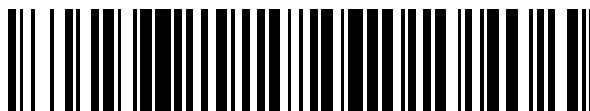


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 421 139**

51 Int. Cl.:

C07D 413/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.07.2004 E 04786150 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2013 EP 1656372**

54 Título: **Compuestos de 2,4-pirimidindiamina para su uso en el tratamiento o la prevención de enfermedades autoinmunitarias**

30 Prioridad:

30.07.2003 US 491641 P
19.12.2003 US 531598 P
18.05.2004 US 572246 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.08.2013

73 Titular/es:

RIGEL PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
1180 VETERANS BOULEVARD
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080, US

72 Inventor/es:

RAJINDER, SINGH;
ANKUSH, ARGADE;
LI, HUI;
BHAMIDIPATI, SOMASEKHAR;
CARROLL, DAVID;
SYLVAIN, CATHERINE;
CLOUGH, JEFFREY y
KEIM, HOLGER

74 Agente/Representante:

PÉREZ BARQUÍN, Eliana

ES 2 421 139 T3

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

DESCRIPCIÓN

Compuestos de 2,4-pirimidindiamina para su uso en el tratamiento o la prevención de enfermedades autoinmunitarias

5

Campo de la invención

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

10

Antecedentes de la invención

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, lo que da como resultado la liberación de mediadores químicos responsables de numerosos acontecimientos adversos. Por ejemplo, tal reticulación conduce a la liberación de mediadores preformados de reacciones de hipersensibilidad anafilácticas de tipo I (inmediata), tales como histamina, a partir de sitios de almacenamiento en gránulos mediante desgranulación. También conduce a la síntesis y liberación de otros mediadores, incluyendo leucotrienos, prostaglandinas y factores de activación plaquetarios (PAF), que desempeñan papeles importantes en reacciones inflamatorias. Los mediadores adicionales que se sintetizan y liberan con la reticulación de receptores de Fc incluyen citocinas y óxido nítrico.

20

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

25

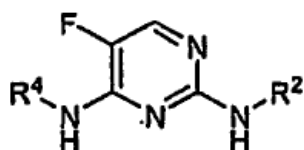
Como los mediadores liberados como resultado de la reticulación de los receptores FcεRI y FcγRI son responsables de, o desempeñan papeles importantes en, la manifestación de numerosos acontecimientos adversos, sería altamente deseable la disponibilidad de compuestos que pueden inhibir la(s) cascada(s)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

30

Sumario de la invención

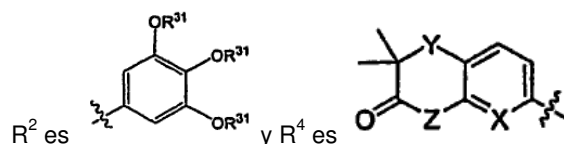
En un aspecto, la presente invención proporciona compuestos que son de fórmula estructural:

40



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

45



en los que

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

50

Y se selecciona del grupo que consiste en O, S, SO, SO₂, SONR³⁶, NH, NR³⁵;

Z se selecciona del grupo que consiste en O, S, SO, SO₂, SONR³⁶, NH, NR³⁵;

55

cada R³¹ es independientemente alquilo (C1-C6);

cada R³⁵, independientemente de los otros, se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno y R⁸;

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

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

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

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

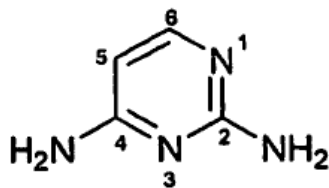
cada R^d es independientemente R^a;

cada m es independientemente un número entero desde 1 hasta 3;

cada n es independientemente un número entero desde 0 hasta 3; y

R³⁶ se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo (C1-C6).

Tal como se comentará en más detalle a continuación, los compuestos de la invención tienen multitud de actividades biológicas. Los compuestos comprenden un "núcleo" 2,4-pirimidindiamina que tiene la siguiente estructura y convención numérica:



Los compuestos de la invención se sustituyen en el nitrógeno de C2 (N2) para formar una amina secundaria y se sustituyen adicionalmente en el nitrógeno de C4 (N4) y la posición C5. El sustituyente en N4 forma una amina secundaria.

También se dan a conocer en el presente documento profármacos de los compuestos de 2,4-pirimidindiamina. Tales profármacos pueden ser activos en su forma de profármaco, o pueden ser inactivos hasta que se convierten en condiciones fisiológicas u otras condiciones de uso en una forma de fármaco activa. En los profármacos dados a conocer en el presente documento, se incluyen uno o más grupos funcionales de los compuestos de 2,4-pirimidindiamina en prorestos que se escinden de la molécula en condiciones de uso, normalmente mediante hidrólisis, escisión enzimática o algún otro mecanismo de escisión, para proporcionar los grupos funcionales. Por ejemplo, pueden incluirse grupos amino primarios o secundarios en un proresto de amida que se escinde en condiciones de uso para generar el grupo amino primario o secundario. Por tanto, los profármacos dados a conocer en el presente documento incluyen tipos especiales de grupos protectores, denominados "progrupos", que enmascaran uno o más grupos funcionales de los compuestos de 2,4-pirimidindiamina que se escinden en las condiciones de uso para proporcionar un compuesto de fármaco de 2,4-pirimidindiamina activo. Los grupos funcionales dentro de los compuestos de 2,4-pirimidindiamina que pueden enmascarse con grupos para la inclusión en un proresto incluyen, pero no se limitan a, aminas (primarias y secundarias), hidroxilos, sulfanilos (tioles), carboxilos, carbonilos, fenoles, catecoles, dioles, alquinos, fosfatos, etc. En la técnica se conocen multitud de grupos adecuados para enmascarar tales grupos funcionales para proporcionar prorestos que pueden

escindirse en las condiciones de uso deseadas. Todos estos progrupos, solos o en combinaciones, pueden incluirse en los profármacos dados a conocer en el presente documento. Los ejemplos específicos de prorestos que proporcionan grupos de amina primaria o secundaria que pueden incluirse en los profármacos dados a conocer en el presente documento incluyen, pero no se limitan a amidas, carbamatos, iminas, ureas, fosfenilos, fosforilos y sulfenilos. Los ejemplos específicos de prorestos que proporcionan grupos sulfanilo que pueden incluirse en los profármacos dados a conocer en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, tioéteres, por ejemplo derivados de S-metilo (monotio, ditio, oxitio, aminotioacetales), tioéteres de sililo, tioésteres, tiocarbonatos, tiocarbamatos, disulfuros asimétricos, etc. Los ejemplos específicos de prorestos que se escinden para proporcionar grupos hidroxilo que pueden incluirse en los profármacos dados a conocer en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, sulfonatos, ésteres y carbonatos. Los ejemplos específicos de prorestos que proporcionan grupos carboxilo que pueden incluirse en los profármacos dados a conocer en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, ésteres (incluyendo ésteres de sililo, tioésteres y ésteres de ácido oxámico), amidas e hidrazidas.

- 15 En una realización ilustrativa, los profármacos dados a conocer en el presente documento son compuestos de la invención en los que R^c y R^d están sustituidos con un progrupo.

En otra realización ilustrativa, los profármacos de la invención son compuestos según la fórmula estructural (II):



20

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

R^2 , R^4 son tal como se definieron previamente

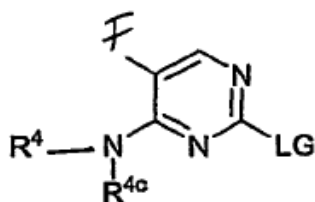
25

R^{2b} es un progrupo;

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

- 30 En otro aspecto, la presente invención proporciona composiciones que comprenden uno o más compuestos de la invención y opcionalmente un profármaco del/de los mismos, y un portador, excipiente o diluyente apropiado. La naturaleza exacta del portador, excipiente o diluyente dependerá del uso deseado de la composición, y puede oscilar entre ser adecuada o aceptable para usos veterinarios y ser adecuada o aceptable para uso humano.

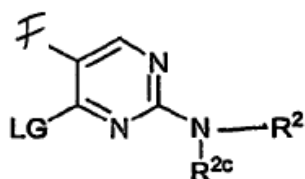
- 35 También se dan a conocer en el presente documento productos intermedios útiles en la síntesis de los compuestos de 2,4-pirimidindiamina de la invención y profármacos de los mismos. En una realización, los productos intermedios son 4-pirimidinaminas según la fórmula estructural (III):



40

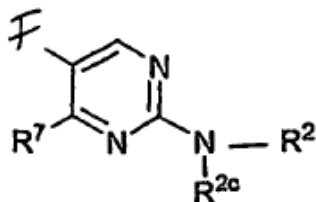
incluyendo sales, hidratos, solvatos y N-óxidos de los mismos, en la que R^4 es tal como se definió previamente; LG es un grupo saliente tal como, por ejemplo, $-S(O)_2Me$, $-SMe$ o halo (por ejemplo, F, Cl, Br, I); y R^{4c} es hidrógeno, un progrupo, un grupo alquilo o tal como se definió en el presente documento.

- 45 Alternativamente, los productos intermedios pueden ser 2-pirimidinaminas según la fórmula estructural (IV):



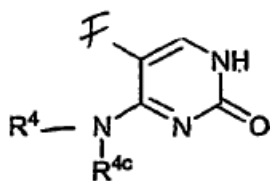
incluyendo sales, hidratos, solvatos y N-óxidos de los mismos, en la que R^2 es tal como se definió previamente; LG es un grupo saliente, tal como, por ejemplo, $-S(O)_2Me$, $-SMe$ o halo (por ejemplo, F, Cl, Br, I),

5 Alternativamente, los productos intermedios son 4-amino- o 4-hidroxi-2-pirimidinaminas según la fórmula estructural (V):



10 incluyendo sales, hidratos, solvatos y N-óxidos de los mismos, en la que R^2 es tal como se definió previamente, R^7 es un grupo amino o hidroxilo y R^{2c} es hidrógeno o un progrupo.

Alternativamente, los productos intermedios son citosinas-N4-sustituidas según la fórmula estructural (VI):



15 incluyendo sales, hidratos, solvatos y N-óxidos de los mismos, en la que R^4 es tal como se definió previamente para la fórmula estructural (I) y R^{4c} es tal como se definió previamente en la fórmula (III).

20 También se dan a conocer en el presente documento métodos para sintetizar los compuestos de 2,4-pirimidindiamina de la invención y profármacos de los mismos. Los métodos incluyen hacer reaccionar una 4-pirimidinamina según la fórmula estructural (III) con una amina de fórmula $HR^{2c}N-R^2$, en la que R^2 y R^{2c} son tal como se definieron previamente para la fórmula estructural (IV) para proporcionar una 2,4-pirimidindiamina de la invención o un profármaco según la fórmula estructural (II).

25 Los métodos alternativos incluyen hacer reaccionar una 2-pirimidinamina según la fórmula estructural (IV) con una amina de fórmula R^4-NHR^{4c} , en la que R^4 y R^{4c} son tal como se definieron previamente para la fórmula estructural (III) para proporcionar una 2,4-pirimidindiamina de la invención o un profármaco según la fórmula estructural (II).

30 Los métodos alternativos adicionales incluyen hacer reaccionar una 4-amino-2-pirimidinamina según la fórmula estructural (V) (en la que R^7 es un grupo amino) con una amina de fórmula R^4-HNR^{4c} , en la que R^4 y R^{4c} son tal como se definieron para la fórmula estructural (III), para proporcionar una 2,4-pirimidindiamina de la invención o un profármaco según la fórmula estructural (II). Alternativamente, la 4-amino-2-pirimidinamina puede hacerse reaccionar con un compuesto de fórmula R^4-LG , en la que R^4 es tal como se definió previamente y LG es un grupo saliente.

35 Todavía en otra alternativa, el método implica halogenar una 4-hidroxi-2-pirimidinamina según la fórmula estructural (V) (R^7 es un grupo hidroxilo) para proporcionar una 2-pirimidinamina según la fórmula estructural (IV) y hacer reaccionar esta pirimidinamina con una amina apropiada, tal como se describió anteriormente.

40 Aún en otra alternativa, el método implica halogenar una citosina-N4-sustituida según la fórmula estructural (VI) para proporcionar una 4-pirimidinamina según la fórmula estructural (III) y hacer reaccionar esta pirimidinamina con una amina apropiada, tal como se describió anteriormente.

