 g, 2,02 mmol) a una suspensión de N4-(2,2-dimetil-4-[(dihidrogen-fosfonoxi)metil]-3-oxo-5-pirido[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidindiamina (0,5 g, 0,86 mmol) en agua (5 ml) a temperatura ambiente agitando mientras el contenido. Se trató la solución transparente formada con (10 ml) de CaCl₂ acuoso (0,11 g en 10 ml de agua, 0,99 mmol) gota a gota a temperatura ambiente. La adición dio como resultado la precipitación de un sólido blanco de la mezcla de reacción. Después de completarse la adición, se agitó el contenido durante un periodo de 30 min, se filtró, se lavó con agua (40 ml) y se secó. Se llevó el sólido blanco transparente a agua (30 ml) y se calentó sobre una placa de agitación hasta ebullición. La solución se enfrió, se filtró y se secó. Se recogió el sólido blanco y se secó adicionalmente bajo alto vacío a 80 °C durante 32 h para proporcionar 0,41 g (83 %) de sal de monocalcio de N4-(2,2-dimetil-4-[(dihidrogen-fosfonoxi)metil]-3-oxo-5-pirido[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidindiamina sólida (sal de profármaco 4).

También se puede usar Ca(OAc)₂ en lugar de CaCl₂ en esta preparación.

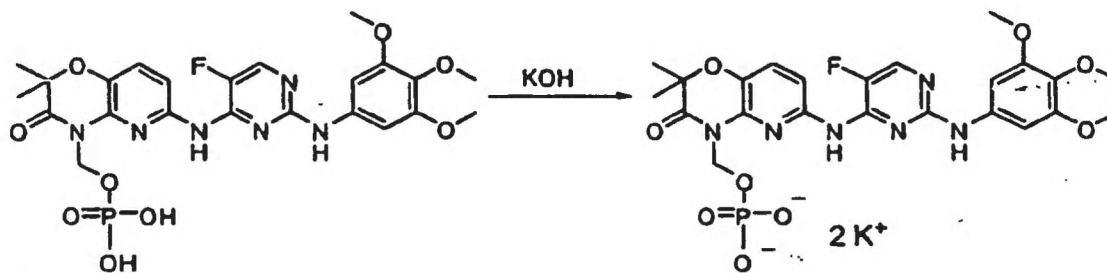
4. Síntesis de hexahidrato de sal de monosodio (de acuerdo con la invención) e hidrato de sal de monosodio (no de acuerdo con la invención) de N4-(2,2-dimetil-4-[(dihidrogen-fosfonoxi)metil]-3-oxo-5-pirido[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidindiamina



Se cargó un matraz de fondo redondo con 10,00 g de N4-(2,2-dimetil-4-(dihidrogen-fosfonoxi)metil]-3-oxo-5-pirido[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidindiamina (compuesto 4) y 140 ml de agua en un matraz de fondo redondo para formar una suspensión que tiene un pH de entre 3,6 y 3,7. Se ajustó el pH en el intervalo de 9,3 a 10,3 por adición de NaOH acuoso 1 M, formando inicialmente una solución turbia, que volvió a una suspensión después de agitación prolongada. Se calentó a reflujo la mezcla, después se filtró en caliente la solución turbia a través de papel de filtro. Se aclaró el sólido recogido en el papel de filtro con 10 ml de agua caliente. Se añadió isopropanol (75 ml) al filtrado, proporcionando una solución transparente, que se dejó enfriar hasta temperatura ambiente durante aproximadamente 1,5 horas con agitación, tiempo durante el que precipitó un sólido. Se recogió por filtración el precipitado, se aclaró con 47 ml de isopropanol y se llevó a 73 ml de acetona para formar una suspensión, que se agitó durante 1,5 horas a temperatura ambiente. Se recogió de nuevo el sólido por filtración y se aclaró con 18 ml de acetona, después se secó a aproximadamente 40 °C a vacío hasta que se retiró sustancialmente todo el isopropanol y la acetona (es decir, inferior a un 0,5 % en peso de cada). Se expuso el producto a aire de humedad relativa de aproximadamente un 40 % y temperatura ambiente hasta que se estabilizó el contenido de agua a aproximadamente un 15 % por valoración de Karl Fisher, produciendo 8,18 g del compuesto del título. RMN- ^1H (D_2O): δ 7,67 (d, 1H, J = 3,8 Hz), 7,49 (d, 1H, J = 8,8 Hz), 6,87 (d, 1H, J = 8,8 Hz), 6,50 (s, 2H), 5,52 (d, 1H, $J^3_{\text{PH}} = 2,0$ Hz), 3,53 (s, 3H), 3,47 (s, 6H), 1,32 (s, 6H). RMN- P^{31} (D_2O): 2,75. Se obtuvo el hidrato de sal de profármaco como un material blanco puro, altamente cristalino. La investigación microscópica indicó que las cristalitas son de tipo laminar con un tamaño de partícula de menos de 10 μm . La microscopía de luz polarizada reveló birrefringencia corroborando la naturaleza cristalina del hidrato.

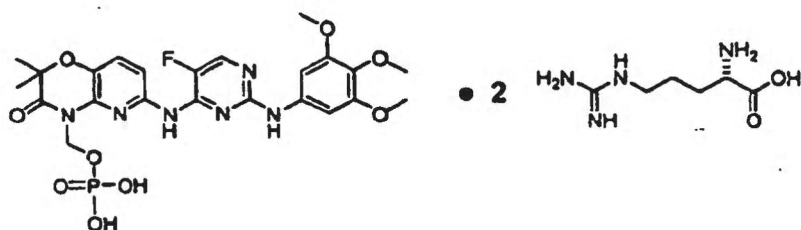
La sal de monosodio se puede preparar a partir de N4-(2,2-dimetil-4-[(dihidrogen-fosfonoxi)metil]-3-oxo-5-pirido[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidindiamina e hidróxido sódico con un control de pH apropiado; un pH de 5-5,5 da como resultado predominantemente la formación de sal de monosodio.

5. Preparación de sal de dipotasio de N4-(2,2-dimetil-4-[(dihidrogen-fosfonoxi)metil]-3-oxo-5-pirido[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidindiamina (no de acuerdo con la invención)



Se calentó una suspensión de complejo de N4-(2,2-dimetil-4-[(dihidrogen-fosfonoxi)metil]-3-oxo-5-pirido[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidindiamina y ácido acético (1,0 g, 1,56 mmol) en agua (15 ml) a 70 °C (temperatura del baño de aceite) durante 10 minutos (pH = 2,9). A la suspensión de agitación anterior, se le añadió gota a gota KOH acuoso (2,1 M, 1,5 ml) y se observó el pH de 5,9. En este punto, se añadió gota a gota KOH acuoso 2,5 M mientras monitorizando mientras el pH. Cuando el pH alcanzó 10,5 (después de 0,95 ml), se detuvo la adición y se agitó la solución transparente a la misma temperatura durante 15 minutos. Se filtró la solución templada en un matraz cónico y se lavó el papel de filtro con agua hasta un volumen combinado de 45 ml. Se transfirió el filtrado sobre una placa caliente y se añadió en porciones isopropanol (175 ml) a la solución caliente, hasta que persistió la turbidez después del calentamiento. Después se añadió gota a gota agua hasta que la solución era clara en su punto de ebullición. Se retiró el matraz cónico de la placa caliente y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se formó un sólido cristalino, que se recogió por filtración con succión, se lavó con una cantidad mínima de isopropanol y se secó durante 30 minutos. Se secó el sólido blanco resultante a vacío durante toda una noche a 70 °C, proporcionando la sal de dipotasio de N4-(2,2-dimetil-4-[(dihidrogen-fosfonoxi)metil]-3-oxo-5-pirido[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidindiamina, (0,95 g, 1,44 mmol, 92 %, 99 % puro). RMN- ^1H (D_2O): δ 7,68 (d, 1H, J = 3,8 Hz), 7,49 (d, 1H, J = 8,8 Hz), 6,87 (d, 1H, J = 8,8 Hz), 6,51 (s, 2H), 5,52 (d, 1H, $J^3_{\text{PH}} = 2,0$ Hz), 3,54 (s, 3H), 3,48 (s, 6H), 1,32 (s, 6H). RMN- P^{31} (D_2O): 2,7

6. Preparación de sal de di-L-arginina de N4-(2,2-dimetil-4-[(dihidrogen-fosfonoxi)metil]-3-oxo-5-pirido[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidindiamina (no de acuerdo con la invención)



5

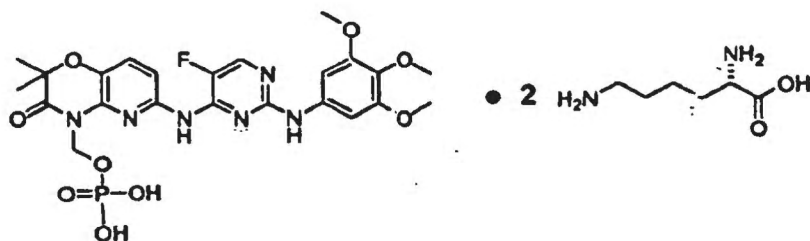
Se calentó una suspensión de N4-(2,2-dimetil-4-[(dihidrogen-fosfonoxi)metil]-3-oxo-5-pirido[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidindiamina (0,25 g, 0,43 mmol) y L-arginina (0,15 g, 0,86 mmol) en EtOH (15 ml) a 90 °C (temperatura del baño de aceite) durante 10 minutos. Se añadió gota a gota agua (7,5 ml) a la suspensión de agitación caliente hasta que volvió a una solución transparente. Después de 1 hora de calentamiento con agitación, se filtró la solución caliente en un matraz Erlenmeyer. El filtrado en el matraz Erlenmeyer se llevó a ebullición sobre una placa caliente, después se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se formó un sólido, que se recogió por filtración por gravedad y se secó a vacío durante toda una noche a 80 °C para formar el hidrato de sal de profármaco (0,28 g, 0,3 mmol, 69 %). RMN-¹H (D₂O): δ 7,64 (d, 1H, J = 3,5 Hz), 7,42 (d, 1H, J = 8,8 Hz), 6,80 (d, 1H, J = 8,8 Hz), 6,45 (s, 2H), 5,53 (d, 1H, J³_{PH} = 2,8 Hz), 3,57 (t, 2H, J = 6,0 Hz), 3,51 (s, 3H), 3,44 (s, 6H), 3,01 (t, 1H, J = 6,5 Hz), 1,74-1,69 (m, 4H), 1,55-1,46 (m, 4H), 1,30 (s, 6H). RMN-P³¹ (D₂O): 2,56.

10

15

7. Preparación de sal de di-L-lisina de N4-(2,2-dimetil-4-[(dihidrogen-fosfonoxi)metil]-3-oxo-5-pirido[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidindiamina (no de acuerdo con la invención)

20



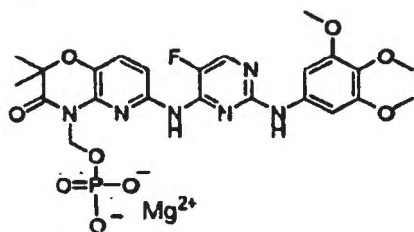
Se calentó una suspensión de N4-(2,2-dimetil-4-[(dihidrogen-fosfonoxi)metil]-3-oxo-5-pirido[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidindiamina (0,25 g, 0,43 mmol) y L-lisina (0,125 g, 0,86 mmol) en EtOH (15 ml) a 90 °C (temperatura del baño de aceite) durante 10 minutos. Se añadió gota a gota agua (4,5 ml) a la suspensión de agitación caliente hasta que formó una solución transparente. Después de 1 h de calentamiento y agitación, la mezcla de reacción se filtró, se enfrió y se concentró a vacío. Se observó precipitación del concentrado bruto después de la adición de EtOH (5 ml). Se agitó el sólido resultante durante toda una noche a temperatura ambiente en t-BuOMe después de la concentración de la mezcla. Se recogió el sólido blanco por filtración por gravedad y se secó a vacío durante toda una noche a 80 °C (0,32 g, 83 %). RMN-¹H (D₂O): δ 7,67 (d, 1H, J = 3,8 Hz), 7,47 (d, 1H, J = 8,8 Hz), 6,84 (d, 1H, J = 8,8 Hz), 6,48 (s, 2H), 5,54 (d, 1H, J³_{PH} = 3,5 Hz), 3,57 (t, 2H, J = 6,0 Hz), 3,51 (s, 3H), 3,44 (s, 6H), 2,86 (t, 1H, J = 6,7 Hz), 1,77-1,70 (m, 4H), 1,62-1,52 (c, ap. 4 H, J, 6,3 Hz), 1,38-1,26 (m, 10H). RMN-P³¹ (D₂O): 2,59.