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

- 5 Sin pretender limitarse a ninguna teoría de funcionamiento, los datos bioquímicos confirman que los compuestos de 2,4-pirimidindiamina ejercen su efecto inhibitor de la desgranulación, al menos en parte, bloqueando o inhibiendo la(s) cascada(s) de transducción de señales iniciada(s) por la reticulación de los receptores de Fc de alta afinidad para IgE ("FcεRI") y/o IgG ("FcγRI"). De hecho, los compuestos de 2,4-pirimidindiamina son potentes inhibidores de la desgranulación mediada tanto por FcεRI como por FcγRI. Como consecuencia, los compuestos de 2,4-pirimidina pueden ser para su uso en métodos que inhiben estas cascadas de señalización de receptores de Fc en cualquier tipo celular que exprese tales receptores FcεRI y/o FcγRI incluyendo pero sin limitarse a macrófagos, mastocitos, basófilos, neutrófilos y/o eosinófilos.
- 10 Los métodos también permiten la regulación de, y en particular la inhibición de, procesos posteriores que resultan como una consecuencia de la activación de tal/tales cascada(s) de señalización de receptores de Fc. Tales procesos posteriores incluyen, pero no se limitan a, desgranulación mediada por FcεRI y/o por FcγRI, producción de citocinas y/o la producción y/o liberación de mediadores lipídicos tales como leucotrienos y prostaglandinas. El método implica generalmente poner en contacto una célula que expresa un receptor de Fc, tal como uno de los tipos celulares comentados anteriormente, con una cantidad de un compuesto de 2,4-pirimidindiamina o profármaco de la invención, o una sal, hidrato, disolvente, N-óxido y/o composición aceptable del mismo, eficaz para regular o inhibir la cascada de señalización de receptores de Fc y/o un proceso posterior provocado por la activación de esta cascada de señalización. El método puede ponerse en práctica en contextos *in vitro* o en contextos *in vivo* como un enfoque terapéutico hacia el tratamiento o la prevención de enfermedades caracterizadas por, provocadas por o asociadas con la cascada de señalización de receptores de Fc, tal 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.
- 15 Aún en otro aspecto, la presente invención proporciona los compuestos de la invención para su uso en métodos de tratamiento y/o prevención de enfermedades caracterizadas por, provocadas por o asociadas con la liberación de mediadores químicos como consecuencia de la activación de las cascadas de señalización de receptores de Fc, tales como cascadas de señalización de FcεRI y/o FcγRI. Los métodos pueden ponerse en práctica en animales en contextos veterinarios o en seres humanos. Los métodos implican generalmente administrar a un sujeto animal o humano una cantidad de un compuesto de 2,4-pirimidindiamina de la invención o profármaco, o una sal, hidrato, solvato, N-óxido y/o composición aceptable del mismo, eficaz para tratar o prevenir la enfermedad. Tal como se trató previamente, la activación de la cascada de señalización de receptores FcεRI o FcγRI en determinadas células inmunitarias conduce a la liberación y/o síntesis de una variedad de sustancias químicas que son mediadores farmacológicos de una amplia variedad de enfermedades. Cualquiera de estas enfermedades puede tratarse o prevenirse según los métodos en los que pueden usarse los compuestos de la invención.
- 20 Por ejemplo, en mastocitos y basófilos, la activación de la cascada de señalización de FcεRI o FcγRI conduce a la liberación inmediata (es decir, en el plazo de 1-3 min. de la activación del receptor) de mediadores preformados de reacciones de hipersensibilidad de tipo I y/o atópicas (por ejemplo, histamina, proteasas tales como tripsina, etc.) mediante el proceso de desgranulación. Tales reacciones de hipersensibilidad de tipo I o atópicas incluyen, pero no se limitan a, reacciones anafilácticas a alérgenos ambientales y otros alérgenos (por ejemplo, polen, insectos y/o venenos animales, alimentos, fármacos, colorantes de contraste, etc.), reacciones anafilactoides, fiebre del heno, conjuntivitis alérgica, rinitis alérgica, asma alérgica, dermatitis atópica, eccema, urticaria, trastornos de las mucosas, trastornos de los tejidos y determinados trastornos gastrointestinales.
- 25 La liberación inmediata de los mediadores preformados mediante la desgranulación va seguida por la liberación y/o síntesis de una variedad de otros mediadores químicos, incluyendo, entre otras cosas, factor de activación plaquetario (PAF), prostaglandinas y leucotrienos (por ejemplo, LTC₄) y la síntesis *de novo* y 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 piensa que estos mediadores de "fase 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 inflamación y enfermedades inflamatorias (por ejemplo, osteoartritis, enfermedad inflamatoria del intestino, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria del intestino idiopática, síndrome del intestino irritable, colon irritable, etc.), cicatrización de grado bajo (por ejemplo, esclerodermia, fibrosis aumentada, queloides, cicatrices posquirúrgicas, fibrosis pulmonar, espasmos vasculares, migraña, lesión por reperfusión y tras infarto de miocardio), y síndrome o complejo seco. Todas estas enfermedades pueden tratarse o prevenirse según los métodos en los que pueden usarse los compuestos de la invención.
- 30 Las enfermedades adicionales que pueden tratarse o prevenirse según los métodos en los que pueden usarse los compuestos de la invención incluyen enfermedades asociadas con patología de los basófilos y/o mastocitos. Los ejemplos de tales enfermedades incluyen, pero no se limitan a, enfermedades de la piel tales como esclerodermia, enfermedades cardíacas tales como tras infarto de miocardio, enfermedades pulmonares tales como remodelación o cambios en la musculatura pulmonar y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y enfermedades del intestino tal como síndrome inflamatorio del intestino (colon irritable).
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

Los compuestos de 2,4-pirimidindiamina de la invención también son potentes inhibidores de la tirosina cinasa Syk cinasa. Por tanto todavía en otro aspecto, la presente invención proporciona los compuestos de la invención para su uso en métodos de regulación, y en particular de inhibición, de la actividad Syk cinasa. El método implica generalmente poner en contacto una Syk cinasa o una célula que comprende una Syk cinasa con una cantidad de un compuesto de 2,4-pirimidindiamina de la invención o profármaco, o una sal, hidrato, solvato, N-óxido y/o composición aceptable del mismo eficaz para regular o inhibir la actividad Syk cinasa. En una realización, la Syk cinasa es una Syk cinasa aislada o recombinada. En otra realización, la Syk cinasa es un Syk cinasa endógena o recombinante expresada por una célula, por ejemplo un mastocito o un basófilo. El método pueden ponerse en práctica en contextos *in vitro* o en contextos *in vivo* como un enfoque terapéutico hacia el tratamiento o la prevención de enfermedades caracterizadas por, provocadas por o asociadas con la actividad Syk cinasa.

Sin pretender limitarse a ninguna teoría de funcionamiento particular, se cree que los compuestos de 2,4-pirimidindiamina de la invención inhiben la desgranulación y/o la liberación celular de otros mediadores químicos principalmente inhibiendo la Syk cinasa que se activa a través del homodímero de cadena gamma de FcεRI (véase, por ejemplo, la figura 2). Este homodímero de cadena gamma se comparte por otros receptores de Fc, incluyendo FcγRI, FcγRIII y FcαRI. Para todos estos receptores, la transducción de señales intracelulares está mediada por el homodímero de cadena gamma común. La unión y la agregación de estos receptores da como resultado el reclutamiento y la activación de tirosina cinasas tales como Syk cinasa. Como consecuencia de estas actividades de señalización comunes, los compuestos de 2,4-pirimidindiamina descritos en el presente documento pueden ser para su uso en métodos que regulan, y en particular inhiben, las cascadas de señalización de receptores de Fc que tienen este homodímero de cadena gamma, tales como FcεRI, FcγRI, FcγRIII y FcαRI, así como las respuestas celulares provocadas a través de estos receptores.

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

Por tanto, en otro aspecto, la presente invención proporciona los compuestos de la invención para su uso en métodos de regulación, y en particular de inhibición, de las cascadas de transducción de señales en las que Syk desempeña un papel. El método implica generalmente poner en contacto un receptor dependiente de Syk o una célula que expresa un receptor dependiente de Syk con una cantidad de un compuesto de 2,4-pirimidindiamina de la invención o profármaco o una sal, hidrato, solvato, N-óxido y/o composición aceptable del mismo, eficaz para regular o inhibir la cascada de transducción de señales. Los métodos también pueden usarse para regular, y en particular inhibir, procesos posteriores o respuestas celulares provocadas por la activación de la cascada de transducción de señales dependiente de Syk particular. Los métodos pueden ponerse en práctica para regular cualquier cascada de transducción de señales en la que no se sabe que o se descubre más tarde que Syk desempeña un papel. Los métodos pueden ponerse en práctica en contextos *in vitro* o en contextos *in vivo* como un enfoque terapéutico hacia el tratamiento o la prevención de enfermedades caracterizadas por, provocadas por o asociadas con la activación de la cascada de transducción de señales dependiente de Syk. Los ejemplos no limitativos de tales enfermedades incluyen los mencionados previamente.

Los datos celulares y animales también confirman que los compuestos de 2,4-pirimidindiamina de la invención también pueden ser para su uso en métodos que tratan o previenen enfermedades autoinmunitarias y/o síntomas de tales enfermedades. Los métodos implican generalmente administrar a un sujeto que padece una enfermedad autoinmunitaria o que corre el riesgo de desarrollar una enfermedad autoinmunitaria, una cantidad de un compuesto de 2,4-pirimidindiamina de la invención o profármaco, o una sal, N-óxido, hidrato, solvato o composición aceptable del mismo, eficaz para tratar o prevenir la enfermedad autoinmunitaria y/o sus síntomas asociados. Las enfermedades autoinmunitarias que pueden tratarse o prevenirse con métodos en los que los compuestos de 2,4-pirimidindiamina de la invención son para su uso, incluyen aquellas enfermedades que están comúnmente asociadas con reacciones de hipersensibilidad no anafilácticas (reacciones de hipersensibilidad de tipo II, tipo III y/o tipo IV) y/o aquellas enfermedades que están mediadas, al menos en parte, por la activación de la cascada de señalización de FcγR en monocitos. Tales enfermedades autoinmunitarias incluyen, pero no se limitan a, aquellas enfermedades autoinmunitarias que se designan frecuentemente como trastornos autoinmunitarios de un solo órgano o de un solo tipo celular y a aquellas enfermedades autoinmunitarias que se designan frecuentemente que implican un trastorno autoinmunitario sistémico. Los ejemplos no limitativos de enfermedades designadas frecuentemente como trastornos autoinmunitarios de un solo órgano o de un solo tipo celular incluyen: tiroiditis de

Hashimoto, anemia hemolítica autoinmunitaria, gastritis atrófica autoinmunitaria de la anemia perniciosa, encefalomiелitis autoinmunitaria, orquitis autoinmunitaria, enfermedad de Goodpasture, trombocitopenia autoinmunitaria, oftalmia simpática, miastenia grave, enfermedad de Grave, cirrosis biliar primaria, hepatitis agresiva crónica, colitis ulcerosa y glomerulopatía membranosa. Los ejemplos no limitativos de enfermedades que se designan a menudo que implican un trastorno autoinmunitario sistémico incluyen: lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, síndrome de Sjorgen, síndrome de Reiter, polimiositis-dermatomiositis, esclerosis sistémica, poliarteritis nudosa, esclerosis múltiple y penfigoide vesicular.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 proporciona un dibujo que ilustra la producción de IgE inducida por alérgeno y la posterior liberación de mediadores químicos preformados y otros mediadores químicos de los mastocitos;

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

La figura 3 proporciona un dibujo que ilustra los supuestos puntos de acción de los compuestos que inhiben selectivamente la desgranulación mediada por FcεRI anterior y los compuestos que inhiben tanto la desgranulación mediada por FcεRI como la inducida por ionomicina.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

Definiciones

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

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

“Alcanilo” por sí mismo o como parte de otro sustituyente se refiere a un alquilo saturado ramificado, de cadena lineal o cíclico derivado de la eliminación de un átomo de hidrógeno de un solo átomo de carbono de un alcano original. Los grupos alcanilo típicos incluyen, pero no se limitan a, metanilo; etanilo; propanilos tales como propan-1-ilo, propan-2-ilo (isopropilo), ciclopropan-1-ilo, etc.; butanilos tales como butan-1-ilo, butan-2-ilo (sec-butilo), 2-metil-propan-1-ilo (isobutilo), 2-metil-propan-2-ilo (t-butilo), ciclobutan-1-ilo, etc.; y similares. En realizaciones preferidas, los grupos alcanilo son alcanilo (C1-C6).

“Alquenilo” por sí mismo o como parte de otro sustituyente se refiere a un alquilo insaturado ramificado, de cadena lineal o cíclico que tiene al menos un doble enlace carbono-carbono, derivado de la eliminación de un átomo de hidrógeno de un solo átomo de carbono de un alqueno original. El grupo puede estar en la conformación o bien cis o bien trans con respecto al/a los doble(s) enlace(s). Los grupos alquenilo típicos incluyen, pero no se limitan a, etenilo; propenilos tales como prop-1-en-1-ilo, prop-1-en-2-ilo, prop-2-en-1-ilo, prop-2-en-2-ilo, cicloprop-1-en-1-ilo; cicloprop-2-en-1-ilo; butenilos tales como but-1-en-1-ilo, but-1-en-2-ilo, 2-metil-prop-1-en-1-ilo, but-2-en-1-ilo, but-2-en-2-ilo, buta-1,3-dien-1-ilo, buta-1,3-dien-2-ilo, ciclobut-1-en-1-ilo, ciclobut-1-en-3-ilo, ciclobuta-1,3-dien-1-ilo, etc.; y similares. En realizaciones preferidas, el grupo alquenilo es alquenilo (C2-C6).

“Alquinilo” por sí mismo o como parte de otro sustituyente se refiere a un alquilo insaturado ramificado, de cadena lineal o cíclico que tiene al menos un triple enlace carbono-carbono, derivado de la eliminación de un átomo de hidrógeno de un solo átomo de carbono de un alquino original. Los grupos alquinilo típicos incluyen, pero no se limitan a, etinilo; propinilos tales como prop-1-in-1-ilo, prop-2-in-1-ilo, etc.; butinilos tales como but-1-in-1-ilo, but-1-in-3-ilo, but-3-in-1-ilo, etc.; y similares. En realizaciones preferidas, el grupo alquinilo es alquinilo (C2-C6).

“Alquildiílo” por sí mismo o como parte de otro sustituyente se refiere a un grupo hidrocarbonado divalente saturado o insaturado, ramificado, de cadena lineal o cíclico que tiene el número indicado de átomos de carbono (es decir, C1-C6 significa desde uno hasta seis átomos de carbono) derivado de la eliminación de un átomo de hidrógeno de cada uno de dos átomos de carbono diferentes de un alcano, alqueno o alquino original, o de la eliminación de dos

- átomos de hidrógeno de un solo átomo de carbono de un alcano, alqueno o alquino original. Los dos centros radicales monovalentes o cada valencia del centro radical divalente pueden formar enlaces con átomos iguales o diferentes. Los grupos alquildiílo típicos incluyen, pero no se limitan a, metandiílo; etildiílos tales como etan-1,1-diílo, etan-1,2-diílo, eten-1,1-diílo, eten-1,2-diílo; propildiílos tales como propan-1,1-diílo, propan-1,2-diílo, propan-2,2-diílo, propan-1,3-diílo, ciclopropan-1,1-diílo, ciclopropan-1,2-diílo, prop-1-en-1,1-diílo, prop-1-en-1,2-diílo, prop-2-en-1,2-diílo, prop-1-en-1,3-diílo, cicloprop-1-en-1,2-diílo, cicloprop-2-en-1,2-diílo, cicloprop-2-en-1,1-diílo, prop-1-in-1,3-diílo, etc.; butildiílos tales como, butan-1,1-diílo, butan-1,2-diílo, butan-1,3-diílo, butan-1,4-diílo, butan-2,2-diílo, 2-metilpropan-1,1-diílo, 2-metilpropan-1,2-diílo, ciclobutan-1,1-diílo; ciclobutan-1,2-diílo, ciclobutan-1,3-diílo, but-1-en-1,1-diílo, but-1-en-1,2-diílo, but-1-en-1,3-diílo, but-1-en-1,4-diílo, 2-metil-prop-1-en-1,1-diílo, 2-metaniliden-propan-1,1-diílo, buta-1,3-dien-1,1-diílo, buta-1,3-dien-1,2-diílo, buta-1,3-dien-1,3-diílo, buta-1,3-dien-1,4-diílo, ciclobut-1-en-1,2-diílo, ciclobut-1-en-1,3-diílo, ciclobut-2-en-1,2-diílo, ciclobuta-1,3-dien-1,2-diílo, ciclobuta-1,3-dien-1,3-diílo, but-1-in-1,3-diílo, but-1-in-1,4-diílo, buta-1,3-diin-1,4-diílo, etc.; y similares. Cuando se pretenden niveles específicos de saturación, se usa la nomenclatura alcanildiílo, alquendiílo y/o alquinildiílo. Cuando se pretende específicamente que las dos valencias estén en el mismo átomo de carbono, se usa la nomenclatura “alquildieno”. En realizaciones preferidas, el grupo alquildiílo es alquildiílo (C1-C6). También se prefieren grupos alcanildiílo acíclicos saturados en los que los centros radicales están en los carbonos terminales, por ejemplo, metandiílo (metano); etan-1,2-diílo (etano); propan-1,3-diílo (propano); butan-1,4-diílo (butano); y similares (también denominados alquilenos, definidos a continuación).
- 20 “Alquileo” por sí mismo o como parte de otro sustituyente se refiere a un grupo alquildiílo de cadena lineal saturado o insaturado que tiene dos centros radicales monovalente terminales, derivado de la eliminación de un átomo de hidrógeno de cada uno de los dos átomos de carbono terminales de alcano, alqueno o alquino original de cadena lineal. La localización de un doble enlace o triple enlace, si está presente, en un alquileo particular se indica entre corchetes. Los grupos alquileo típicos incluyen, pero no se limitan a, metano; etilenos tales como etano, eteno, etino; propilenos tales como propano, prop[1]eno, propa[1,2]dieneo, prop[1]ino, etc.; butilenos tales como butano, but[1]eno, but[2]eno, buta[1,3]dieneo, but[1]ino, but[2]ino, buta[1,3]diino, etc.; y similares. Cuando se pretenden niveles específicos de saturación, se usa la nomenclatura alcano, alqueno y/o alquino. En realizaciones preferidas, el grupo alquileo es alquileo (C1-C6) o (C1-C3). También se prefieren grupos alcano de cadena lineal saturados, por ejemplo, metano, etano, propano, butano y similares.
- 30 “Heteroalquilo”, “heteroalcanilo”, “heteroalqueno”, “heteroalquino”, “heteroalquildiílo” y “heteroalquileo” por sí mismos o como parte de otro sustituyente se refieren a grupos alquilo, alcanilo, alqueno, alquino, alquildiílo y alquileo, respectivamente, en los que uno o más de los átomos de carbono están cada uno sustituido independientemente por heteroátomos o grupos heteroatómicos iguales o diferentes. Los heteroátomos y/o grupos heteroatómicos típicos que pueden sustituir a los átomos de carbono incluyen, pero no se limitan a, -O-, -S-, -S-O-, -NR'-, -PH-, -S(O)-, -S(O)₂-, -S(O)NR'-, -S(O)₂NR'- y similares, incluyendo combinaciones de los mismos, en los que cada R' es independientemente hidrógeno o alquilo (C1-C6).
- 40 “Cicloalquilo” y “heterocicloalquilo” por sí mismos o como parte de otro sustituyente se refieren a versiones cíclicas de grupos “alquilo” y “heteroalquilo”, respectivamente. Para grupos heteroalquilo, un heteroátomo puede ocupar la posición que está unida al resto de la molécula. Los grupos cicloalquilo típicos incluyen, pero no se limitan a, ciclopropilo; ciclobutilos tales como ciclobutanilo y ciclobutenilo; ciclopentilos tales como ciclopentanilo y ciclopentenilo; ciclohexilos tales como ciclohexanilo y ciclohexenilo; y similares. Los grupos heterocicloalquilo típicos incluyen, pero no se limitan a, tetrahidrofuranilo (por ejemplo, tetrahidrofuran-2-ilo, tetrahidrofuran-3-ilo, etc.), piperidinilo (por ejemplo, piperidin-1-ilo, piperidin-2-ilo, etc.), morfolinilo (por ejemplo, morfolin-3-ilo, morfolin-4-ilo, etc.), piperazinilo (por ejemplo, piperazin-1-ilo, piperazin-2-ilo, etc.) y similares.
- 50 “Puente heteroatómico acíclico” se refiere a un puente divalente en el que los átomos de la estructura principal son exclusivamente heteroátomos y/o grupos heteroatómicos. Los puentes heteroatómicos acíclicos típicos incluyen, pero no se limitan a, -O-, -S-, -S-O-, -NR'-, -PH-, -S(O)-, -S(O)₂-, -S(O)NR'-, -S(O)₂NR'- y similares, incluyendo combinaciones de los mismos, en los que cada R' es independientemente hidrógeno o alquilo (C1-C6).
- 55 “Sistema de anillos aromático original” se refiere a un sistema de anillos insaturado cíclico o policíclico que tiene un sistema de electrón π conjugado. Se incluyen específicamente dentro de la definición de “sistema de anillos aromático original”, sistemas de anillos condensados en los que uno o más de los anillos son aromáticos y uno o más de los anillos está saturado o insaturado, tal como, por ejemplo, fluoreno, indano, indeno, fenaleno, tetrahidronaftaleno, etc. Los sistemas de anillos aromáticos originales típicos incluyen, pero no se limitan a, aceantrileno, acenafileno, acenfantrileno, antraceno, azuleno, benceno, crisen, coroneno, fluoranteno, fluoreno, hexaceno, hexafeno, hexaleno, indaceno, s-indaceno, indano, indeno, naftaleno, octaceno, octafeno, octaleno, ovaleno, penta-2,4-dieno, pentaceno, pentaleno, pentafeno, perileno, fenaleno, fenantreno, piceno, pleiaden, pireno, pirantreno, rubiceno, tetrahidronaftaleno, trifenileno, trinaftaleno y similares, así como los diversos hidroisómeros de los mismos.
- 65 “Ariilo” por sí mismo o como parte de otro sustituyente se refiere a un grupo hidrocarbonado aromático monovalente que tiene el número indicado de átomos de carbono (es decir, C5-C15 significa desde 5 hasta 15 átomos de carbono), derivado de la eliminación de un átomo de hidrógeno de un solo átomo de carbono de un sistema de

anillos aromático original. Los grupos arilo típicos incluyen, pero no se limitan a, grupos derivados de aceantrileno, acenaftileno, acefenantrileno, antraceno, azuleno, benceno, criseno, coroneno, fluoranteno, fluoreno, hexaceno, hexafeno, hexaleno, as-indaceno, s-indaceno, indano, indeno, naftaleno, octaceno, octafeno, octaleno, ovaleno, penta-2,4-dieno, pentaceno, pentaleno, pentafeno, perileno, fenaleno, fenantreno, piceno, pleiadeno, pireno, pirantreno, rubiceno, trifenileno, trinaftaleno y similares, así como los diversos hidroisómeros de los mismos. En realizaciones preferidas, el grupo arilo es arilo (C5-C15), siendo (C5-C10) incluso más preferido. Arilos particularmente preferidos son ciclopentadienilo, fenilo y naftilo.

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

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

“Aralalquilo” por sí mismo o como parte de otro sustituyente se refiere a un grupo alquilo acíclico en el que uno de los átomos de hidrógeno unido a un átomo de carbono, normalmente un átomo de carbono terminal o sp^3 , está sustituido por un grupo arilo. Los grupos arilalquilo típicos incluyen, pero no se limitan a, bencilo, 2-feniletan-1-ilo, 2-feniletan-1-ilo, naftilmetilo, 2-naftiletan-1-ilo, 2-naftiletan-1-ilo, naftobencilo, 2-naftofeniletan-1-ilo y similares. Cuando se pretenden restos alquilo específicos, se usa la nomenclatura arilalcanilo, arilalquenilo y/o arilalquinilo. En realizaciones preferidas, el grupo arilalquilo es arilalquilo (C6-C21), por ejemplo, el resto alcanilo, alquenilo o alquinilo del grupo arilalquilo es (C1-C6) y el resto arilo es (C5-C15). En realizaciones particularmente preferidas, el grupo arilalquilo es (C6-C13), por ejemplo, el resto alcanilo, alquenilo o alquinilo del grupo arilalquilo es (C1-C3) y el resto arilo es (C5-C10).

“Sistema de anillos heteroaromático original” se refiere a un sistema de anillos aromático original en el que uno o más átomos de carbono están cada uno sustituido independientemente por heteroátomos o grupos heteroatómicos iguales o diferentes. Los heteroátomos o grupos heteroatómicos típicos para sustituir a los átomos de carbono incluyen, pero no se limitan a, N, NH, P, O S, S(O), S(O)₂, Si, etc. Se incluyen específicamente dentro de la definición de “sistemas de anillos heteroaromáticos originales” sistemas de anillos condensados en los que uno o más de los anillos es aromático y uno o más de los anillos está saturado o insaturado, tal como, por ejemplo, benzodioxano, benzofurano, cromano, cromeno, indol, indolina, xanteno, etc. También se incluyen en la definición de “sistema de anillos heteroaromático original” aquellos anillos reconocidos que incluyen sustituyentes comunes, tales como, por ejemplo, benzopirona y 1-metil-1,2,3,4-tetrazol. Se excluyen específicamente de la definición de “sistema de anillos heteroaromático original” anillos de benceno condensados con polialquilenglicoles cíclicos tales como polietilenglicoles cíclicos. Los sistemas de anillos heteroaromáticos originales típicos incluyen, pero no se limitan a, acridina, bencimidazol, bencisoxazol, benzodioxano, benzodioxol, benzofurano, benzopirona, benzotriazol, benzotiazol, benzotriazol, benzoxazina, benzoxazol, benzoxazolina, carbazol, β-carbolina, cromano, cromeno, cinolina, furano, imidazol, indazol, indol, indolina, indolizina, isobenzofurano, isocromeno, isoindol, isoindolina, isoquinolina, isotiazol, isoxazol, naftiridina, oxadiazol, oxazol, perimidina, fenantridina, fenantrolina, fenazina, ftalazina, pteridina, purina, pirano, pirazina, pirazol, piridazina, piridina, pirimidina, pirrol, pirrolizina, quinazolina, quinolina, quinolizina, quinoxalina, tetrazol, tiadiazol, tiazol, tiofeno, triazol, xanteno y similares.

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

de 5-10 miembros particularmente preferido.

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

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

“Heteroarilalquilo” por sí mismo o como parte de otro sustituyente se refiere a un grupo alquilo acíclico en el que uno de los átomos de hidrógeno unido a un átomo de carbono, normalmente un átomo de carbono terminal o sp^3 , está sustituido por un grupo heteroarilo. Cuando se pretenden restos alquilo específicos, se usa la nomenclatura heteroarilalcanilo, heteroarilaquenilo y/o heteroarilalquinilo. En realizaciones preferidas, el grupo heteroarilalquilo es un heteroarilalquilo de 6-21 miembros, por ejemplo, el resto alcanilo, alquenilo o alquinilo del heteroarilalquilo es alquilo (C1-C6) y el resto heteroarilo es un heteroarilo de 5-15 miembros. En realizaciones particularmente preferidas, el heteroarilalquilo es un heteroarilalquilo de 6-13 miembros, por ejemplo, el resto alcanilo, alquenilo o alquinilo es alquilo (C1-C3) y el resto heteroarilo es un heteroarilo de 5-10 miembros.

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

“Haloalquilo” por sí mismo o como parte de otro sustituyente se refiere a un grupo alquilo en el que uno o más de los átomos de hidrógeno está sustituido con un halógeno. Por tanto, se pretende que el término “haloalquilo” incluya monohaloalquilos, dihaloalquilos, trihaloalquilos, etc. hasta perhaloalquilos. Por ejemplo, la expresión “haloalquilo (C1-C2)” incluye fluorometilo, difluorometilo, trifluorometilo, 1-fluoroetilo, 1,1-difluoroetilo, 1,2-difluoroetilo, 1,1,1-trifluoroetilo, perfluoroetilo, etc.