25

30

35

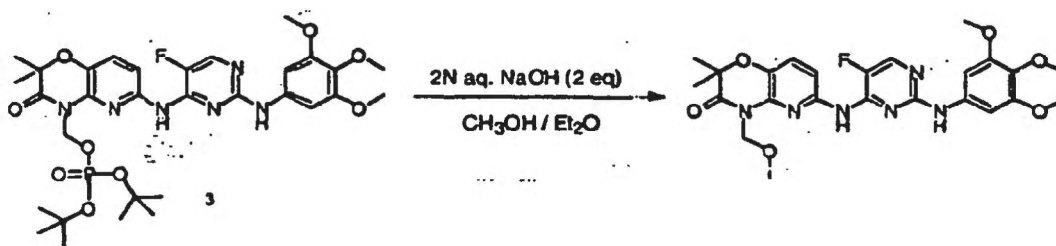
8. Síntesis de sal de monomagnesio de N4-(2,2-dimetil-4-[(dihidrogen-fosfonoxi)metil]-3-oxo-5-pirido[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidindiamina (no de acuerdo con la invención)



40 Se colocó una suspensión de sal de dipotasio de N4-(2,2-dimetil-4-[(dihidrogen-fosfonoxi)metil]-3-oxo-5-

pirido[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidindiamina (0,5 g, 0,76 mmol) en 10 ml de agua en un baño de aceite precalentado a 70 °C y se agitó hasta que la suspensión formó una solución transparente. Se filtró la solución caliente y se lavó el papel de filtro con otros 10 ml de agua. Se calentó el filtrado transparente agitando mientras a 80 °C. Se disolvió MgCl₂ (0,076 g, 0,8 mmol) en agua (10 ml), se filtró en un matraz a través de una columna de filtro (aclorando con 10 ml de agua), y se calentó a 90 °C (pH = 7,52). Se añadió gota a gota la solución de sal de dipotasio precalentada a la solución de MgCl₂ anterior durante 15 min agitando mientras el contenido. La suspensión que forma espuma blanca inicial formada se volvió a un sólido blanco transparente después de calentar el contenido a 80 °C durante 1,5 h (pH = 6,3-6,7). Se recogió el sólido por filtración con succión y se lavó con agua hasta que no se detectó ningún ión cloruro (prueba de AgNO₃). Se secó por succión el sólido durante 2 h, después se secó a vacío a 70 °C durante toda una noche para proporcionar sal de monomagnesio de N4-(2,2-dimetil-4-[(dihidrogen-fosfonoxi)metil]-3-oxo-5-pirido[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidindiamina (0,43 mg, 93 %).

9. Síntesis de compuesto 8 de profármaco (no de acuerdo con la invención)



Se añadió N4-(2,2-dimetil-4-[(di-tert-butil-fosfonoxi)metil]-3-oxo-5-pirido[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidindiamina (preparada como se describe anteriormente) (0,2 g, 0,29 mmol) a una mezcla de MeOH (5 ml) y Et₂O (5 ml). Se añadió NaOH ac. 2 N (0,023 g, 0,58 mmol) de una vez agitando mientras el contenido a temperatura ambiente. Se monitorizó el progreso de la reacción por CL/EM. Después de 8 h de agitación, se filtró el sólido precipitado y se secó para proporcionar N4-(2,2-dimetil-4-metoximetil-3-oxo-5-pirido[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidindiamina (compuesto 8) como un sólido blanco (0,11 g, 74 %). RMN de H¹ (DMSO-d₆): δ 9,47 (s, 1H), 9,15 (s, 1H), 8,16 (d, 1H, J = 3,8 Hz), 7,87 (d, 1H, J = 8,5 Hz), 7,37 (d, 1H, J = 8,5 Hz), 7,03 (s, 2H), 5,40 (s, 2H), 3,66 (s, 6H), 3,59 (s, 3H), 3,27 (s, 3H), 1,44 (s, 6H). CLEM: tiempo de ret.: 12,88 min; pureza: 92 %; EM (m/e): 515 (MH⁺).

10. Los compuestos de 2,4-pirimidindiamina activos son tolerados en animales.

La capacidad de numerosos compuestos de 2,4-pirimidindiamina biológicamente activos de ejercer su actividad a dosis inferiores a las que presentan toxicidad en animales se ha demostrado previamente (véase, por ejemplo, la solicitud de EE.UU. con n° de serie 10/355.543 presentada el 31 de enero de 2003 (documento US 2004/0029902A1), la solicitud internacional con n° de serie PCT/US03/03022 presentada el 31 de enero de 2003 (documento WO 03/063794), la solicitud de EE.UU. con n° de serie 10/631.029 presentada el 29 de julio de 2003 (documento US 2005/0028212), la solicitud internacional con n° de serie PCT/US03/24087 (documento WO 2004/014382), la solicitud de EE.UU. con n° de serie 10/903.263 presentada el 30 de julio de 2004 (documento US2005/0234049) y la solicitud internacional con n° de serie PCT/US2004/24716 (documento WO 2005/016893)).

Se ha estudiado la seguridad farmacológica del compuesto 1 activo en una serie esencial de estudios (respiratorio, SNC, cardiovascular y HERG). Se notó una ligera reducción en el ritmo cardiaco y un incremento en el intervalo de RR a 50 mg/kg en el estudio cardiovascular y también se notó un ligero efecto en algunos de los parámetros de comportamiento a 50 mg/kg en el estudio de SNC (Irwin). Por lo demás, los estudios de seguridad farmacológica determinaron que el compuesto 1 fue bien tolerado. Los estudios de toxicología de GLP incluyeron estudios de mutagenicidad y clastogenicidad negativos (Ames, aberración cromosómica y micronúcleo de ratón). En estudios de toxicidad de 28 días en ratas y monos, las dosis más altas mostraron un efecto reversible en hematología, transaminasa hepática (sólo leve efecto en la rata), tamaño de timo y bazo (sólo rata) y celularidad de médula ósea (rata y mono). El inmunofenotipado en el estudio en ratas reveló una disminución significativa en el porcentaje de células CD3⁺ en ratas con dosis altas, mientras que se notó un incremento en células CD45RA⁺ después de la recuperación. La histopatología fue de interés sólo para reducciones leves en la celularidad de la médula con dosis altas. No hubo evidencia de efectos adversos sobre la inmunidad humoral en la evaluación de anticuerpos anti-KLH. El nivel sin efectos adversos observados (NOAEL) es de 10-30 mg/kg/día para ratas y 100 mg/kg/día para monos.

11. El compuesto 1 de fármaco es biológicamente activo en ensayos *in vitro*

El compuesto 1 bloquea la activación dependiente de FcεRI de mastocitos humanos primarios derivados de sangre del cordón umbilical (CHMC) de un modo dependiente de la dosis con una CE₅₀ de aproximadamente 43 nM como se evaluó midiendo la actividad de triptasa liberada tras la desgranulación. El compuesto 1 no inhibe la

desgranulación inducida por ionomicina de CHMC. La ionomicina es un ionóforo de calcio que induce la desgranulación de CHMC sorteando la señalización de FcR temprana, indicando así que el compuesto **1** es específico para la señalización de FcR y no la desgranulación *per se*. El compuesto **1** también inhibe la producción dependiente de Fc ϵ R1 y la liberación de LTC₄ (CE₅₀ = 39 nM) y de todas las citocinas sometidas a prueba (CE₅₀ varía desde 158 nM - 462 nM).

12. El compuesto 1 de fármaco es eficaz en modelos animales de artritis reumatoide

La actividad biológica del compuesto **1** en edema vascular mediado por CI (reacción de Arthus en la rata), en la artritis inducida por anticuerpos de colágeno en el ratón, y en un modelo de rata de artritis inducida por colágeno.

12.1. Reacción de Arthus

El daño tisular inflamatorio agudo mediado por CI está implicado en muchas enfermedades autoinmunitarias, incluyendo vasculitis, enfermedad del suero, lupus eritematoso sistémico, AR y glomerulonefritis. El modelo experimental clásico para daño tisular mediado por CI es la reacción de Arthus pasiva inversa (RPA). La inyección intravenosa de antígeno (ovoalbúmina, OVA) después de la inyección intradérmica de anticuerpos específicos a OVA (IgG anti-OVA de conejo) da como resultado el depósito perivascular de CI y una respuesta inflamatoria rápida caracterizada por edema, infiltración de neutrófilos y hemorragia en las zonas de inyección (Szalai, *et al.*, 2000, J. Immunol. 164 (1): 463-468).

Un único tratamiento oral de ratas con el compuesto **1** hora antes de la administración de antígeno/anticuerpo redujo la reacción RPA cutánea y el edema inflamatorio de un modo dependiente de la dosis. La administración de 10 mg/kg por vía oral del compuesto **1** inhibió la secreción extravascular de colorante azul de Evans (DO₆₁₀) de biopsias tisulares por un 80 % en comparación con el control de vehículo.

12.2. Artritis inducida por anticuerpos de colágeno

Se evaluó la actividad antiinflamatoria del compuesto **1** en el modelo de artritis inducida por anticuerpos y colágeno de ratón reumatoide (CAIA) en el que se aplica un cóctel de anticuerpos anti-colágeno tipo II para inducir artritis (Teroto *et al.*, 1992, J. Immunol. 148 (7): 2103-2108; McCoy *et al.*, 2002, J. Clin. Invest. 110 (5): 651-658; Kagari *et al.*, 2002, J. Immunol. 169 (3): 1459-1466). Este modelo pasivo difiere de la artritis inducida por colágeno de roedor tradicional (CIA) en la que los síntomas de la enfermedad aparecen rápidamente (desarrollándose en las 24-48 horas después de una inyección iv de anticuerpos), la artritis es inducible en cepas de ratón tanto susceptibles a CIA como resistentes a CIA y permite una evaluación de la inflamación que es independiente de la producción de anticuerpos.

Se indujo CAIA en ratones Balb/C por inyección intravenosa de mezcla de anticuerpos monoclonales Arthrogen-CIA[®] (Chemicon International, Inc., Temecula, CA) por medio de la vena de la cola, seguido 2 días más tarde por una inyección intraperitoneal de LPS. Se inició el tratamiento de compuesto **1** por vía oral en las 4 horas de la administración de anticuerpo (día 0). Se puntuó diariamente la gravedad de la artritis en las patas traseras (escala de 0-4 por pata, suma de puntuaciones para ambas patas traseras). En el día 5, ambos grupos de control, solución salina y vehículo, alcanzaron su puntuación clínica máxima con una incidencia de enfermedad del 100 %.