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

“Grupo protector” se refiere a un grupo de átomos que, cuando se unen a un grupo funcional reactivo en una molécula, enmascaran, reducen o previenen la reactividad del grupo funcional. Normalmente, un grupo protector puede eliminarse selectivamente cuando se desee durante el transcurso de una síntesis. Pueden encontrarse ejemplos de grupos protectores en Greene y Wuts, *Protective Groups in Organic Chemistry*, 3ª ed., 1999, John Wiley & Sons, NY y Harrison *et al.*, *Compendium of Synthetic Organic Methods*, vol. 1-8, 1971-1996, John Wiley & Sons, NY. Los grupos protectores de amino representativos incluyen, pero no se limitan a, formilo, acetilo, trifluoroacetilo, bencilo, benciloxicarbonilo (“CBZ”), terc-butoxicarbonilo (“Boc”), trimetilsililo (“TMS”), 2-trimetilsilil-etanosulfonilo (“TES”), grupos tritilo y tritilo sustituidos, aliloxicarbonilo, 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (“Fmoc”), nitroveratriloalcoxilo (“NVOC”) y similares. Los grupos protectores de hidroxilo representativos incluyen, pero no se limitan a, aquellos en los que el grupo hidroxilo está o bien acilado o alquilado tal como bencilo y éteres de tritilo, así como éteres de alquilo, éteres de tetrahidropiraniilo, éteres de trialkilsililo (por ejemplo, grupos TMS o TIPPS) y éteres de alilo.

“Profármaco” se refiere a un derivado de un compuesto de 2,4-pirimidindiamina activo (fármaco) que requiere una transformación en las condiciones de uso, tal como dentro del cuerpo, para liberar el fármaco de 2,4-pirimidindiamina activo. Los profármacos son de manera frecuente, pero no necesariamente, farmacológicamente inactivos hasta que se convierten en el fármaco activo. Los profármacos se obtienen normalmente enmascarando un grupo funcional en el fármaco de 2,4-pirimidindiamina, que se cree que se requiere en parte para la actividad, con un progrupo (definido a continuación) para formar un proresto que sufre una transformación, tal como escisión, en las condiciones de uso especificadas para liberar el grupo funcional, y por tanto el fármaco de 2,4-pirimidindiamina

activo. La escisión del prorroto puede realizarse de manera espontánea, tal como mediante una reacción de hidrólisis, o puede estar catalizada o inducida por otro agente, tal como por una enzima, por la luz, por un ácido o una base, o por un cambio de o exposición a parámetros físicos o ambientales, tal como un cambio de temperatura. El agente puede ser endógeno en las condiciones de uso, tal como una enzima presente en la células a las que se administra el profármaco o las condiciones ácidas del estómago, o puede suministrarse de manera exógena.

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

“Progrupo” se refiere a un tipo de grupo protector que, cuando se usa para enmascarar un grupo funcional dentro de un fármaco de 2,4-pirimidindiamina activo para formar un prorroto, convierte al fármaco en un profármaco. Los progrupos se unen normalmente al grupo funcional del fármaco mediante enlaces que pueden escindirse en las condiciones de uso especificadas. Por tanto, un progrupo es la parte de un prorroto que se escinde para liberar el grupo funcional en las condiciones de uso especificadas. Como ejemplo específico, un prorroto amida de fórmula -NH-C(O)CH₃ comprende el progrupo -C(O)CH₃.

“Receptor de Fc” se refiere a un miembro de la familia de moléculas de la superficie celular que se une a la parte Fc (que contiene la región constante específica) de una inmunoglobulina. Cada receptor de Fc se une a inmunoglobulinas de un tipo específico. Por ejemplo el receptor Fcα (“FcαR”) se une a IgA, el FcεR se une a IgE y el FcγR se une a IgG.

La familia FcαR incluye el receptor de Ig polimérico implicado en el transporte epitelial de IgA/IgM, el receptor específico mieloides RcαRI (también denominado CD89), el Fcα/μR y al menos dos receptores de IgA alternativos (para un revisión reciente véase Monteiro & van de Winkel, 2003, Annu. Rev. Immunol, advanced e-publication). El FcαRI se expresa en neutrófilos, eosinófilos, monocitos/macrófagos, células dendríticas y células de Kupfer. El FcαRI incluye un cadena alfa y el homodímero de gamma de FcR que porta un motivo de activación (ITAM) en el dominio citoplasmático y fosforila Syk cinasa.

La familia FcεR incluye dos tipos, designados FcεRI y FcεRII (también conocidos como CD23). FcεRI es un receptor de alta afinidad (se une a IgE con una afinidad de aproximadamente 10¹⁰ M⁻¹) hallado en mastocitos, basófilos y eosinófilos, que ancla IgE monomérica a la superficie celular. El FcεRI presenta una cadena alfa, una cadena beta y el homodímero de cadena gamma mencionado anteriormente. The FcεRII es un receptor de baja afinidad expresado en fagocitos mononucleares, linfocitos B, eosinófilos y plaquetas. El FcεRII comprende una cadena polipeptídica sencilla y no incluye el homodímero de cadena gamma.

La familia FcγR incluye tres tipos, designados FcγRI (también conocido como CD64), FcγRII (también conocido como CD32) y FcγRIII (también conocido como CD16). FcγRI es un receptor de alta afinidad (se une a IgG1 con una afinidad de 10⁸ M⁻¹) hallado 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 mencionado anteriormente.

El FcγRIII es un receptor de baja afinidad (se une IgG1 con una afinidad de 5x10⁵ M⁻¹) expresado en células NK, eosinófilos, macrófagos, neutrófilos y mastocitos. Comprende una cadena alfa y el homodímero de gamma compartido por FcαRI, FcεRI y FcγRI.

Los expertos en la técnica reconocerán que las propiedades de unión y la estructura de subunidades de estos diversos receptores de Fc, tipos celulares que los expresan, no están completamente caracterizados. La explicación anterior refleja meramente el estado de la técnica actual en relación con estos receptores (véase, por ejemplo, Immunobiology: The Immune System in Health & Disease, 5ª edición, Janeway *et al.*, Eds, 2001, ISBN 0-8153-3642-x, figura 9,30 en la pág. 371), y no se pretende que sea limitativa con respecto a la multitud de cascadas de señalización de receptores que pueden regularse con los compuestos descritos en el presente documento.

“Desgranulación mediada por receptores de Fc” o “desgranulación inducida por receptores de Fc” se refiere a la desgranulación que se realiza mediante una cascada de transducción de señales de receptores 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 realiza mediante la cascada de transducción de señales del receptor de IgE iniciada por la reticulación de IgE unida a FcεRI. La reticulación puede inducirse por un alérgeno específico para IgE u otro agente de unión multivalente, tal como un anticuerpo anti IgE. Haciendo referencia a la figura 2, en mastocitos y/o basófilos, la cascada de señalización de FcεRI que conduce a desgranulación puede dividirse en dos fases: anterior y posterior. La fase anterior incluye todos los procesos que se producen antes de la movilización del ión calcio (ilustrado como “Ca²⁺” en la figura 2; véase también la figura 3). La fase posterior incluye la movilización del ión calcio y todos los procedimientos posteriores de la misma. Los compuestos que inhiben la desgranulación mediada por FcεRI pueden actuar en cualquier punto a lo largo de la cascada de transducción de señales mediada por FcεRI. Los compuestos que inhiben selectivamente la desgranulación mediada por FcεRI anterior actúan inhibiendo la parte de la cascada de señalización de FcεRI anterior al punto en el que se induce la movilización de ión 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 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 evitan la ruta de señalización de FcεRI, tal 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 realiza mediante la cascada de transducción de señales de FcγRI iniciada por la reticulación de IgG unida a FcγRI. La reticulación puede inducirse por un alérgeno específico de IgG u otro agente de unión multivalente, tal como un anticuerpo anti-IgG o fragmento. Al igual que la cascada de señalización de FcεRI, en mastocitos y basófilos la cascada de señalización de FcγRI también conduce a desgranulación que puede dividirse en las mismas dos fases: anterior y posterior. De manera similar a la desgranulación mediada por FcεRI, los compuestos que inhiben selectivamente la desgranulación mediada por FcγRI anterior, actúan antes del punto en el que se induce la movilización de ión 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 alérgeno específico de IgG (tal como un anticuerpo anti-IgG o fragmento) pero no inhiben de manera apreciable la desgranulación de células que se activan o estimulan con agentes de desgranulación que evitan la ruta de señalización de FcγRI, tal 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 basófilo, que se produce tras la exposición a un ionóforo de calcio tal como, por ejemplo, ionomicina o A23187.

“Syk cinasa” se refiere a la proteína tirosina cinasa del bazo no receptora (citoplasmática) de 72 kDa bien conocida expresada en células B y otras células hematopoyéticas. La Syk cinasa incluye dos dominios de homología a Src de tipo 2 (SH2) de consenso en tándem que se unen a motivos de activación basados en tirosina de inmunorreceptores fosforilados (“ITAM”), un dominio “ligador” y un dominio catalítico (para una revisión de la estructura y la función de Syk cinasa véase Sada *et al.*, 2001, *J. Biochem. (Tokio)* 130:177-186); véase también Turner *et al.*, 2000, *Immunology Today* 21:148-154). La Syk cinasa se ha estudiado ampliamente como un efector de la señalización del receptor de células B (BCR) (Turner *et al.*, 2000, citado anteriormente). La Syk cinasa también es crítica para la fosforilación de tirosina de múltiples proteínas que regulan rutas importantes dirigidas por inmunorreceptores, tales como cascadas de movilización de Ca²⁺ y proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) (véase, por ejemplo, la figura 2) y desgranulación. La Syk cinasa también desempeña un papel crítico en la señalización de integrina en neutrófilos (véase, por ejemplo, Mocsai *et al.* 2002, *Immunity* 16:547-558).

Tal como se usa en el presente documento, Syk cinasa incluye cinasas de cualquier especie animal, incluyendo pero sin limitarse a, *Homo sapiens*, de simios, bovinas, porcinas, de roedores, etc., que se reconoce que pertenecen a la familia Syk. Específicamente, se incluyen isoformas, variantes de corte y empalme, variantes alélicas, mutantes, tanto naturales como producidas por el hombre. Las secuencias de aminoácidos de tales Syk cinasas se conocen bien y están disponibles de GENBANK. Pueden encontrarse ejemplos específicos de ARNm que codifican para diferentes isoformas de Syk cinasa humana en el n.º de registro de GENBANK gij21361552[ref|NM_003177.2], gij496899[emb|Z29630.1|HSSYKPTK[496899] y gij15030258[gb|BC011399.1|BC011399[15030258], que se incorporan en el presente documento como referencia.

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

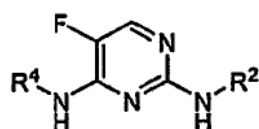
documento.

“Cascada de señalización dependiente de Syk” se refiere a una cascada de transducción de señales en la que la Syk cinasa desempeña un papel. Los ejemplos no limitativos de tales 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.

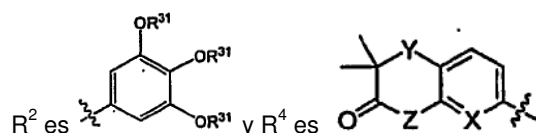
“Enfermedad autoinmunitaria” se refiere a aquellas enfermedades que están asociadas comúnmente con las reacciones de hipersensibilidad no anafilácticas (reacciones de hipersensibilidad de tipo II, tipo III y/o tipo IV) que generalmente resultan como consecuencia de la propia respuesta inmunitaria humoral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

Los compuestos de 2,4-pirimidindiamina

Los compuestos de la invención son compuestos de 2,4-pirimidindiamina que son de fórmula estructural:



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



en los que

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

Y se selecciona del grupo que consiste en O, S, SO, SO₂, SONR³⁶, NH, NR³⁵;

Z se selecciona del grupo que consiste en O, S, SO, SO₂, SONR³⁶, NH, NR³⁵;

cada R³¹ es independientemente alquilo (C1-C6);

cada R³⁵, independientemente de los otros, se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno y R⁸;

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

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

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

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

R^b adecuados iguales o diferentes;

cada R^d es independientemente R^a;

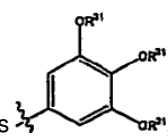
5 cada m es independientemente un número entero desde 1 hasta 3;

cada n es independientemente un número entero desde 0 hasta 3; y

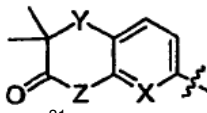
R³⁶ se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo (C1-C6).

10

Realizaciones específicas adicionales de los compuestos de 2,4-pirimidindiamina de la invención se describen a continuación.

En una realización de los compuestos de la invención R² es  en la que cada R³¹, independientemente

15

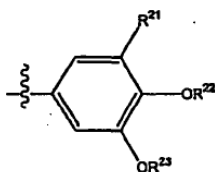
de los otros, es metilo o alquilo (C1-C6) y R⁴ es . En particular, Y es O, Z es NH y X es N. En un aspecto particular, Y es O, Z es NH, X es N y cada R³¹ es metilo.

20

En determinadas realizaciones, los compuestos dados a conocer en las solicitudes de patente estadounidenses n.^{os} de serie 10/631.029, presentada el 29 de julio de 2003 y 10/355.543, presentada el 31 de enero de 2003, respectivamente, no se incluyen dentro del alcance de la presente solicitud.

En otra realización de los compuestos de la invención R² y R⁴ son tal como se describieron previamente con la condición de que R² no sea 3,4,5-trimetoxifenilo, 3,4,5-trialcoxifenilo (C1-C6) o

25



en el que R²¹, R²² y R²³ son tal como se definieron para R¹, R² y R³, respectivamente de la patente estadounidense n.^o 6.235.746

30

En un aspecto específico de esta realización, R²¹ es metoxilo opcionalmente sustituido con uno o más de grupos halo iguales o diferentes y/o R²² y R²³ son cada uno, independientemente entre sí, un metilo o etilo opcionalmente sustituido con uno o más de grupos halo iguales o diferentes.