La reducción en la inflamación y la hinchazón fue evidente en animales tratados con el compuesto **1** y la artritis avanzó más lentamente. El tratamiento con el compuesto **1** (dos veces al día) redujo significativamente la artritis ($p < 0,05$) en comparación con los animales tratados sólo con vehículo, mientras que los niveles de dosis más baja del compuesto **1** mostraron una tendencia hacia la reducción en la gravedad de la artritis, incidencia de la enfermedad y tiempo de inicio; sin embargo, las diferencias no fueron significativas ($p > 0,05$).

12.3. Artritis inducida por colágeno

Uno de los modelos experimentales para daño tisular mediado por CI es el CIA en roedores (Kleinau *et al.*, 2000, J. Exp. Med. 191:1611-1616). La inyección de colágeno de tipo II (CII) en roedores produce una reacción inmunitaria que implica característicamente la destrucción inflamatoria de cartílago y hueso de las articulaciones distales con hinchazón concomitante de los tejidos circundantes. Comúnmente, CIA se usa en ratas para evaluar compuestos que pueden ser de un uso potencial como fármacos para el tratamiento de artritis reumatoide y otras afecciones inflamatorias crónicas y se induce en cepas susceptibles de ratones o bien de ratas por inyección de CII en coadyuvante de Freund incompleto (IFA). La administración de esta emulsión da lugar a poliartritis, caracterizada por hiperplasia sinovial, infiltración de células mononucleares, formación de paño y destrucción de cartílago y hueso. Se ha documentado bien previamente que los anticuerpos para CII son un prerrequisito para CIA en ratones, ya que los ratones deficientes en linfocitos B no desarrollan artritis (Svensson *et al.*, 1998, Clin. Exp. Immunol. 111:521-526).

Se inmunizaron ratas LOU singénicas el día 0 con CII/IFA natural de pollo. El tratamiento por vía oral comenzó con la aparición de síntomas de artritis (día 10). Se trataron un total de 59 ratas tanto con un control de vehículo como con el compuesto **1** en uno de cuatro niveles de dosis (1, 3, 10 y 30 mg/kg, administrado una vez al día mediante

sonda p.o.). Se puntuaron diariamente las extremidades traseras para determinar la gravedad de la artritis clínica usando un método normalizado basado en el grado de inflamación de las articulaciones. Se obtuvieron radiografías digitales de alta resolución de las extremidades traseras a la conclusión del estudio (día 28). También se analizaron estas extremidades para determinar cambios histopatológicos. Se midieron los anticuerpos de IgG para CII natural por cuadruplicado por ELISA. Se observó una reducción significativa ($p < 0,05$) en la gravedad de la artritis que era evidente en los 7 días después de comenzar el tratamiento en el grupo de dosis alta (30 mg/kg) grupo que continuó mejorando a lo largo del estudio. En el día 28, la puntuación clínica en los animales tratados sólo con vehículo fue de $6,08 \pm 0,67$ en comparación con $2,54 \pm 0,98$ en el grupo de 30 mg/kg del compuesto **1** ($p < 0,001$). Las radiografías ciegas a la conclusión del estudio (día 28), demostraron una reducción significativa del daño articular: $3,66 \pm 0,71$ (vehículo) frente a $1,63 \pm 0,67$ (compuesto **1**) ($p < 0,02$) (P. Brahn. 2004). Los estudios histopatológicos ciegos confirmaron la regresión del paño y las erosiones: Las puntuaciones de Mankin modificadas promedio fueron de $11,8 \pm 0,9$ (vehículo) frente a $3,7 \pm 0,9$ (30 mg/kg de compuesto **1**) ($p < 0,001$). Los anticuerpos para CII natural no disminuyeron en ratas tratadas con el compuesto **1**.

15 **13. Los compuestos de profármaco están biodisponibles por vía oral**

Se sometió a prueba el compuesto **4** de profármaco para determinar su biodisponibilidad oral. Para el estudio, se disolvió el profármaco en diversos vehículos (por ejemplo, solución de PEG 400 y suspensión de CMC) para la dosificación intravenosa y oral en las ratas. Cuando así se indicó, el compuesto de metabolito activo compuesto **1** (fármaco), se formuló y se administró en los mismos vehículos. Después de la administración del fármaco y/o fármaco, se obtuvieron y se extrajeron muestras de plasma. Se determinaron las concentraciones plasmáticas del profármaco y/o fármaco por métodos de cromatografía líquida de alta resolución/espectrometría de masas en tándem (CL/EM/EM). Se llevaron a cabo análisis farmacocinéticos basados en datos de concentración plasmática. Los parámetros farmacocinéticos de interés incluyen eliminación (CL), Volumen de distribución en el estado estacionario (Vss), vida media terminal ($t_{1/2}$) y biodisponibilidad oral (%F).

Los resultados de estos diversos experimentos farmacocinéticos se ilustran en las figuras 4-12.

En referencia a la figura 4, los perfiles FC se muestran para la administración iv y p.o. en ratas Sprague-Dawley. Para administración iv, se disolvió el compuesto **4** en PEG-400 y se administró a una dosis de 1 mg/kg. Se observó una desaparición rápida del compuesto **4** de profármaco y se encontró compuesto **1** de profármaco en muestras de plasma obtenidas de la vena yugular. Al administrar por vía oral en el mismo vehículo, no se presentó compuesto **4** de profármaco sistémicamente, pero se observaron altos niveles de compuesto **1** de metabolito de fármaco.

La figura 5 resume los parámetros **FC** para el estudio descrito en la figura 4. El compuesto **4** de profármaco se elimina rápidamente y, en parte, se convierte al compuesto **1** de fármaco. Al administrar por vía oral a una dosis de 4 mg/kg, se determinó que la biodisponibilidad fue de un 29,9 %. Este número de biodisponibilidad se basa en datos obtenidos a partir de un estudio previo (datos no mostrados) en el que se administró el compuesto **1** de fármaco como una dosis de bolo iv a 1 mg/kg.

La figura 6 compara la exposición al compuesto **1** de fármaco en ratas Sprague-Dawley después de la administración oral del compuesto **1** de fármaco (2,5 mg/kg en PEG-400) o bien del compuesto **4** de profármaco (4 mg/kg en PEG-400). Los valores para AUC/dosis son casi idénticos, lo que indica que el compuesto **4** de profármaco se absorbe igualmente, así como el compuesto **1**.

La figura 7 muestra una representación de cLogD frente a pH calculada usando predicciones in-situ tanto para el compuesto **1** como el compuesto **4**. El compuesto **1** es altamente lipófilo y sólo débilmente ionizable (la solubilidad medida es menor de 1 microgramo/ml en tampón fosfato a pH = 7,5, datos no mostrados). En cambio, el compuesto **4** es altamente polar a pH neutro. Los valores de solubilidad medidos son consistentes con los valores de cLogD predichos a pH = 7,5.

La figura 8 demuestra que el compuesto **4** de profármaco es estable bajo condiciones ácidas y neutras a 37 °C.

La figura 9 ilustra la conversión del compuesto **4** de profármaco al compuesto **1** de fármaco en preparaciones de microsomas. El compuesto **4** de profármaco no se convierte al compuesto **1** de fármaco en preparaciones microsomales obtenidas por Xenotech. En estudios de seguimiento usando microsomas intestinales y hepáticos obtenidos de una fuente diferente, se observó conversión del compuesto **4** al compuesto **1** (datos no mostrados).

La figura 10 ilustra que ese compuesto **4** de profármaco es inestable en plasma de ratas, se observa hidrólisis para el compuesto **1** de fármaco y se cree que la conversión del compuesto **1** está catalizada por enzimas de la fosfatasa. Se confirmó la presencia de actividad de fosfatasas en plasma de rata usando p-nitrofenil fosfato (un sustrato de fosfatasa conocido).

La figura 11 ilustra la absorción de compuesto **4** de profármaco de vehículos diferentes. A diferencia del compuesto **1** de fármaco, la absorción del compuesto **4** de profármaco no es dependiente de la formulación. El compuesto **4** de profármaco se absorbe igualmente bien en formulaciones de solución (PEG-400 al y carboximetilcelulosa (CMC)) y

en polvo en cápsulas de gelatina dura.

En base a los datos farmacocinéticos, se determinó que la biodisponibilidad oral (% F) del compuesto **4** de profármaco de los tres vehículos sometidos a prueba (solución PEG-400; solución de CMC; y polvo en cápsulas) fue aproximadamente de un 30 %.

14. Los hidratos de sal de profármaco son estables

Se sometió el hidrato de sal de profármaco **32** se análisis térmico, análisis de sorción de humedad y análisis de difracción en polvo de rayos X (XRPD) para determinar su estabilidad y cristalinidad.

Se obtuvieron termogramas de calorimetría de barrido diferencial (DSC) usando un DSC Q 100 (TA Instruments, New Castle, DE). Se calibraron el eje de temperatura y la constante de la célula de la célula de DSC con indio (10 mg, 99,9 % puro, punto de fusión 156,6 °C, calor de fusión 28,4 J/g). Se pesaron las muestras (2,0 - 5,0 mg) en cubetas de aluminio en una balanza analítica. Se usaron cubetas de aluminio sin las tapas para el análisis. Se equilibraron las muestras a 25 °C y se calentó a 250 - 300 °C a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min bajo flujo de nitrógeno continuo. Se realizó el análisis termogravimétrico (TGA) de las muestras con Q 50 (TA Instruments, New Castle, DE). Se analizaron las muestras (2,0 a 5,0 mg) en cubetas de aluminio abiertas bajo un flujo de nitrógeno (50 ml/min) a de 25 °C a 210 °C con una tasa de calentamiento de 10 °C/min.

Se dejó secar la muestra para análisis de humedad a 25 °C durante 4 horas bajo una corriente de nitrógeno seco. Después, se incrementó gradualmente la humedad relativa desde un 10 hasta un 90 % de humedad relativa (análisis de adsorción) permitiendo que la muestra se equilibre durante un máximo de cuatro horas antes de pesarla y moverla a la siguiente etapa. Se midió el análisis de desorción desde un 85 hasta un 0 % de humedad relativa con el mismo tiempo de equilibrado. Después, se secó la muestra a 80 °C durante 2 horas o hasta que no se observó pérdida de peso bajo una corriente de nitrógeno seco.

Se recogieron los datos de difracción de rayos X en polvo usando un sistema de XRD de mesa Miniflex (Rigaku/MSK, The Woodlands, TX) de 5° a 45° 2 θ con etapas de 0,1° y el tiempo de medición fue de 1,0 segundo/etapa. Se molieron todas las muestras hasta un tamaño similar antes de la exposición a la radiación. Se iluminaron las muestras en polvo usando radiación CuK α ($\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$) a 30 kV y 15 mA.

Se recogieron los datos de XRPD a temperatura variable usando una cámara Guinier 670 con placas de imagen de Huber empleando radiación de CuK α_1 filtrada con Ni ($\lambda = 1,5405981 \text{ \AA}$) producida a 40 kV y 20 mA por un generador PW 1120/00 de Philips provisto con un tubo PW2273/20 con enfoque de precisión largo de Huber y un monocromador Guinier de Huber de la serie 611/15. Se empaquetó el polvo original en un capilar Lindemann (Hilgenberg, Alemania) con un diámetro interno de 1 mm y un espesor de pared de 0,01 mm. Se calentó la muestra a una tasa promedio de 5 Kmin⁻¹ usando una unidad controladora de temperatura elevada HTC 9634 de Huber con el dispositivo de rotación capilar 670,2. Se mantuvo constante la temperatura en intervalos seleccionados durante 10 minutos mientras se expuso la muestra a rayos X y se registraron varias imágenes. Se usó un intervalo de 2 θ de 4,00 - 100,0° con un tamaño de etapa de 0,005° 2 θ .

La figura 12 presenta los termogramas de DSC y TGA de una muestra de hidrato de sal de profármaco **32**. El termograma de DSC revela tres transiciones endotérmicas: un pico inicial con una temperatura de inicio de 42,98 \pm 2,01 °C y una temperatura de pico de 70,26 \pm 1,78 °C, seguida inmediatamente de otra endoterma con un inicio de 90,33 \pm 3,21 °C y un pico a 106,19 \pm 2,89 °C. El valor de la entalpía asociada con la primera transición es de 209,70 \pm 12,34 J/g, mientras que la segunda transición requiere aproximadamente 67,24 \pm 4,56 J/g. De acuerdo con las transiciones de DSC, los análisis de TGA indican tres fases distintas de cambio de peso. Durante la primera etapa, la muestra pierde un 9,64 \pm 0,18 % de masa, seguido de un cambio sutil en la pendiente que conlleva otra pérdida de peso de un 5,13 \pm 0,11 %. Por tanto, la muestra pierde un total de aproximadamente 14,74 \pm 0,14 % hasta una temperatura de 150 °C. Estos resultados están en consonancia con los datos de valoración de Karl Fisher que indican que el contenido en agua de la muestra es aproximadamente de un 14,82 \pm 0,17 %, correspondiente a 6 moles de agua por mol de sal de profármaco. Por tanto, las dos primeras transiciones en el perfil térmico de la sal de profármaco **32** de deben a la deshidratación de la muestra. La transición de DSC final se inicia a 206,54 \pm 4,63 °C y un máximo de pico a 223,35 \pm 2,27 °C y una entalpía de 35,26 \pm 5,44 J/g y se cree que se debe a la fusión. El TGA indica una pérdida de peso durante esta transición, que se atribuye a la pérdida de masa debido a la descomposición de la muestra.

El perfil de sorción de humedad de una muestra de hidrato de sal de profármaco **32**, mostrada en la fig. 13, demuestra que la forma hexahidrato es estable en un amplio intervalo de humedades relativas. Cuando se seca la muestra a temperatura ambiente y con una humedad relativa aproximadamente de un 0 %, la muestra tiende a perder la mayoría de su contenido en humedad. Como se observa en la figura 13, el contenido en humedad de la muestra es aproximadamente de un 4,0 % bajo condiciones secas. Esto indica que se pierden aproximadamente 4 moléculas de agua por sal de profármaco **32** en esta baja humedad. Sin embargo, tan pronto como se incrementa la humedad, la muestra recobra todas sus moléculas de agua y vuelve a un contenido en agua de aproximadamente

un 14,0 %. En particular, este cambio de agua desde un 4,0 hasta un 14,0 % se produce en un intervalo muy estrecho (0-10 %) de humedades relativas. En comparación con el cambios producido en este intervalo de humedad estrecho, el cambio en el contenido en humedad sobre de un 10,0 a un 95,0 % de humedad relativa es relativamente pequeño.

5 Sin pretender vincularse a ninguna explicación particular, los inventores suponen que se puede explicar este comportamiento por el comportamiento de un sistema solvato - desolvato isomorfo. A baja humedad, la muestra pierde la mayoría de las moléculas de agua, aún retiene el orden tridimensional de la red cristalina. La red no reordenada, deshidratada permanece sumamente higroscópica y resorbe agua tan pronto como se incrementa la
10 humedad. Una vez se han recuperado las moléculas de agua, la red se vuelve estable, y no se observan cambios adicionales en la hidratación.

15 La figura 14 presenta el patrón de XRPD de una muestra de sal de profármaco **32**. Como es evidente del patrón, la muestra tiene una estructura cristalina bien definida y un alto grado de cristalinidad. Los datos de XRPD se resumen en las tablas 1 y 2, a continuación.

Tabla 1. Informe de búsqueda de picos (39 picos, P/N máx. = 37,3)

Tabla 1	
Fuente de rayos X	
Fuente	Cu
Filtro	Ni
kV	30
mA	15
K α 1 (Å)	1,54059
análisis	3 a 45
tasa de análisis	2,00/min
Método	continuo
Recuento	cps

20 **Tabla 2.** Patrón de XRPD de sal de profármaco **32** (PICO: 47-pts/filtro parabólico, Umbral = 3,0, Límite = 0,1 %, BG = 3/1,0, Parte superior del pico= Cumbre)

Tabla 2					
2-Theta	d (Å)	Altura	H %	FWHM	XS (Å)
3,380	26,1226	3315	56,7	0,198	3488
6,620	13,3412	1468	25,1	0,225	982
9,890	8,9360	1547	26,5	0,218	953
11,750	7,5252	1192	20,4	0,292	443
12,350	7,1610	813	13,9	0,268	517
13,150	6,7273	5846	100,0	0,362	305
13,510	6,5489	823	14,1	0,421	244
15,020	5,8938	423	7,2	0,343	326
15,710	5,6365	186	3,2	0,163	3043
16,421	5,3940	997	17,0	0,253	545
17,190	5,1543	1696	29,0	0,257	518
17,661	5,0177	113	1,9	0,110	>5000
18,060	4,9079	206	3,5	0,216	743
18,600	4,7667	849	14,5	0,225	665
19,730	4,4960	2948	50,4	0,277	440

21,240	4,1797	1745	29,8	0,419	237
21,750	4,0828	1479	25,3	0,308	362
22,479	3,9521	100	1,7	0,138	>5000
23,400	3,7985	458	7,8	0,323	334
24,237	3,6692	123	2,1	0,240	533
25,280	3,5201	1053	18,0	0,613	148
25,840	3,4451	1502	25,7	0,723	123
27,150	3,2818	1037	17,7	0,508	183
27,510	3,2397	1563	26,7	0,477	198
28,640	3,1143	644	11,0	0,269	423
29,470	3,0285	931	15,9	0,331	313
30,531	2,9256	308	5,3	0,262	436
31,640	2,8256	1761	30,1	0,412	235
33,650	2,6613	549	9,4	0,472	199
34,110	2,6264	670	11,5	0,603	150
34,990	2,5623	140	2,4	0,051	>5000
36,379	2,4676	248	4,2	202	202
37,251	2,4119	494	8,5	0,393	248
38,540	2,3341	337	5,8	0,411	235
39,030	2,3059	519	8,9	0,582	157
39,631	2,2723	172	2,9	0,210	576
40,650	2,2177	306	5,2	0,198	634
41,640	2,1672	767	13,1	0,517	180
43,482	2,0796	155	2,6	0,531	175

5 Los datos de XRPD de temperatura variable, mostrados en la fig. 15, proporcionan pruebas adicionales de la existencia de un sistema solvato - desolvato isomorfo. Como es evidente en la figura 15, los patrones de polvo obtenidos a 25 °C y 60 °C son sustancialmente idénticos. A partir del análisis térmico descrito anteriormente, se sabe que la muestra comienza a deshidratarse ya a 40 °C y a picos alrededor de 70 °C para perder 4 de sus 6 moléculas de agua. La XRPD no indica ningún cambio estructural a 60 °C, lo que sugiere que la pérdida de moléculas de agua no debe cambiar el orden tridimensional de la red cristalina. Se notan cambios estructurales en la muestra mientras la temperatura asciende hasta aproximadamente 110 °C. Como demuestran los datos térmicos, casi todas las moléculas de agua se pierden en torno a esta temperatura. Esto sugiere que una vez se pierden todas las moléculas de agua, el cristal sufre una reordenación estructural. Como se sugiere por la pérdida de picos en la XRPD, mientras se incrementa la temperatura la red cristalina se colapsa, y el material finalmente se descompone.

15 Se realizó una difracción de rayos X en un único cristal de hidrato de sal de profármaco 32, e indicó que el cristal de la invención contiene sustancialmente nada de metanol y seis moléculas de agua por molécula de profármaco. Los parámetros de celda unitaria cristalina determinados experimentalmente y los parámetros recogida de datos para el hidrato de sal de profármaco 32 se resumen en la tabla 3.

Tabla 3. Datos de difracción de rayos X de un único cristal para el hidrato de sal de profármaco 32

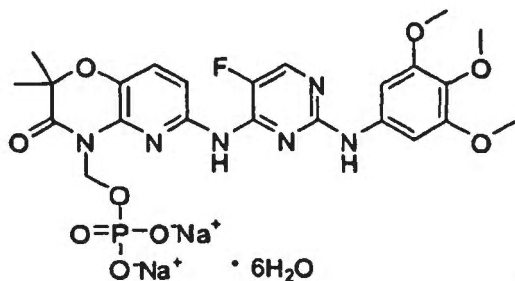
Tabla 3	
Datos de cristal	
Fórmula	C23 H36 F N6 Na2 O15 P
Peso de la fórmula	732,53
Sistema de cristal	Monoclínico
Grupo espacial	P2 ₁ /c (nº 14)

a (Å)	27,7282(5)
b (Å)	7,9776(1)
c (Å)	15,1739(3)
alpha (°)	90
beta (°)	103,206(1)
gamma (°)	90
v (Å ³)	3267,8(1)
Z	4
D (Calc.) [g/cm ³]	1,485
μ (MoKalpha) [1/mm]	0,194
F(000)	1528
Tamaño del cristal [mm]	0,80 x 0,15 x 0,02
Recogida de datos	
Temperatura (K)	113
Radiación (Å)	MoKalpha 0,71073
Theta Min-Max [Dep]	3,4, 27,8
Conjunto de datos	-36: 36; -10: 10; -19: 19
Tot., datos un., R (int.)	26192, 7582, 0,089
Datos observados [1 > 2,0 sigma(1)]	4452
Refinado	
Nref, Npar	7582, 474
R, wR2, S	0,0514, 0,1312, 1,06
$w = 1/[\sigma^2(F_o^2) + (0,0587P)^2 + 0,9541 P]$	donde $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$
Cambio máx. y prom./Error	< 0,001, < 0,001
Dens. res. mín. y máx.. [e/Å ³]	-0,52, 1,27

5 El comportamiento del hidrato de sal de profármaco 32 indica que se puede esperar que tenga una estabilidad a largo plazo durante el almacenamiento larga. La forma hexahidrato es estable en un amplio intervalo de humedades relativas, y requiere un calentamiento sustancial (por ejemplo, mayor de 40 °C) para comenzar a perder moléculas de agua incluidas. La humedad alta no afecta al hexahidrato; una humedad sumamente baja (es decir, menos de un 10 % de HR) puede provocar la deshidratación del hexahidrato, pero la reexposición a condiciones genera la reformación del hexahidrato. La ausencia de cambios estructurales observados bajo condiciones de baja humedad, y calentando hasta 110 °C, permite que la pérdida de agua sea reversible después del enfriamiento. Adicionalmente, 10 el hidrato de sal de profármaco 32 tiene una solubilidad incrementada (10 mg/ml de agua) con respecto al profármaco 4 de fosfato original y a la sal de calcio, sal de profármaco 6 (15 µg/ml de agua).

REIVINDICACIONES

1. Un cristal que comprende un hidrato de sal de profármaco que tiene la estructura:

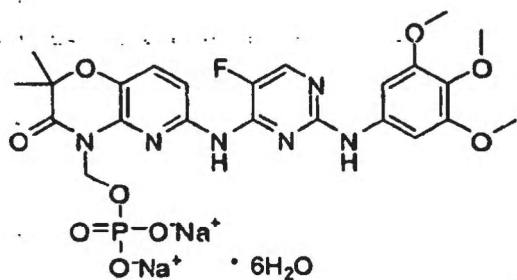


5

teniendo dicho cristal picos de difracción de rayos X en polvo característicos a valores de dos theta de $3,4^\circ \pm 0,1^\circ$, $6,6^\circ \pm 0,1^\circ$, $9,9^\circ \pm 0,1^\circ$, $13,2^\circ \pm 0,1^\circ$, $17,2^\circ \pm 0,1^\circ$, $19,7^\circ \pm 0,1^\circ$, $21,2^\circ \pm 0,1^\circ$ y $21,8^\circ \pm 0,1^\circ$ cuando se usa una longitud de onda de radiación de $1,54059 \text{ \AA}$.