35

También se describen específicamente combinaciones de las realizaciones anteriores.

40

Los expertos en la técnica apreciarán que los compuestos de 2,4-pirimidindiamina descritos en el presente documento pueden incluir grupos funcionales que pueden enmascarse con progrupos para crear profármacos. Tales profármacos son habitualmente, aunque no es necesario, farmacológicamente inactivos hasta que se convierten en su forma de fármaco activa. De hecho, muchos de los compuestos de 2,4-pirimidindiamina activos descritos en la tabla 1, incluyen prorestos que pueden hidrolizarse o escindirarse de otro modo en condiciones de uso. Por ejemplo, los grupos éster experimentan comúnmente hidrólisis catalizada por ácido para proporcionar el ácido carboxílico original cuando se exponen a las condiciones ácidas del estómago, o hidrólisis catalizada por base cuando se exponen a las condiciones básicas del intestino o de la sangre. Por tanto, cuando se administran a un sujeto por vía oral, las 2,4-pirimidindiaminas que incluyen restos éster pueden considerarse profármacos de su ácido carboxílico correspondiente, independientemente de si la forma éster es farmacológicamente activa. Haciendo referencia a la tabla 1, numerosas 2,4-pirimidindiaminas que contienen éster de la invención son activas en su forma éster, de "profármaco".

50

En los profármacos de los compuestos de la invención, cualquier resto funcional disponible puede enmascarse con un progrupo para proporcionar un profármaco. Los grupos funcionales dentro de los compuestos de 2,4-pirimidindiamina que pueden enmascarse con progrupos para la inclusión en un proresto incluyen, pero no se limitan a, aminas (primarias y secundarias), hidroxilos, sulfanilos (tioles), carboxilos, etc. En la técnica se conocen multitud de progrupos adecuados para enmascarar tales grupos funcionales para proporcionar prorestos que

pueden escindirse en las condiciones de uso deseadas. Todos estos progrupos, solos o en combinaciones, pueden incluirse en los profármacos de los compuestos de la invención.

5 En una realización ilustrativa, los profármacos de los compuestos de la invención, son compuestos de la invención en los que R^c y R^d están sustituidos con un progrupo.

Los expertos en la técnica apreciarán que muchos de los compuestos de la invención y profármacos de los mismos, así como las diversas especies de compuestos descritas y/o ilustradas específicamente en el presente documento, pueden mostrar los fenómenos de tautomería, isomería conformacional, isomería geométrica y/o isomería óptica. 10 Por ejemplo, los compuestos de la invención y profármacos de los mismos incluyen uno o más centros quirales y/o dobles enlaces y como consecuencia pueden existir como estereoisómeros, tales como isómeros del doble enlace (es decir, isómeros geométricos), enantiómeros y diastereómeros y mezclas de los mismos, tal como mezclas racémicas. Como otro ejemplo, los compuestos de la invención y profármacos de los mismos pueden existir en varias formas tautoméricas, incluyendo la forma enólica, la forma ceto y mezclas de las mismas. Como los diversos nombres de compuesto, fórmulas y dibujos de compuesto dentro de la memoria descriptiva y las reivindicaciones 15 pueden representar sólo una de las posibles formas tautoméricas, isomérica conformacional, isomérica óptica o isomérica geométrica, debe entenderse que la invención abarca cualquier forma tautomérica, isomérica conformacional, isomérica óptica o isomérica geométrica de los compuestos que tienen una o más de las utilidades descritas en el presente documento, así como mezclas de estas diversas formas isoméricas diferentes. En casos de 20 rotación limitada alrededor de la estructura de núcleo de 2,4-pirimidindiamina, también son posibles atropoisómeros y también se incluyen específicamente en los compuestos de la invención.

Además, los expertos en la técnica apreciarán que cuando las listas de sustituyentes alternativos incluyen miembros que, debido a requerimientos de valencia u otras razones, no pueden usarse para sustituir un grupo particular, se 25 pretende que las listas se lean en el contexto de incluir aquellos miembros de la lista que son adecuados para sustituir el grupo particular. Por ejemplo, los expertos en la técnica apreciarán que mientras que pueden usarse todas las alternativas enumeradas para R^b para sustituir un grupo alquilo, determinadas alternativas, tales como =O, no pueden usarse para sustituir un grupo fenilo. Debe entenderse que sólo se pretenden combinaciones posibles de parejas de sustituyente-grupo. 30

Los compuestos de la invención y profármacos de los mismos pueden identificarse o bien por su estructura química o bien por su nombre químico. Cuando la estructura química y el nombre químico están en conflicto, la estructura química es determinante de la identidad del compuesto específico.

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

40 En una realización, la sal es una sal farmacéuticamente aceptable. En general, sales farmacéuticamente aceptables son aquellas sales que mantienen sustancialmente una o más de las actividades farmacológicas deseadas del compuesto original y que son adecuadas para la administración a seres humanos. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de adición de ácido formadas con ácidos inorgánicos o ácidos orgánicos. Los ácidos 45 inorgánicos adecuados para formar sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables incluyen, a modo de ejemplo y no de limitación, hidrácidos halogenados (por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido yodhídrico, etc.), ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares. Los ácidos orgánicos adecuados para formar sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables incluyen, a modo de ejemplo y no de limitación, ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido propiónico, ácido hexanoico, ácido ciclopentanopropiónico, ácido glicólico, ácido oxálico, ácido pirúvico, ácido láctico, ácido malónico, ácido succínico, ácido málico, ácido maleico, ácido 50 fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido palmítico, ácido benzoico, ácido 3-(4-hidroxibenzoil)benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácidos alquilosulfónicos (por ejemplo, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido 1,2-etano-disulfónico, ácido 2-hidroxietanosulfónico, etc.), ácidos arilsulfónicos (por ejemplo, ácido bencenosulfónico, ácido 4-clorobencenosulfónico, ácido 2-naftalenosulfónico, ácido 4-toluenosulfónico, ácidos cicloalquilosulfónicos (por ejemplo, ácido canforsulfónico), ácido 4-metilbicyclo[2.2.2]-oct-2-en-1-carboxílico, ácido glucoheptónico, ácido 3- 55 fenilpropiónico, ácido trimetilacético, ácido butilacético terciario, ácido laurilsulfónico, ácido glucónico, ácido glutámico, ácido hidroxinaftoico, ácido salicílico, ácido esteárico, ácido mucónico y similares.

Las sales farmacéuticamente aceptables también incluyen sales formadas cuando un protón ácido presente en el compuesto original o bien se sustituye por un ión metálico (por ejemplo, un ión de metal alcalino, un ión de metal 60 alcalinotérreo o un ión de aluminio), un ión de amonio o bien se coordina con una base orgánica (por ejemplo, etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, N-metilglucamina, morfolina, piperidina, dimetilamina, dietilamina, etc.).

Los compuestos de 2,4-pirimidindiamina de la invención, así como las sales de los mismos, también pueden estar en forma de hidratos, solvatos y N-óxidos, como se conoce bien en la técnica.

65

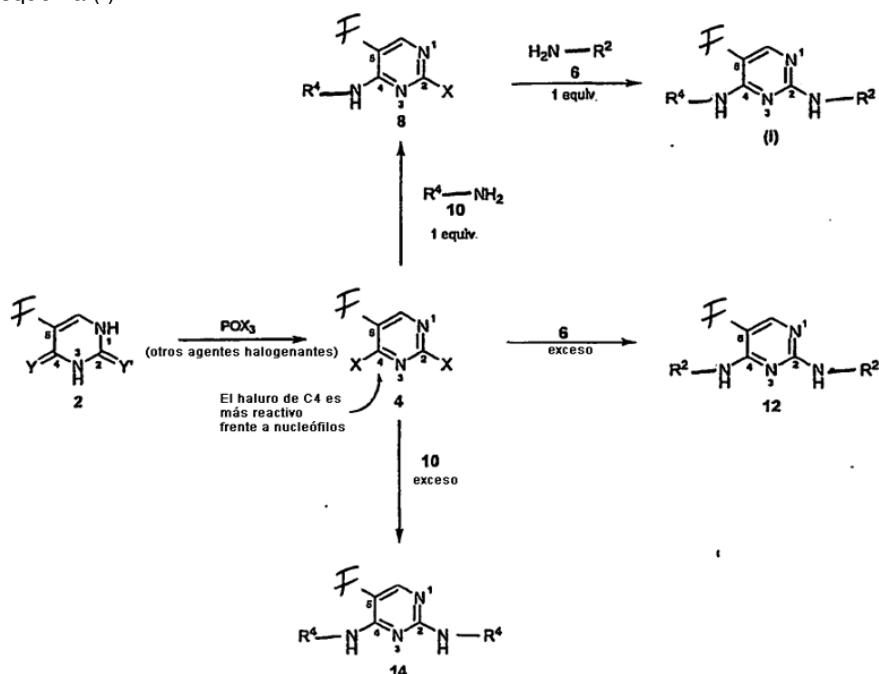
Métodos de síntesis

Los compuestos de la invención y profármacos de los mismos pueden sintetizarse mediante una variedad de diferentes rutas sintéticas usando materiales de partida disponibles comercialmente y/o materiales de partida preparados mediante métodos de síntesis convencionales. Métodos a modo de ejemplos adecuados que pueden adaptarse de manera rutinaria para sintetizar los compuestos de 2,4-pirimidindiamina de la invención y profármacos de los mismos se encuentran en la patente estadounidense n.º 5.958.935, la solicitud de patente estadounidense n.º 10/355.543, presentada el 31 de enero de 2003 (publicación estadounidense US 20040029902 A1), el documento WO 03/063794, publicado el 1 de agosto de 2003, la solicitud de patente estadounidense n.º 10/631.029, presentada el 29 de julio de 2003 y el documento WO 2004/014382, publicado el 19 de febrero de 2004. Todos los compuestos de la invención y la fórmula estructural (II) pueden prepararse mediante adaptación rutinaria de estos métodos.

En los esquemas (I)-(XI), a continuación, se describe una variedad de rutas sintéticas a modo de ejemplo que pueden usarse para sintetizar los compuestos de 2,4-pirimidindiamina de la invención. En los esquemas (I)-(XI), los compuestos numerados igual tienen estructuras similares. Estos métodos pueden adaptarse de manera rutinaria para sintetizar los profármacos según la fórmula estructural (II).

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

Esquema (I)



En el esquema (I), R^2 y R^4 , son tal como se definieron previamente, X es un halógeno (por ejemplo, F, Cl, Br o I) e Y e Y' se seleccionan cada uno, independientemente entre sí, del grupo que consiste en O y S. Haciendo referencia al esquema (I), el uracilo o tiouracilo 2 se dihalogena en las posiciones 2 y 4 usando el agente halogenante convencional POX_3 (u otro agente halogenante convencional) en condiciones convencionales para proporcionar la 2,4-bishalopirimidina 4. Pueden obtenerse las 2N,4N-bis(sustituidas)-2,4-pirimidindiaminas 12 y 14 haciendo reaccionar la 2,4-bishalopirimidina 4 con 6 ó 10 en exceso, respectivamente.

Puede controlarse la regioselectividad de la reacción ajustando el disolvente y otras condiciones de síntesis (tales como la temperatura), tal como se conoce bien en la técnica.

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

Los materiales de partida uracilo o tiouracilo 2 pueden adquirirse de fuentes químicas o prepararse usando técnicas convencionales de química orgánica. Los uracilos y tiouracilos disponibles comercialmente que pueden usarse como materiales de partida en el esquema (I) incluyen, a modo de ejemplo y no de limitación, uracilo (Aldrich n.º 13.078-8; registro CAS 66-22-8); 2-tiouracilo (Aldrich n.º 11.558-4; registro CAS 141-90-2); 2,4-ditiouracilo (Aldrich n.º 15.846-1; registro CAS 2001-93-6); 5-acetouracilo (Chem. Sources Int'1 2000; registro CAS 6214-65-9); 5-azidouracilo; 5-