10

2. Un cristal que comprende un hidrato de sal de profármaco que tiene la estructura:



15 teniendo dicho cristal simetría espacial de grupo $P2_1/c$ y parámetros de celda unitaria característicos de $a = 27,73 \text{ \AA}$; $b = 7,98 \text{ \AA}$; $c = 15,17 \text{ \AA}$; $\alpha = 90^\circ$; $\beta = 103,2^\circ$; y $\gamma = 90^\circ$.

3. Una composición farmacéutica que comprende el hidrato de sal de profármaco de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2 y un vehículo, excipiente y/o diluyente farmacéuticamente aceptable.

20

4. Un cristal de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 3, para su uso en un método de inhibición de la desgranulación de células en un sujeto.

25 5. El cristal o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la desgranulación de células se asocia con una enfermedad seleccionada de una enfermedad alérgica, cicatrización de bajo grado, una enfermedad asociada con destrucción de tejidos, una enfermedad asociada con inflamación de tejidos, inflamación y cicatrización.

30 6. El cristal o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la desgranulación de células se asocia con artritis reumatoide.

7. Un cristal de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 3, para su uso en un método de inhibición de una actividad de una cinasa Syk en un sujeto.

35 8. Un cristal de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 3, para su uso en un método de inhibición de una cascada de transducción de señales receptor de Fc en un sujeto, opcionalmente en la que el receptor de Fc se selecciona del grupo que consiste en $\text{Fc}\alpha\text{RI}$, $\text{Fc}\gamma\text{RI}$, $\text{Fc}\gamma\text{RIII}$ y $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$.

40 9. Un cristal de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 3, para su uso en un método de tratamiento o prevención de una enfermedad autoinmunitaria en un sujeto y/o uno o más síntomas asociados con la misma.

10. El cristal o la composición de la reivindicación 9, en el que la enfermedad autoinmunitaria se selecciona del grupo que consiste en tiroiditis de Hashimoto, anemia hemolítica autoinmunitaria, gastritis atrófica autoinmunitaria de

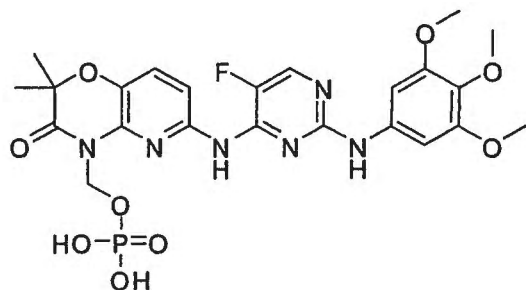
anemia perniciosa, encefalomiелitis autoinmunitaria, orquitis autoinmunitaria, enfermedad de Goodpasture, trombocitopenia autoinmunitaria, oftalmia simpática, miastenia gravis, enfermedad de Graves, cirrosis biliar primaria, hepatitis crónica activa, colitis ulcerosa, glomerulopatía membranosa, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, síndrome de Sjögren, síndrome de Reiter, polimiositis-dermatomiositis, esclerosis sistémica, poliarteritis nodosa, esclerosis múltiple y penfigoide ampolloso.

5 11. Un cristal de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 3, para su uso en un método de tratamiento de artritis reumatoide en un sujeto.

10 12. El cristal o la composición de la reivindicación 11, en el que la cantidad del cristal o de la composición farmacéutica administrada en el método es eficaz para lograr una concentración sérica del fármaco correspondiente con el hidrato de sal de profármaco que sea de o superior a la CI_{50} de inhibición de Syk del fármaco, medida en un ensayo *in vitro*.

15 13. Un método para la preparación del hidrato de sal de profármaco de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, comprendiendo el método:

ajustar el pH de una solución acuosa del profármaco



20 hasta un valor en el intervalo de aproximadamente 8 a aproximadamente 11 con una base que contiene $[Na^+]$; y precipitar el hidrato de sal de profármaco a partir de la solución acuosa.

25 14. El método de la reivindicación 13, en el que:

(a) el pH se ajusta a un valor en el intervalo de aproximadamente 9 a 11, opcionalmente a un valor en el intervalo de aproximadamente 9,3 a aproximadamente 10,5;

30 (b) la base que contiene $[Na^+]$ es NaOH, NaOMe o Na_2CO_3 ;

c) la precipitación del hidrato de sal de profármaco de la solución comprende añadir un disolvente miscible con agua a la solución acuosa, opcionalmente

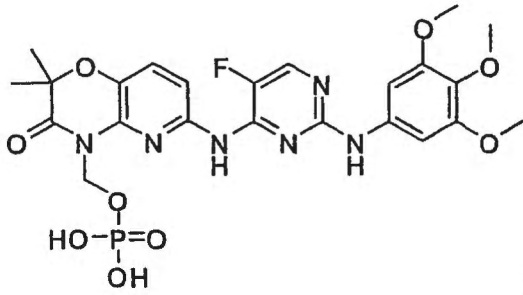
35 (i) en el que el disolvente miscible con agua se selecciona del grupo que consiste en acetonitrilo, acetona, isopropanol, metanol, etanol y mezclas de los mismos; o

40 ii) en el que la solución acuosa se calienta antes de añadir el disolvente miscible con agua, después de añadir el disolvente miscible con agua, o tanto antes como después de añadir el disolvente miscible con agua, después se deja enfriar para que precipite el hidrato de sal de profármaco; o

(d) el método comprende además aislar el hidrato de sal de profármaco de la solución acuosa.

45 15. Un método para la preparación de una forma cristalina del hidrato de sal de profármaco de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, comprendiendo el método:

(a) ajustar el pH de una solución acuosa del profármaco



a un valor en el intervalo de aproximadamente 9 a aproximadamente 11 con una base que contiene $[\text{Na}^+]$;

5 (b) precipitar una sal de profármaco a partir de la solución acuosa; y

(c) exponer la sal de profármaco a la humedad, proporcionando la forma cristalina del hidrato de sal de profármaco, opcionalmente, en el que el método comprende además:

10 (i) antes de (b), 1) añadir un disolvente miscible con agua a la solución acuosa, y 2) calentar la solución acuosa, antes de añadir el disolvente miscible en agua, después de añadir el disolvente miscible con agua o antes y después de añadir el disolvente miscible con agua;

15 (ii) realizar (b) mediante el enfriamiento de la solución acuosa; y

(iii) antes de (c), 1) lavar la sal de profármaco con un disolvente de lavado, y 2) retirar, sustancialmente, todo el disolvente de lavado.