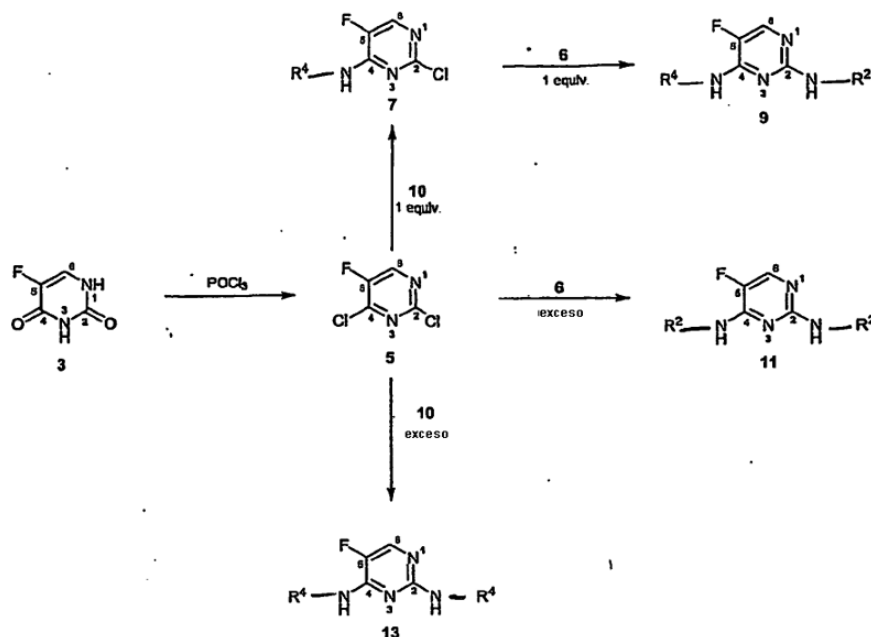
aminouracilo (Aldrich n.º 85.528-6; registro CAS 932-52-5); 5-bromouracilo (Aldrich n.º 85.247-3; registro CAS 51-20-7); 5-(trans-2-bromovinil)-uracilo (Aldrich n.º 45.744-2; registro CAS 69304-49-0); 5-(trans-2-clorovinil)-uracilo (registro CAS 81751-48-2); 5-(trans-2-carboxivinil)-uracilo; ácido uracil-5-carboxílico (ácido 2,4-dihidroxipirimidin-5-carboxílico hidratado; Aldrich n.º 27.770-3; registro CAS 23945-44-0); 5-clorouracilo (Aldrich n.º 22.458-8; registro CAS 1820-81-1); 5-cianouracilo (Chem. Sources Int'1 2000; registro CAS 4425-56-3); 5-etiluracilo (Aldrich n.º 23.044-8; registro CAS 4212-49-1); 5-eteniluracilo (registro CAS 37107-81-6); 5-fluorouracilo (Aldrich n.º 85.847-1; registro CAS 51-21-8); 5-yodouracilo (Aldrich n.º 85.785-8; registro CAS 696-07-1); 5-metiluracilo (timina; Aldrich n.º 13.199-7; registro CAS 65-71-4); 5-nitouracilo (Aldrich n.º 85.276-7; registro CAS 611-08-5); ácido uracil-5-sulfámico (Chem. Sources Int'1 2000; registro CAS 5435-16-5); 5-(trifluorometil)-uracilo (Aldrich n.º 22.327-1; registro CAS 54-20-6); 5-(2,2,2-trifluoroetil)-uracilo (registro CAS 155143-31-6); 5-(pentafluoroetil)-uracilo (registro CAS 60007-38-3); 6-aminouracilo (Aldrich n.º A5060-6; registro CAS 873-83-6) ácido uracil-6-carboxílico (ácido orótico; Aldrich n.º 0-840-2; registro CAS 50887-69-9); 6-metiluracilo (Aldrich n.º D11.520-7; registro CAS 626-48-2); ácido uracil-5-amino-6-carboxílico (ácido 5-aminoorótico; Aldrich n.º 19.121-3; registro CAS n.º 7164-43-4); 6-amino-5-nitrosouracilo (6-amino-2,4-dihidroxi-5-nitrosopirimidina; Aldrich n.º 27.689-8; registro CAS 5442-24-0); ácido uracil-5-fluoro-6-carboxílico (ácido 5-fluoroorótico; Aldrich n.º 42.513-3; registro CAS 00000-00-0); y ácido uracil-5-nitro-6-carboxílico (ácido 5-nitroorótico; Aldrich n.º 18.528-0; registro CAS 600779-49-9). Uracilos y/o tiouracilos 5-, 6- y 5,6-sustituidos están disponibles de General Intermediates of Canada, Inc., Edmonton, Alberta, CA (www.generalintermediates.com) y/o Interchim, Francia (www.interchim.com), o pueden prepararse usando técnicas convencionales. Se proporcionan a continuación multitud de referencias de libros de texto que enseñan métodos de síntesis adecuados.

Pueden adquirirse las aminas 6 y 10 de fuentes químicas o, alternativamente, pueden sintetizarse utilizando técnicas convencionales. Por ejemplo, pueden sintetizarse aminas adecuadas a partir de precursores nitro usando química convencional. Se proporcionan reacciones a modo de ejemplo específicas en la sección de ejemplos. Véase también Vogel, 1989, Practical Organic Chemistry, Addison Wesley Longman, Ltd. y John Wiley & Sons, Inc.

Los expertos en la técnica reconocerán que en algunos casos, las aminas 6 y 10 y/o el uracilo o tiouracilo 2 pueden incluir grupos funcionales que requieren protección durante la síntesis. La identidad exacta de cualquier grupo(s) protector(es) usado(s) dependerá de la identidad del grupo funcional que está protegiéndose, y resultará evidente para los expertos en la técnica. Puede encontrarse orientación para seleccionar grupos protectores apropiados, así como estrategias de síntesis para su unión y eliminación, por ejemplo, en Greene & Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 3ª edición, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York (1999) y las referencias citadas en el mismo (a continuación en el presente documento "Greene & Wuts").

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

Esquema (Ia)

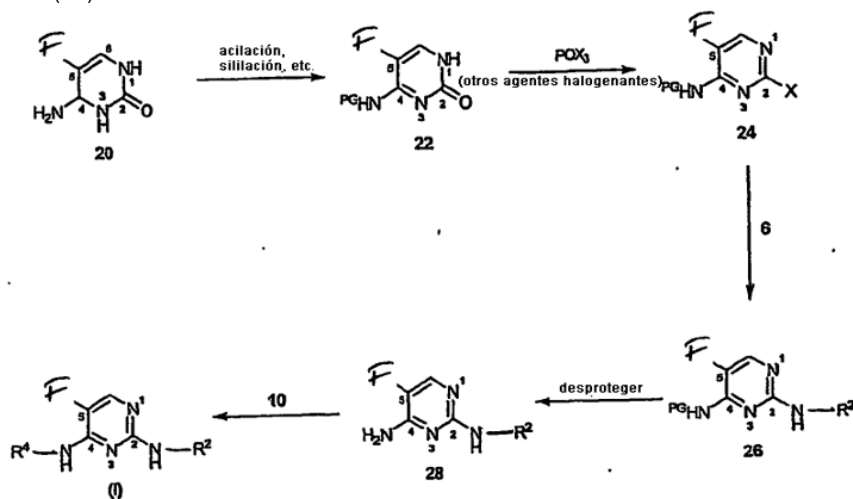


En el esquema (Ia), R^2 , R^4 , son tal como se definieron previamente para el esquema (I). Según el esquema (Ia), se halogena el 5-fluorouracilo 3 con POCl_3 para proporcionar la 2,4-dicloro-5-fluoropirimidina 5, que entonces se hace reaccionar con la amina 6 ó 10 en exceso para proporcionar la N2,N4-bisustituida-5-fluoro-2,4-pirimidindiamina 11 ó

13, respectivamente. Alternativamente, puede obtenerse la no bis 2N,4N-(disustituida)-5-fluoro-2,4-pirimidindiamina 9 haciendo reaccionar la 2,4-dicloro-5-fluoropirimidina 5 con un equivalente de la amina 10 (para proporcionar la 2-cloro-N4-sustituida-5-fluoro-4-pirimidinamina 7) seguido por uno o más equivalentes de la amina 6.

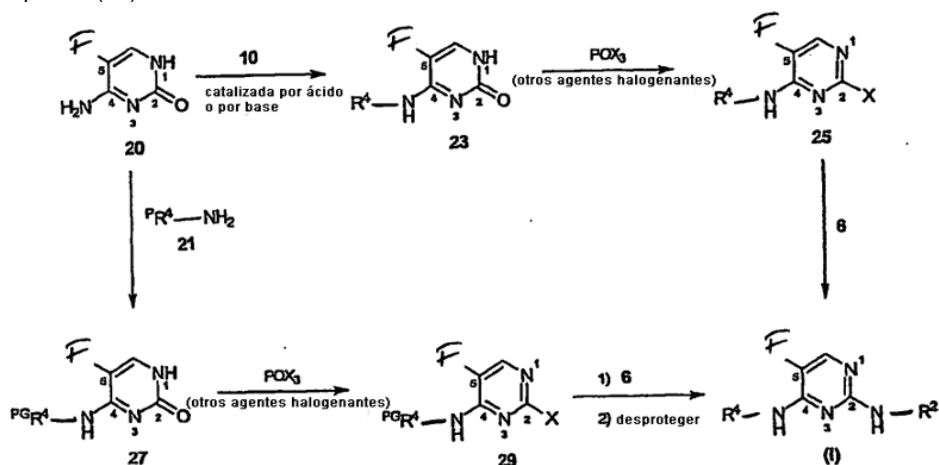
- 5 En otra realización a modo de ejemplo, los compuestos de 2,4-pirimidindiamina de la invención pueden sintetizarse a partir de citosina sustituidas o no sustituidas tal como se ilustra en los esquemas (IIa) y (IIb), a continuación:

Esquema (IIa)



10

Esquema (IIb)



- 15 En los esquemas (IIa) y (IIb), R^2 , R^4 , R^5 , R^6 , L^1 , L^2 y X son tal como se definieron previamente para el esquema (I) y PG representa un grupo protector. En referencia al esquema (IIa), la amina excíclica de C4 de la citosina 20 se protege en primer lugar con un grupo protector PG adecuado para proporcionar la citosina protegida en N4 22. Para orientación específica referente a grupos protectores útiles en este contexto, véase Vorbrüggen y Ruh-Pohlentz, 2001, Handbook of Nucleoside Synthesis, John Wiley & Sons, NY, págs. 1-631 ("Vorbrüggen"). La citosina protegida 22 se halogena en la posición C2 usando un reactivo halogenante convencional en condiciones convencionales para proporcionar la 2-cloro-4N-protegida-4-pirimidinamina 24. La reacción con la amina 6 seguido por desprotección de la amina excíclica de C4 y reacción con la amina 10 proporciona una 2,4-pirimidindiamina según la fórmula estructural (I).

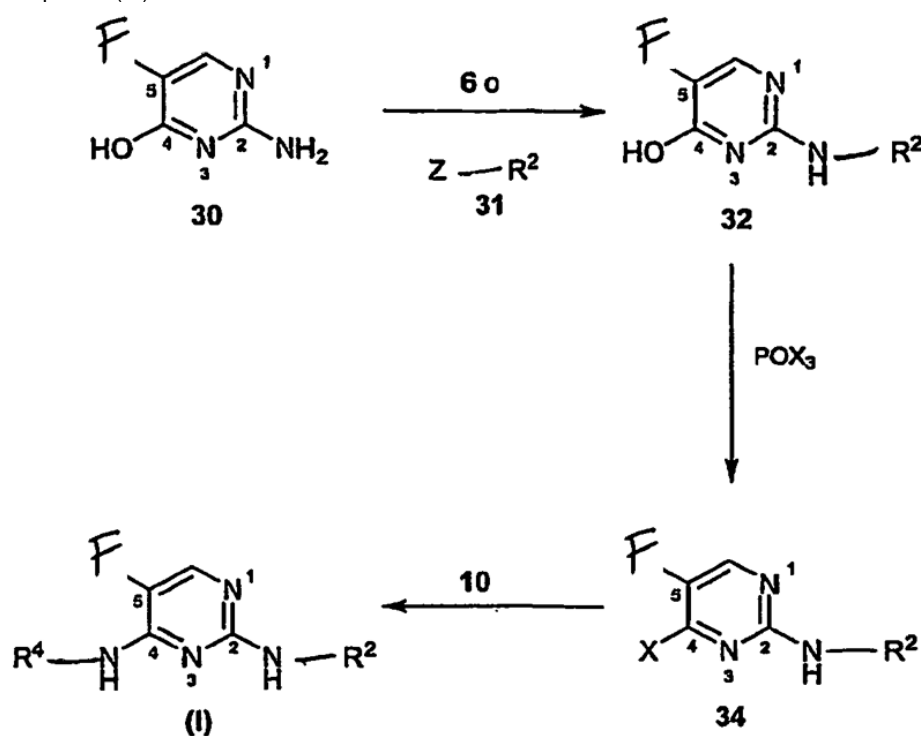
- 25 Alternativamente, en referencia al esquema (IIb), la citosina 20 puede hacerse reaccionar con la amina 10 o la amina protegida 21 para proporcionar la citosina N4-sustituida 23 ó 27, respectivamente. Estas citosinas sustituidas pueden halogenarse entonces tal como se describió previamente, desprotegerse (en el caso de la citosina N4-sustituida 27) y hacerse reaccionar con la amina 6 para proporcionar una 2,4-pirimidindiamina según la fórmula estructural (I).

- 30 Las citosinas disponibles comercialmente que pueden usarse como materiales de partida en los esquemas (IIa) y (IIb) incluyen, pero no se limitan a, citosina (Aldrich n.º 14.201-8; registro CAS 71-30-7); N4-acetilcitosina (Aldrich n.º 37.791-0; registro CAS 14631-20-0); 5-fluorocitosina (Aldrich n.º 27.159-4; registro CAS 2022-85-7); y 5-(trifluorometil)-citosina. Otras citosinas adecuadas como materiales de partida en los esquemas (IIa) están

disponibles de General Intermediates of Canada, Inc., Edmonton, Alberta, CA (www.generalintermediates.com) y/o Interchim, Francia (www.interchim.com), o pueden prepararse usando técnicas convencionales. Se proporcionan a continuación multitud de referencias de libros de texto que enseñan métodos de síntesis adecuados.

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

Esquema (III)



10

En el esquema (III), R², R⁴ y X son tal como se definieron previamente para el esquema (I) y Z es un grupo saliente tal como se comenta en más detalle en relación con el esquema IV, a continuación. En referencia al esquema (III), se hace reaccionar el 2-amino-4-pirimidinol 30 con la amina 6 (u opcionalmente la amina protegida 21) para proporcionar el N2-sustituido-4-pirimidinol 32, que entonces se halogena tal como se describió previamente para proporcionar la N2-sustituida-4-halo-2-pirimidinamina 34. La desprotección opcional (por ejemplo si se usa la amina protegida 21 en la primera etapa) seguido por reacción con la amina 10 proporciona una 2,4-pirimidindiamina según la fórmula estructural (I). Alternativamente, el pirimidinol 30 puede hacerse reaccionar con el agente acilante 31.