FIG. 1A

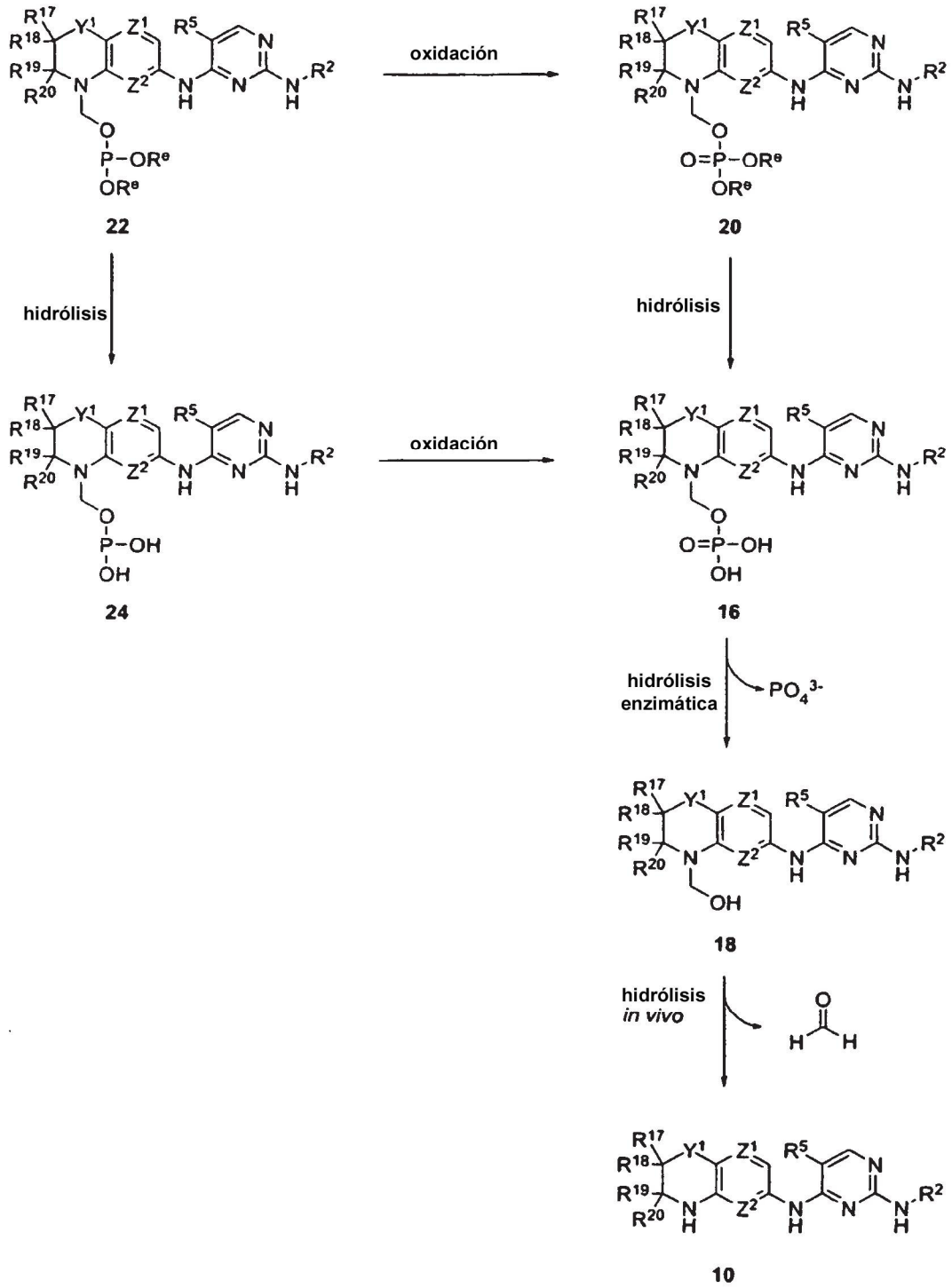


FIG. 1B

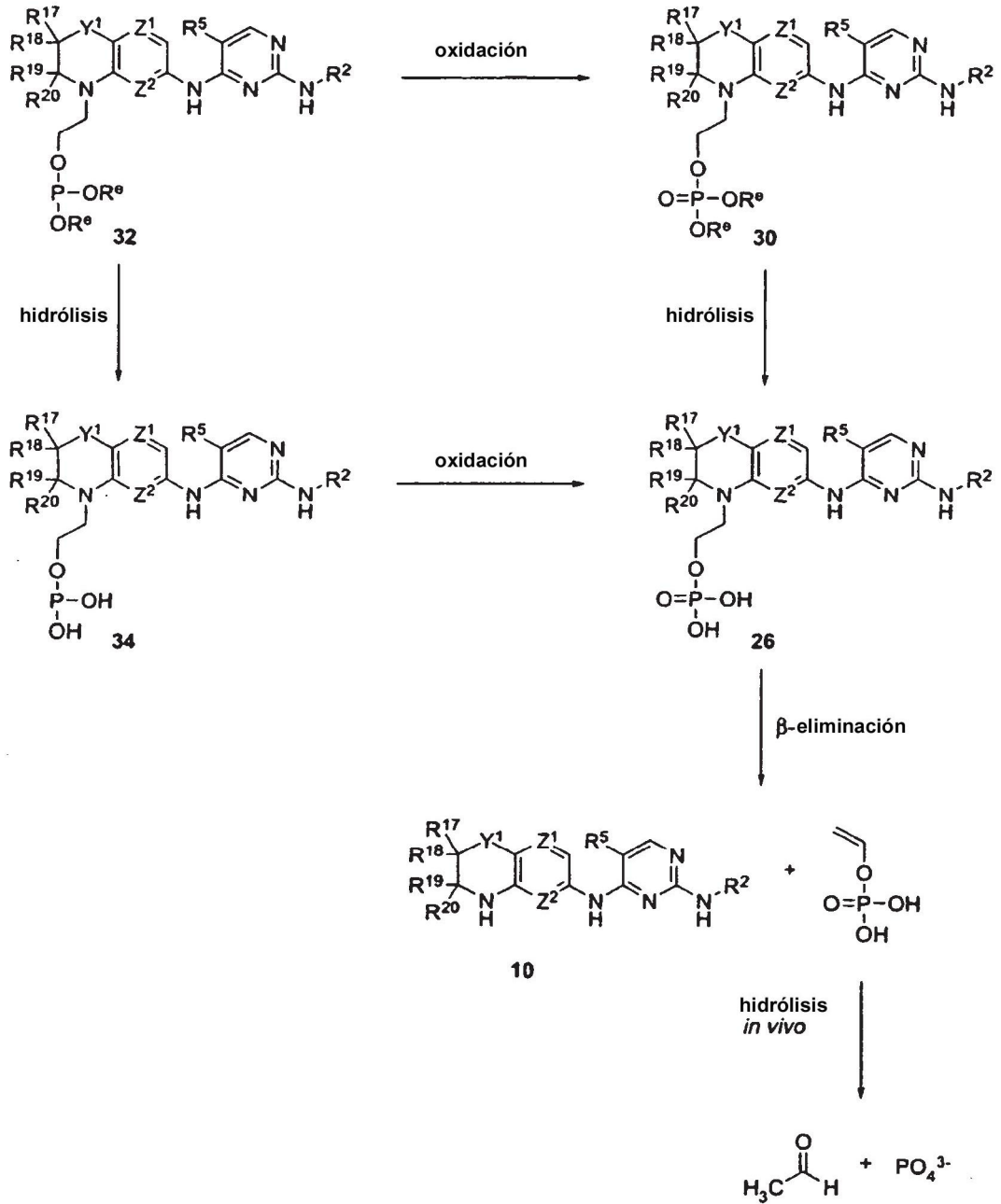


FIG. 3

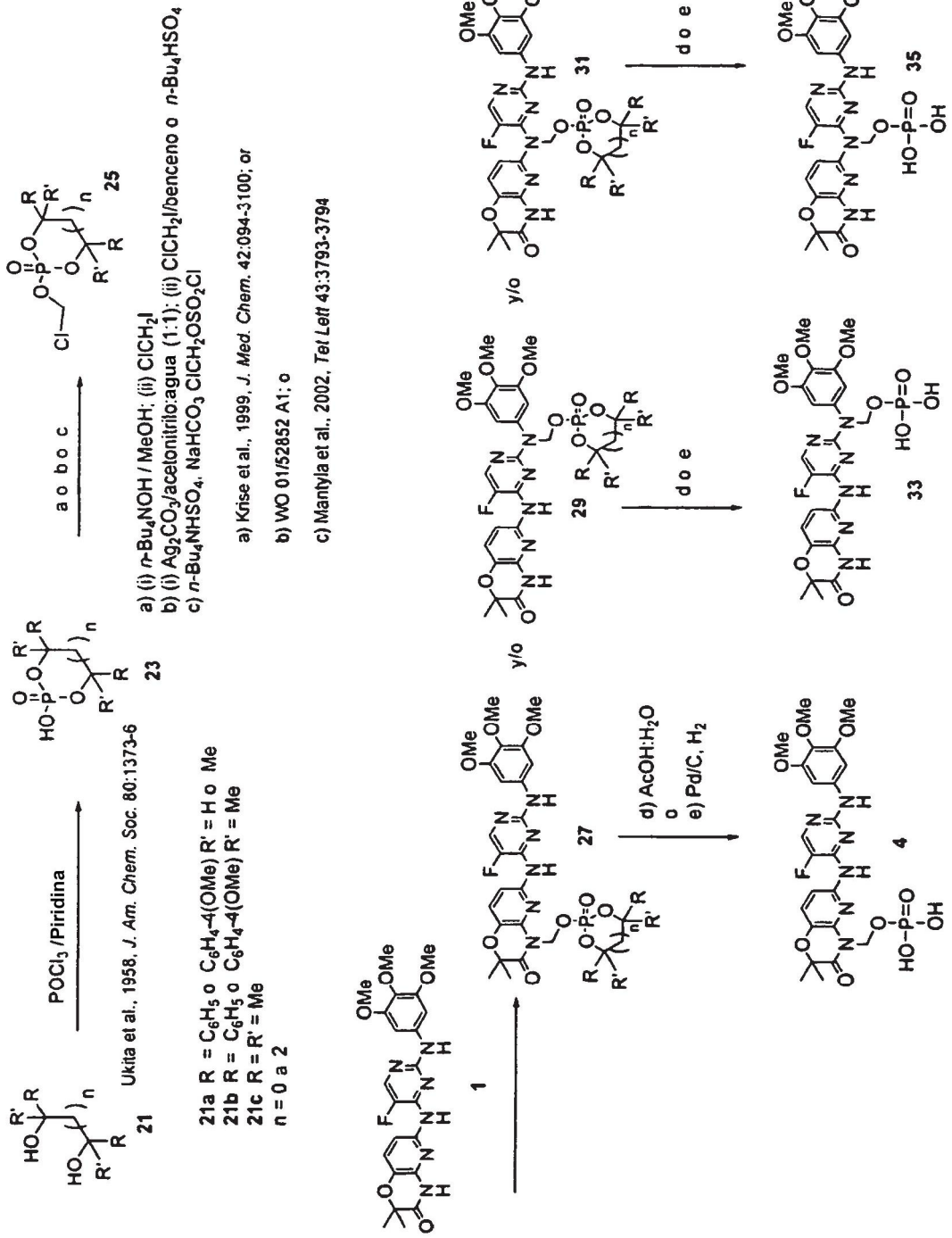


FIG. 4
Perfiles FC de rata para el compuesto 4 de profármaco

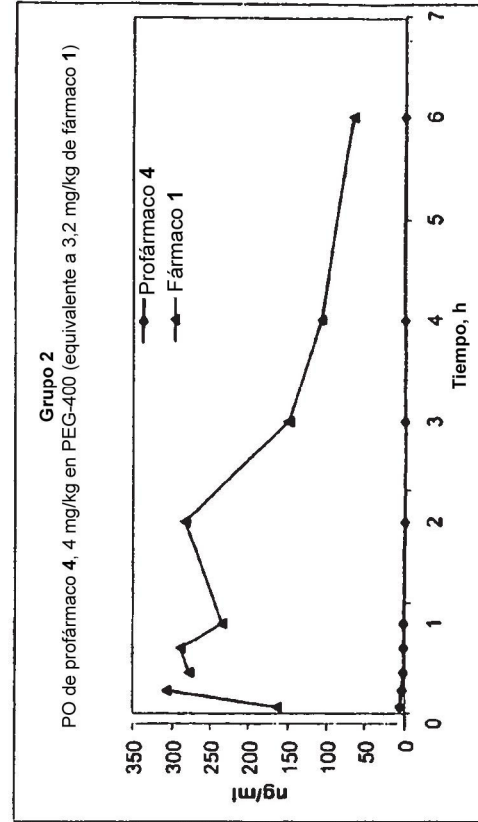
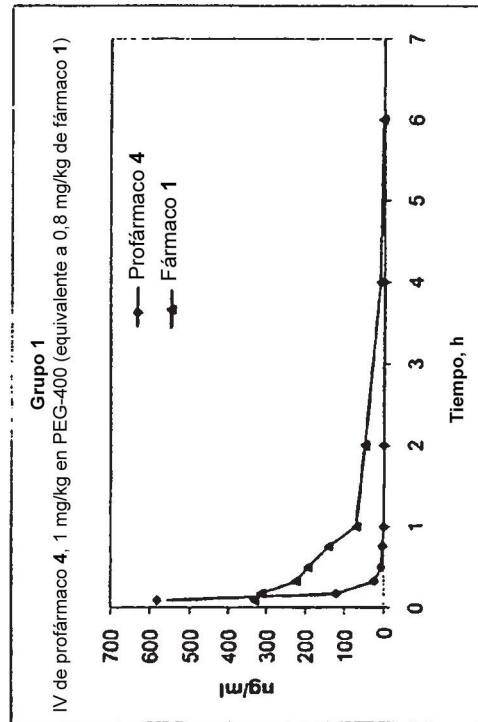
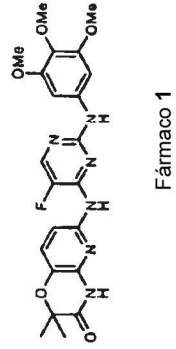
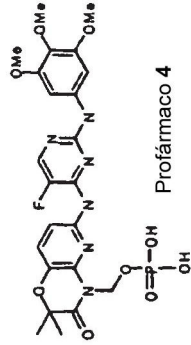


FIG. 5

Resumen FC

Modo de administración	Analito	Parámetro	Valor	Comentarios
IV	Profármaco 4	Eliminación, ml/min/kg	93,1	AUC de 4 = 182 AUC de 1 = 327
		T1/2, h	0,2	
PO	Fármaco 1	%F	29,9	Total absorbido y convertido en Fármaco 1
		Cmáx, ng/ml	331	
	Profármaco 4	%F	0,3	
		Cmáx, ng/ml	5,23	

FIG. 6
 Comparación de exposición a fármaco - Profármaco 4 frente a fármaco 1 en PEG-400

Compuesto	Dosis (fármaco 1, mg/kg)	AUC/dosis
Fármaco 1	2,5	345
Profármaco 4	3,2	316