15

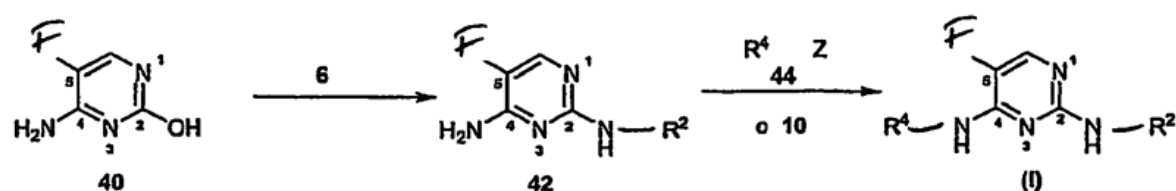
20 Los 2-amino-4-pirimidinoleos 30 disponibles comercialmente adecuados que pueden usarse como materiales de partida en el esquema (III) incluyen, pero no se limitan a, 2-amino-6-cloro-4-pirimidinol hidratado (Aldrich n.º A4702-8; registro CAS 00000-00-0) y 2-amino-6-hidroxi-4-pirimidinol (Aldrich n.º A5040-1; registro CAS 56-09-7). Otros 2-amino-4-pirimidinoleos 30 útiles como materiales de partida en el esquema (III) están disponibles de General Intermediates of Canada, Inc., Edmonton, Alberta, CA (www.generalintermediates.com) y/o Interchim, Francia (www.interchim.com), o pueden prepararse usando técnicas convencionales. Se proporcionan a continuación multitud de referencias de libros de texto que enseñan métodos de síntesis adecuados.

25

Alternativamente, los compuestos de 2,4-pirimidindiamina de la invención pueden prepararse a partir de 4-amino-2-pirimidinoleos sustituidos o no sustituidos tal como se ilustra en el esquema (IV), a continuación:

30

Esquema (IV)



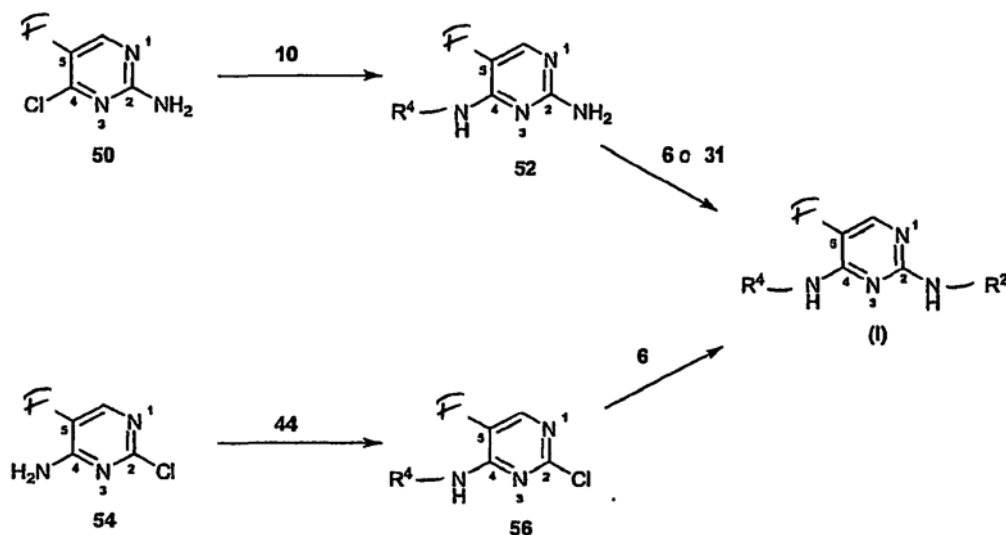
En el esquema (IV), R², R⁴ son tal como se definieron previamente para el esquema (I) y Z representa un grupo

saliente: en referencia al esquema (IV), el hidroxilo de C2 del 4-amino-2-pirimidinol 40 es más reactivo hacia nucleófilos que el amino de C4, de manera que la reacción con la amina 6 proporciona la N2-sustituída-2,4-pirimidindiamina 42. La reacción posterior con el compuesto 44, que incluye un buen grupo saliente Z, o la amina 10, proporciona una 2,4-pirimidindiamina según la fórmula estructural (I). El compuesto 44 puede incluir prácticamente cualquier grupo saliente que pueda desplazarse por el amino de C4 de la N2-sustituída-2,4-pirimidindiamina 42. Los grupos salientes Z adecuados incluyen, pero no se limitan a, halógenos, metanosulfoniloxilo (mesiloxilo; "OMs"), trifluorometanosulfoniloxilo ("OTf") y *p*-toluenosulfoniloxilo (tosiloxilo; "OTs"), bencenosulfoniloxilo ("besilato") y metanitrobenenosulfoniloxilo ("nosilato"). Otros grupos salientes adecuados resultarán evidentes para los expertos en la técnica.

Los materiales de partida de 4-amino-2-pirimidinol sustituido pueden obtenerse comercialmente o sintetizarse usando técnicas convencionales. Se proporcionan a continuación multitud de referencias de libros de texto que enseñan métodos de síntesis adecuados.

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

Esquema (V)

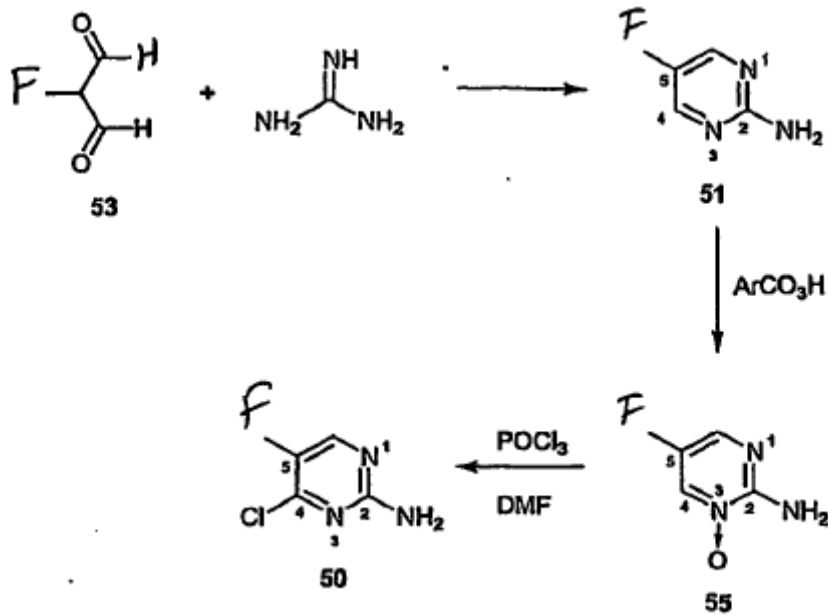


En el esquema (V), R², R⁴ y X son tal como se definieron para el esquema (I) y Z es tal como se definió para el esquema (IV). En referencia al esquema (V), se hace reaccionar la 2-amino-4-cloropirimidina 50 con el amino 10 para proporcionar la 4N-sustituída-2-pirimidinamina 52 que, tras reacción con el compuesto 31 o la amina 6, proporciona una 2,4-pirimidindiamina según la fórmula estructural (I). Alternativamente, puede hacerse reaccionar la 2-cloro-4-amino-pirimidina 54 con el compuesto 44 seguido por la amina 6 para proporcionar un compuesto según la fórmula estructural (I).

Están disponibles comercialmente una variedad de pirimidinas 50 y 54 adecuadas para su uso como materiales de partida en el esquema (V), incluyendo a modo de ejemplo y no de limitación, 2-amino-4,6-dicloropirimidina (Aldrich n.º A4860-1; registro CAS 56-05-3); 2-amino-4-cloro-6-metoxipirimidina (Aldrich n.º 51.864-6; registro CAS 5734-64-5); 2-amino-4-cloro-6-metilpirimidina (Aldrich n.º 12.288-2; registro CAS 5600-21-5); y 2-amino-4-cloro-6-metilpirimidina (Aldrich n.º A4600-5; registro CAS 1005-38-5). Materiales de partida de pirimidina adicionales están disponibles de General Intermediates of Canada, Inc., Edmonton, Alberta, CA (www.generalintermediates.com) y/o Interchim, Francia (www.interchim.com), o pueden prepararse usando técnicas convencionales. Se proporcionan a continuación multitud de referencias de libros de texto que enseñan métodos de síntesis adecuados.

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

Esquema (Va)

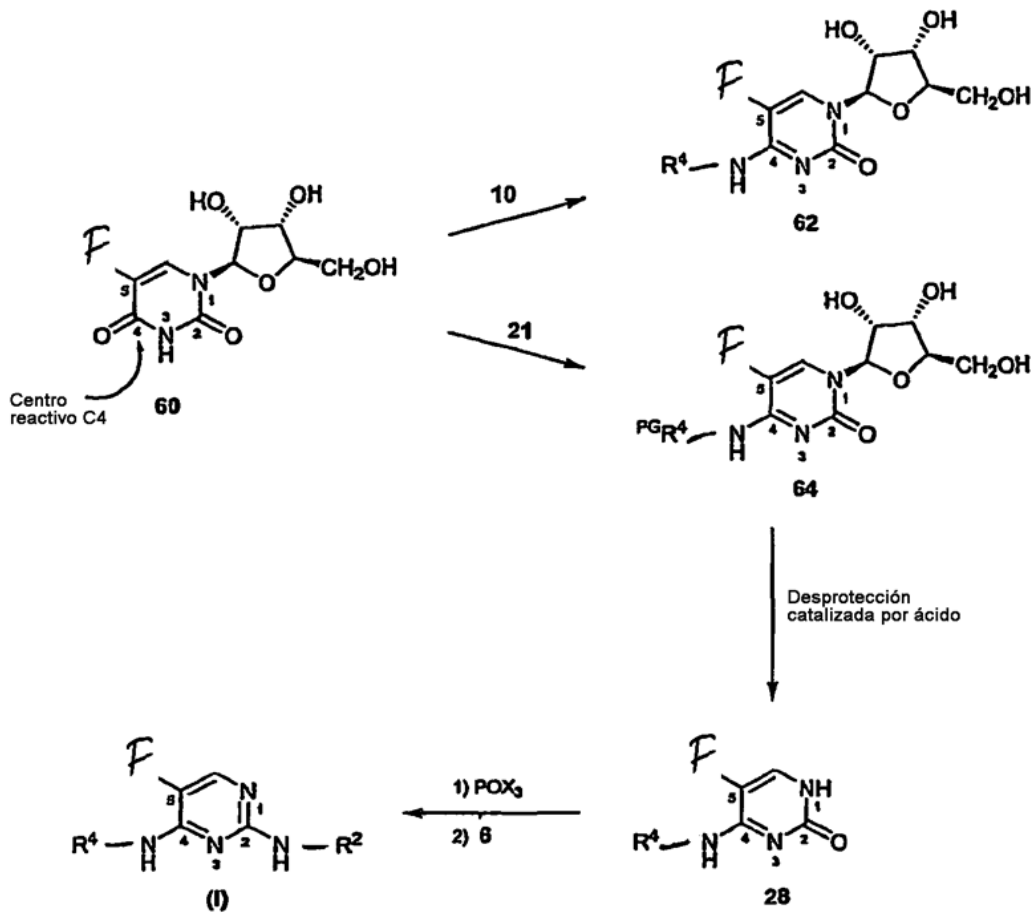


En el esquema (Va), se hace reaccionar el dicarbonilo 53 con guanidina para proporcionar la 2-pirimidinamina 51. La reacción con perácidos como ácido m-cloroperbenzoico, ácido trifluoroperacético o complejo de urea-peróxido de hidrógeno proporciona el N-óxido 55, que entonces se halogena para dar la 4-cloro-2-pirimidinamina 50. Las 4-halo-2-pirimidinaminas correspondientes pueden obtenerse usando reactivos halogenantes adecuados.