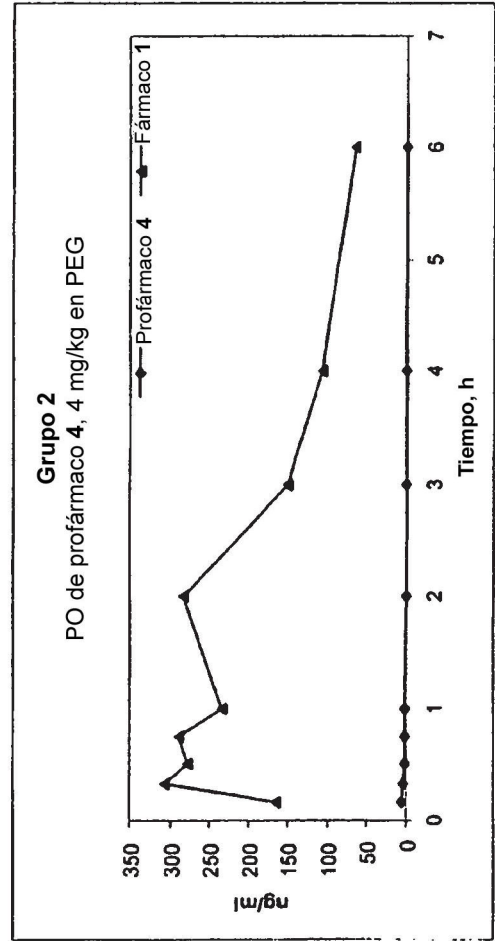
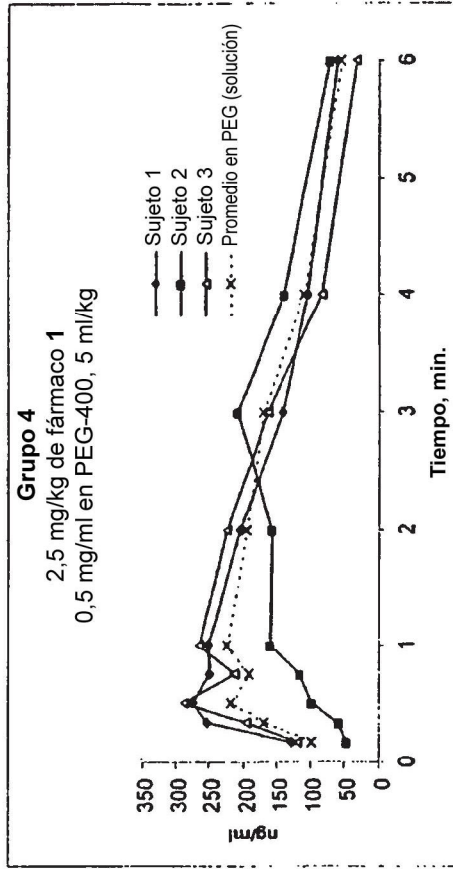
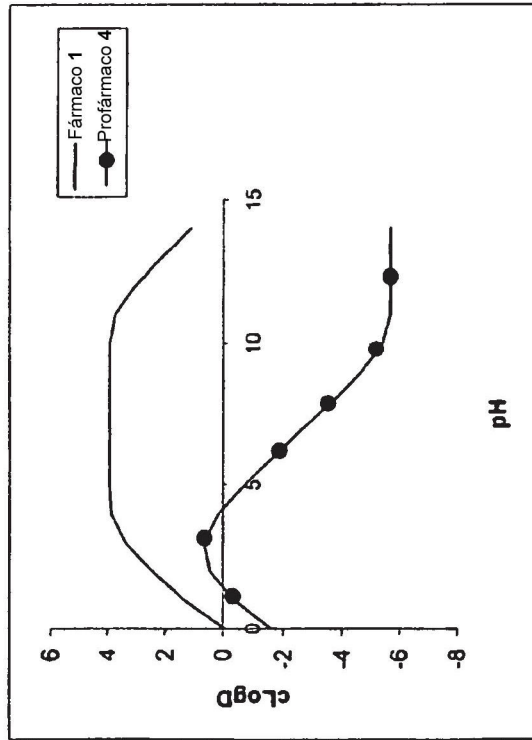


FIG. 7
 cLogD frente a pH (Pallas) y solubilidad medida



- Solubilidad (profármaco 4) en tampón fosfato (pH = 7,5, 100 mM)
- Condiciones:
 - 0,4 mg en 80 ul de tampón (5 mg/ml).
 - Material insoluble retirado por centrifugación a las 2 y 24 horas.
 - Análisis CL/EM/EM.

Tiempo, h	Solubilidad, mg/ml	
	replicado 1	replicado 2
2	5,04	4,94
24	5,09	5,03

FIG. 8
Estabilidad química del profármaco 4

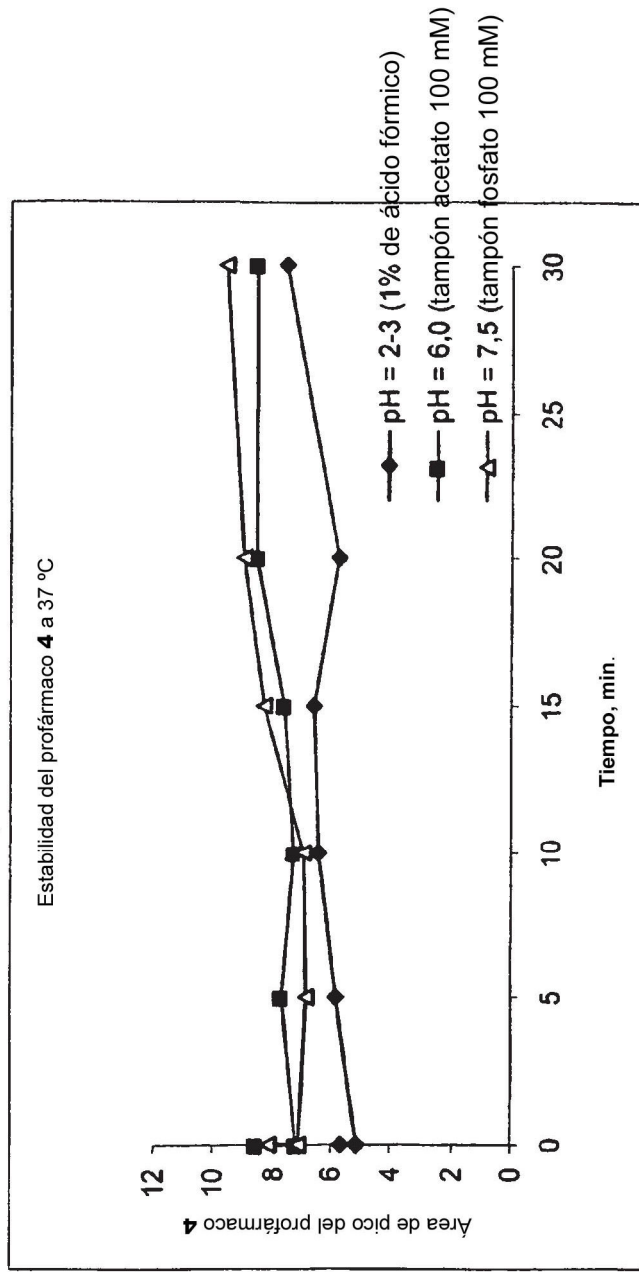


FIG. 9
Estabilidad metabólica: microsomas

- p-nitrofenil fosfato (PNP) es estable en microsomas y fracciones de S9.
- PNP es un sustrato conocido tanto para fosfatasa ácida como alcalina.

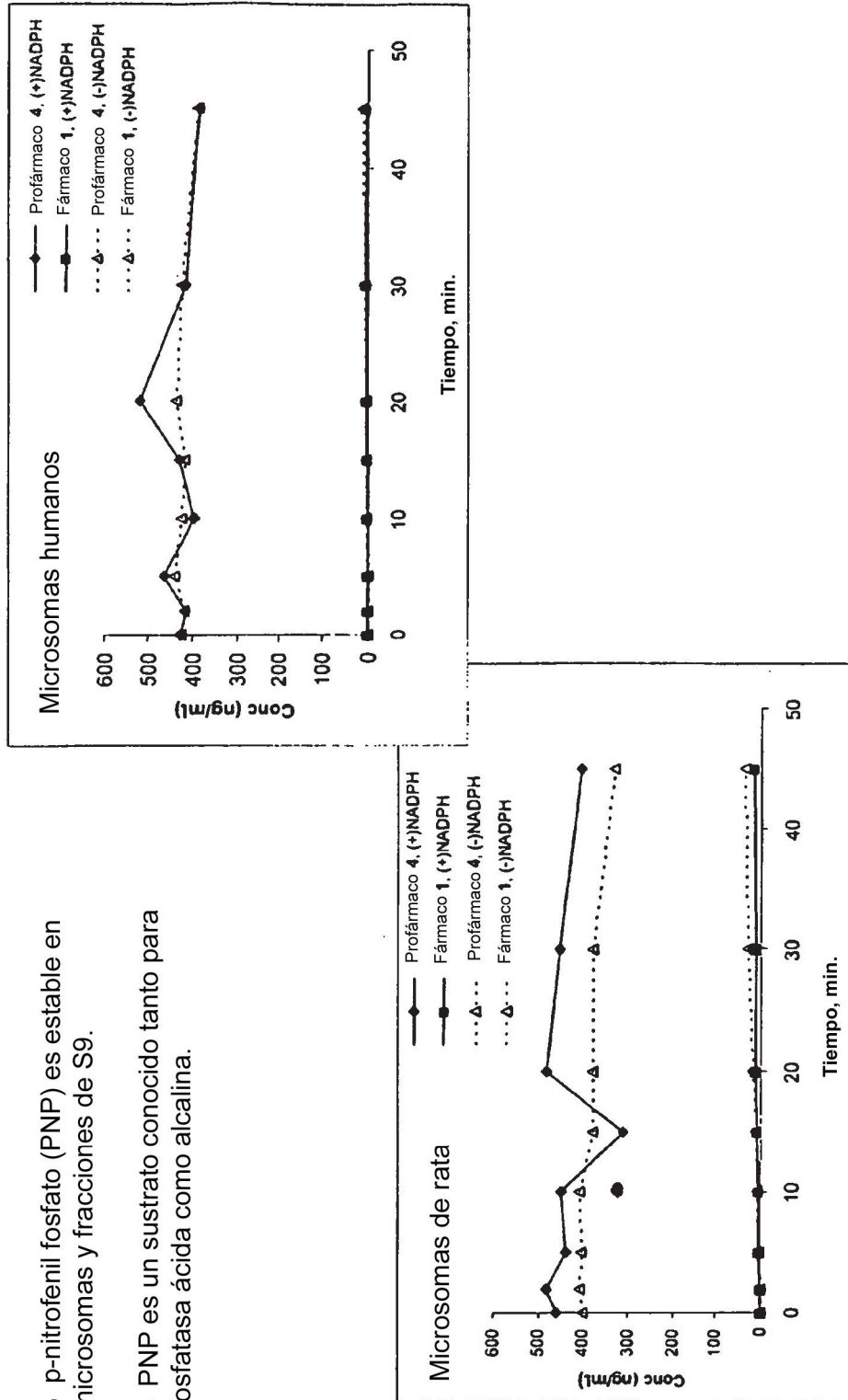


FIG. 10
Estabilidad en plasma (rata) de profármaco **4** y PNP

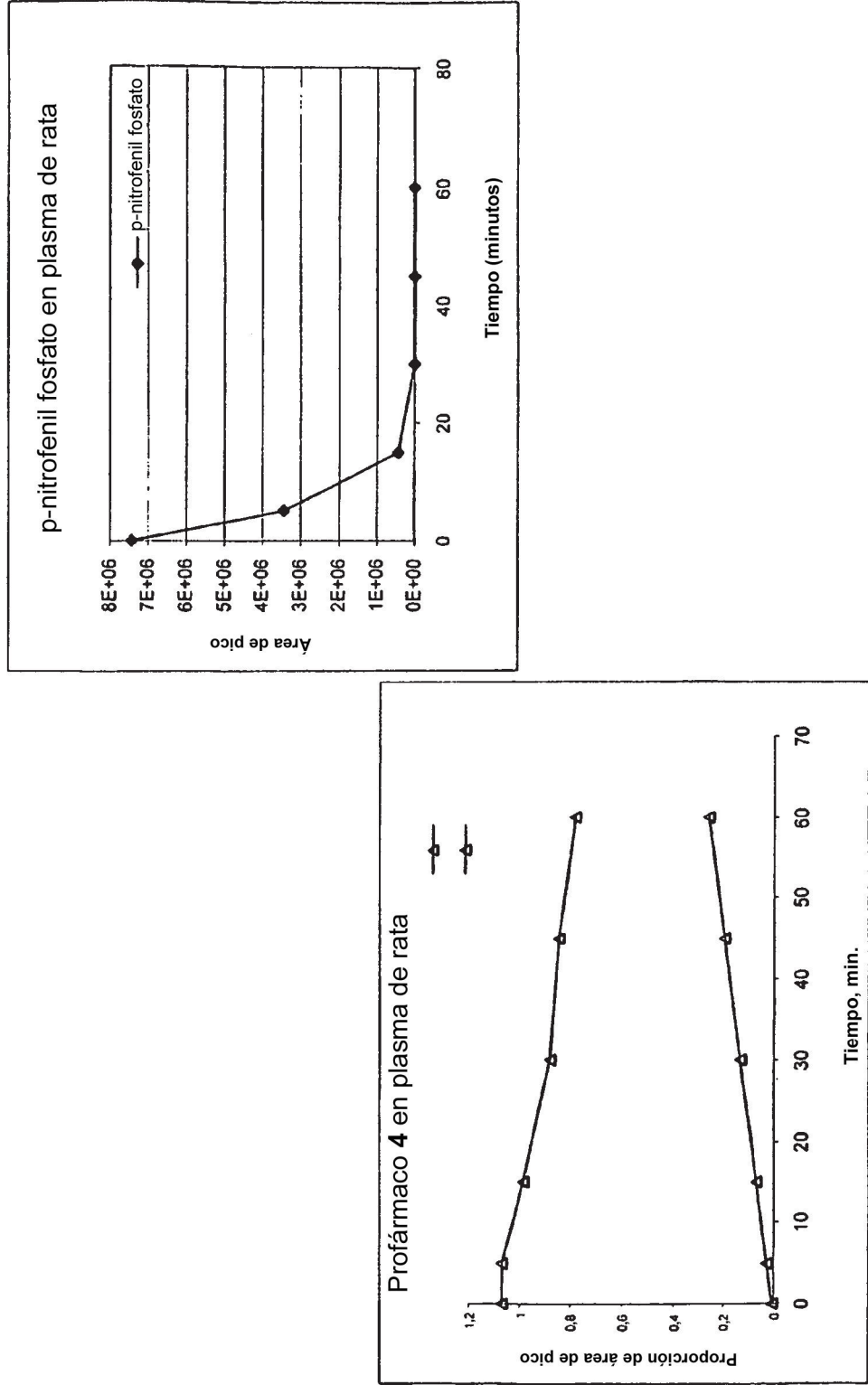
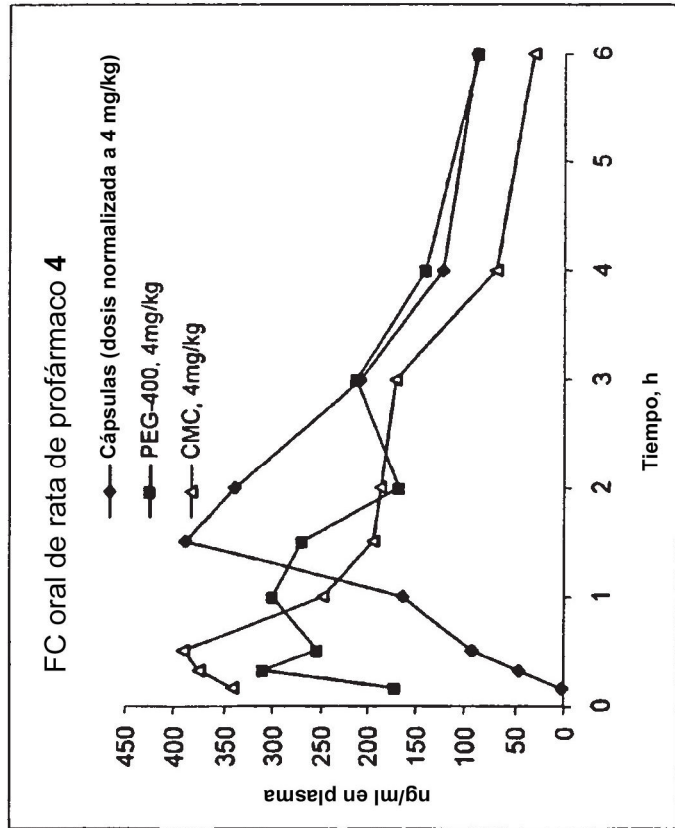


FIG. 11
Estudio FC en ratas del profármaco 4

- Administración oral:
- Soluciones: carboximetilcelulosa (CMC) y PEG (0,8 mg/ml de profármaco 4), 5 ml/kg
- Polvo: Cápsulas de gelatina dura n.º 9 (HGC), 5,7 - 6,9 mg profármaco 4 / cápsula



Vehículo	AUC	DE
PEG-400	914	79
CMC	1083	78.2
HGC	1049	292

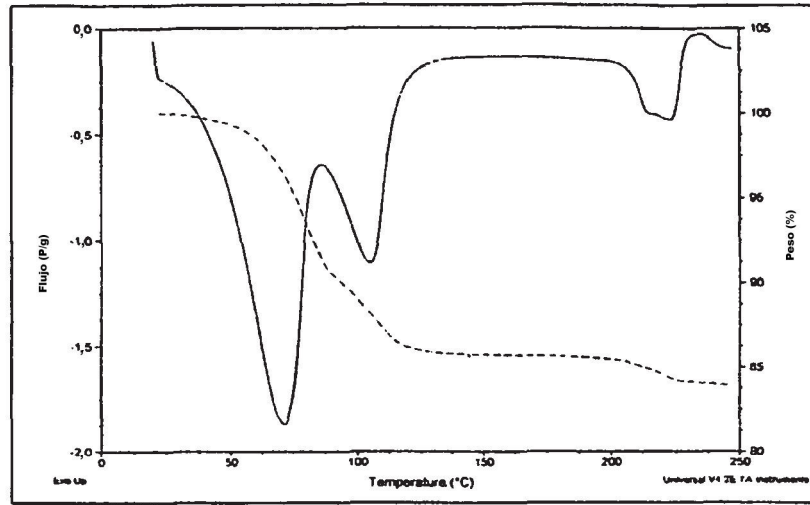


FIG. 12

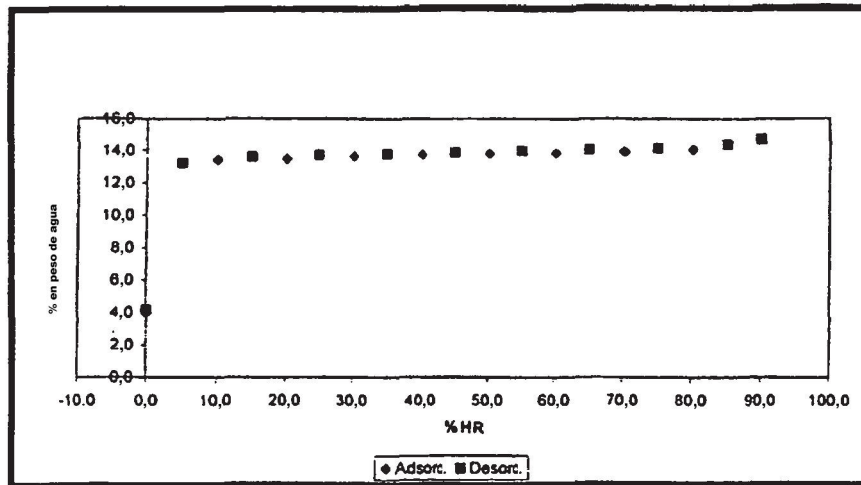


FIG. 13

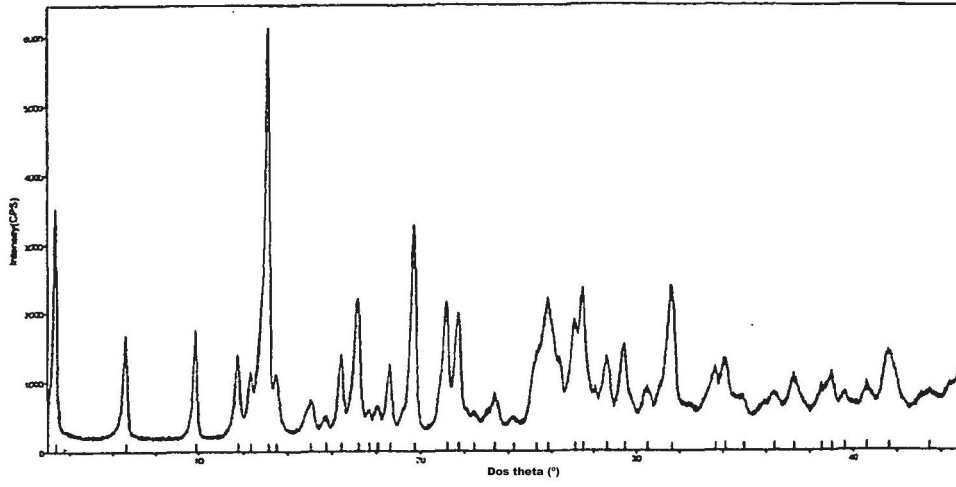


FIG. 14

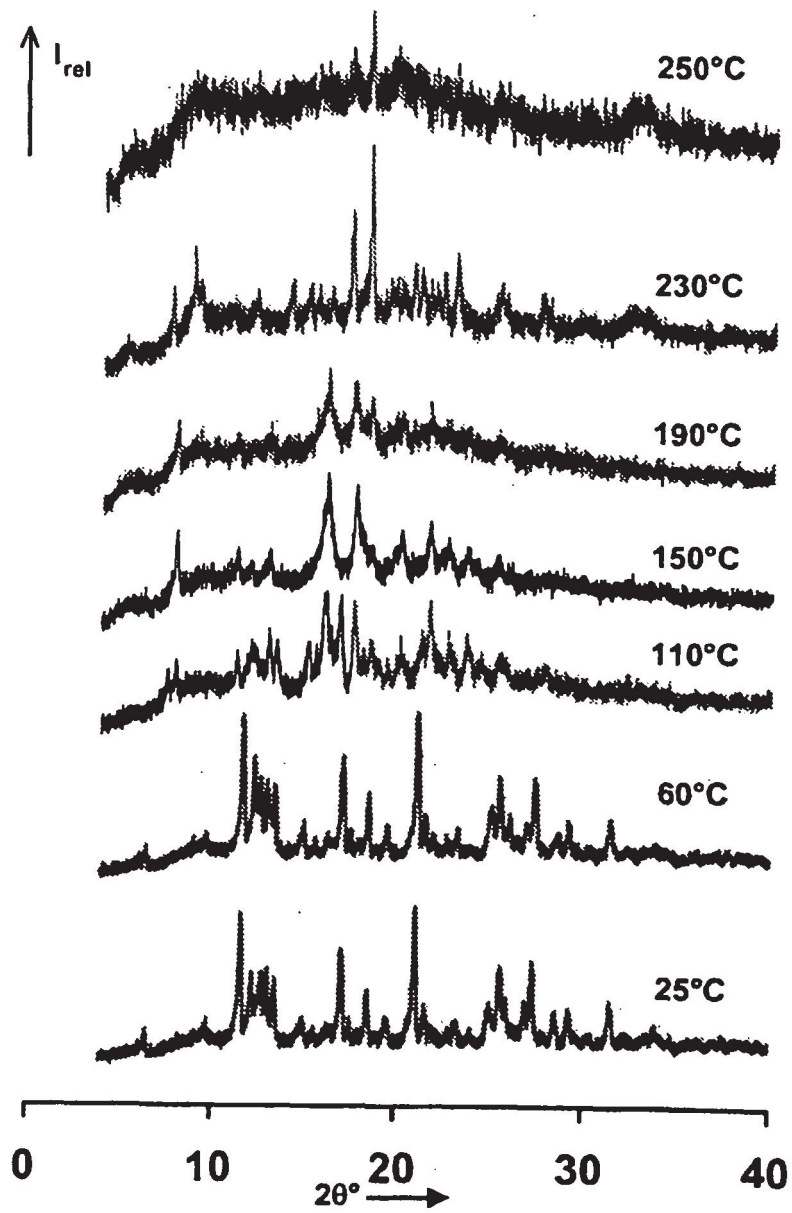


FIG. 15