Aún en otra realización a modo de ejemplo, los compuestos de 2,4-pirimidindiamina de la invención pueden prepararse a partir de uridinas sustituidas o no sustituidas tal como se ilustra en el esquema (VI), a continuación:

10

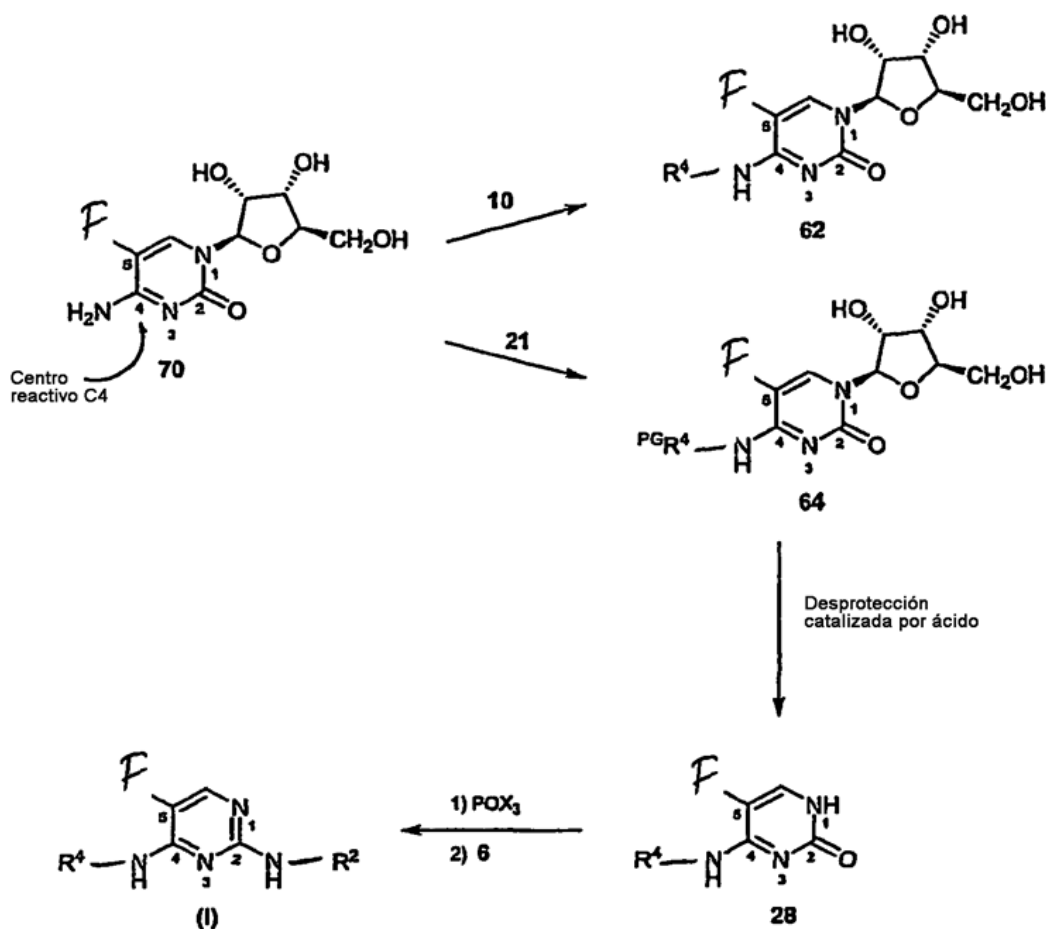
Esquema (VI)



En el esquema (VI), R², R⁴ y X son tal como se definieron previamente para el esquema (I) y el superíndice PG representa un grupo protector, tal como se comentó en relación con el esquema (IIb). Según el esquema (VI), la uridina 60 tiene un centro reactivo de C4 de manera que la reacción con la amina 10 o la amina protegida 21 proporciona la citidina N4-sustituida 62 ó 64, respectivamente. La desprotección catalizada por ácido de N4-sustituida 62 ó 64 (cuando "PG" representa un grupo protector lábil a ácido) proporciona la citosina N4-sustituida 28, que puede halogenarse posteriormente en la posición C2 y hacerse reaccionar con la amina 6 para proporcionar una 2,4-pirimidindiamina según la fórmula estructural (I).

También pueden usarse citidinas como materiales de partida de una manera análoga, tal como se ilustra en el esquema (VII), a continuación:

Esquema (VII)



- En el esquema (VII), R^2 , R^4 y X son tal como se definieron previamente en el esquema (I) y el superíndice PG representa un grupo protector tal como se comentó anteriormente. En referencia al esquema (VII), como la uridina 60, la citidina 70 tiene un centro reactivo de C4 de manera que la reacción con la amina 10 o la amina protegida 21 proporciona la citidina N4-sustituida 62 ó 64, respectivamente. Estas citidinas 62 y 64 se tratan entonces tal como se describió previamente para el esquema (VI) para proporcionar una 2,4-pirimidindiamina según la fórmula estructural (I).
- 10 Aunque los esquemas (VI) y (VII) se muestran a modo de ejemplo con ribonucleósidos, los expertos en la técnica apreciarán que también funcionarían los correspondientes 2'-desoxirribo y 2',3'-didesoxirribo nucleósidos, así como nucleósidos que incluyen azúcares o análogos de azúcar distintos de ribosa.
- 15 Se conocen en la técnica numerosas uridinas y citidinas útiles como materiales de partida en los esquemas (VI) y (VII) e incluyen, a modo de ejemplo y no de limitación, 5-trifluorometil-2'-desoxicitidina (Chem. Sources n.º ABCR F07669; registro CAS 66.384-66-5); 5-bromouridina (Chem. Sources Int'1 2000; registro CAS 957-75-5); 5-yodo-2'-desoxiuridina (Aldrich n.º 1-775-6; registro CAS 54-42-2); 5-fluorouridina (Aldrich n.º 32.937-1; registro CAS 316-46-1); 5-yodouridina (Aldrich n.º 85.259-7; registro CAS 1024-99-3); 5-(trifluorometil)uridina (Chem. Sources Int'1 2000; registro CAS 70-00-8); 5-trifluorometil-2'-desoxiuridina (Chem. Sources Int'1 2000; registro CAS 70-00-8). Uridinas y citidinas adicionales que pueden usarse como materiales de partida en los esquemas (VI) y (VII) están disponibles de General Intermediates of Canada, Inc., Edmonton, Alberta, CA (www.generalintermediates.com) y/o Interchim, Francia (www.interchim.com), o pueden prepararse usando técnicas convencionales. Se proporcionan a continuación multitud de referencias de libros de texto que enseñan métodos de síntesis adecuados.
- 25 Tal como reconocerán los expertos en la técnica, también pueden utilizarse 2,4-pirimidindiaminas según la invención, sintetizadas mediante los métodos a modo de ejemplo descritos anteriormente o por otros medios bien conocidos, como materiales de partida y/o productos intermedios para sintetizar compuestos de 2,4-pirimidindiamina adicionales de la invención.
- 30 Aunque muchos de los esquemas de síntesis comentados anteriormente no ilustran el uso de grupos protectores, los expertos en la técnica reconocerán que en algunos casos los sustituyentes R^2 , R^4 pueden incluir grupos funcionales que requieren protección. La identidad exacta del grupo protector usado dependerá, entre otras cosas, de la identidad del grupo funcional que está protegiéndose y de las condiciones de reacción usadas en el esquema

de síntesis particular, y resultará evidente para los expertos en la técnica. Puede encontrarse orientación para seleccionar grupos protectores y químicas para su unión y eliminación adecuados para una aplicación particular, por ejemplo, en Greene & Wuts, citado anteriormente.

5 Pueden prepararse profármacos según la fórmula estructural (II) mediante la modificación de rutina de los métodos descritos anteriormente. Alternativamente, tales profármacos pueden prepararse haciendo reaccionar una 2,4-pirimidindiamina adecuadamente protegida de la invención con un progrupo adecuado. Se conocen bien las condiciones para llevar a cabo tales reacciones y para la desprotección del producto para proporcionar un profármaco de fórmula (II).

10 Se conocen en la técnica multitud de referencias que enseñan métodos útiles para sintetizar pirimidinas en general, así como materiales de partida descritos en los esquemas (I)-(IX). Para orientación específica, se remite al lector a Brown, D. J., "The Pyrimidines", en The Chemistry of Heterocyclic Compounds. Volumen 16 (Weissberger, A., Ed.), 1962, Interscience Publishers, (una división de John Wiley & Sons), Nueva York ("Brown I"); Brown, D. J., "The Pyrimidines", en The Chemistry of Heterocyclic Compounds, volumen 16, suplemento I (Weissberger, A. y Taylor, E. C., Ed.), 1970, Wiley-Interscience, (una división de John Wiley & Sons), Nueva York (Brown II); Brown, D. J., "The Pyrimidines", en The Chemistry of Heterocyclic Compounds, volumen 16, suplemento II (Weissberger, A. y Taylor, E. C., Ed.), 1985, An Interscience Publication (John Wiley & Sons), Nueva York ("Brown III"); Brown, D. J., "The Pyrimidines" en The Chemistry of Heterocyclic Compounds, volumen 52 (Weissberger, A. y Taylor, E. C., Ed.), 1994, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, págs. 1-1509 (Brown IV); Kenner, G. W. y Todd, A., en Heterocyclic Compounds, volumen 6, (Elderfield, R. C., Ed.), 1957, John Wiley, Nueva York, capítulo 7 (pirimidinas); Paquette, L. A., Principles of Modern Heterocyclic Chemistry, 1968, W. A. Benjamin, Inc., Nueva York, págs. 1 - 401 (síntesis de uracilo págs. 313, 315; síntesis de pirimidina págs. 313-316; síntesis de aminopirimidina págs. 315); Joule, J. A., Mills, K. y Smith, G. F., Heterocyclic Chemistry, 3ª edición, 1995, Chapman y Hall, Londres, RU, págs. 1 - 516; Vorbrüggen, H. y Ruh-Pohlentz, C., Handbook of Nucleoside Synthesis, John Wiley & Sons, Nueva York, 2001, págs. 1-631 (protección de pirimidinas mediante acilación págs. 90-91; sililación de pirimidinas págs. 91-93); Joule, J. A., Mills, K. y Smith, G. F., Heterocyclic Chemistry, 4ª edición, 2000, Blackwell Science, Ltd, Oxford, RU, págs. 1-589; y Comprehensive Organic Synthesis, volúmenes 1-9 (Trost, B. M. y Fleming, I., Ed.), 1991, Pergamon Press, Oxford, RU.

30 Debe entenderse por el experto en la técnica que en los esquemas I a VII, el nitrógeno N4 puede sustituirse por R^{4c} tal como se describe a lo largo de toda la memoria descriptiva y en los ejemplos proporcionados en el presente documento.

35 Inhibición de cascadas de señales de receptores de Fc

Los compuestos de 2,4-pirimidindiamina activos de la invención inhiben cascadas de señalización de receptores de Fc que conducen a, entre otras cosas, desgranulación de células. Como ejemplo específico, los compuestos inhiben las cascadas de señales de FcεRI y/o FcγRI que conducen a 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. En referencia a la figura 1, tras la exposición a alérgenos, que pueden ser, entre otras cosas, polen o parásitos, se sintetizan anticuerpos de IgE específicos de alérgeno por células B activadas por IL-4 (o IL-13) y otros mensajeros para cambiar a la síntesis de anticuerpos específicos de la clase IgE. Estas IgE específicas de alérgeno se unen al FcεRI de alta afinidad. Tras la unión del antígeno, las IgE unidas a FcεRI se reticulan y se activa la ruta de transducción de señales del receptor de IgE, lo que conduce a desgranulación de las células y la consiguiente liberación y/o síntesis de una gran cantidad de mediadores químicos, incluyendo histamina, proteasas (por ejemplo, triptasa y quimasa), mediadores lipídicos tales como leucotrienos (por ejemplo, LTC₄), factor de activación plaquetario (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 síntesis de estos mediadores a partir de mastocitos y/o basófilos explica las respuestas de fase temprana y tardía inducidas por alérgenos, y están vinculadas directamente a acontecimientos posteriores que conducen a un estado inflamatorio sostenido.

Los acontecimientos moleculares en la ruta de transducción de señales de FcεRI que conducen a la liberación de mediadores preformados mediante desgranulación y liberación y/o síntesis de otros mediadores químicos se conocen bien y se ilustran en la figura 2. En referencia a la figura 2, el FcεRI es un receptor heterotetramérico compuesto por una subunidad alfa de unión a IgE, una subunidad beta y dos subunidades gamma (homodímero gamma). La reticulación de IgE unida a FcεRI mediante agentes de unión multivalentes (incluyendo, por ejemplo, alérgenos específicos de IgE o anticuerpos anti-IgE o fragmentos) induce la rápida asociación y activación de la cinasa Lyn relacionada con Src. Lyn fosforila motivos de activación a base de tirosina de inmunorreceptores (ITAM) en las subunidades beta y gamma intracelulares, lo que conduce al reclutamiento de Lyn adicionales a la subunidad beta y Syk cinasa al homodímero gamma. Estas cinasas asociadas a receptor, que se activan mediante fosforilación intra e intermolecular, fosforilan otros componentes de la ruta, tales como la Btk cinasa, LAT y fosfolipasa C-gamma (PLC-gamma). PLC-gamma activada inicia rutas que conducen a la activación de la proteína cinasa C y a la movilización de Ca²⁺, requiriéndose ambas para la desgranulación. La reticulación de FcεRI también activa las tres

clases principales de proteína cinasas activadas por mitógeno (MAP), es decir, ERK1/2, JNK1/2 y p38. La activación de estas rutas es importante en la regulación transcripcional de mediadores proinflamatorios, tales como TNF- α e IL-6, así como el mediador lipídico leucotrieno CA (LTC₄).

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

10 La capacidad de los compuestos de 2,4-pirimidindiamina de la invención para inhibir las cascadas de señalización de receptores de Fc puede determinarse o confirmarse de manera sencilla en ensayos *in vitro*. Se proporcionan en la sección de ejemplos ensayos adecuados para confirmar la inhibición de la desgranulación mediada por Fc ϵ RI. En un ensayo típico, se hacen crecer en primer lugar células que pueden experimentar desgranulación mediada por Fc ϵ RI, tales como mastocitos o basófilos, en presencia de IL-4, factor de células madre (SCF), IL-6 e IgE para aumentar la expresión del Fc ϵ RI, se exponen a un compuesto de prueba de 2,4-pirimidindiamina de la invención y se estimulan con anticuerpos anti-IgE (o, alternativamente, un alérgeno específico de IgE). Tras la incubación, puede cuantificarse la cantidad de un mediador químico u otro agente químico liberado y/o sintetizado como consecuencia de la activación de la cascada de señalización de Fc ϵ RI usando técnicas convencionales y compararse con la cantidad del mediador o agente liberado a partir de células control (es decir, células que se estimulan pero que no se exponen a compuesto de prueba). La concentración de compuesto de prueba que proporciona una reducción del 50% en la cantidad del mediador o agente medida en comparación con células control es la CI₅₀ del compuesto de prueba. El origen de los mastocitos o basófilos usados en el ensayo dependerá, en parte, del uso deseado para los compuestos y resultará evidente para los expertos en la técnica. Por ejemplo, si los compuestos serán para su uso en métodos que tratan o previenen una enfermedad particular en seres humanos, una fuente conveniente de mastocitos o basófilos es un ser humano u otro animal que constituye un modelo clínico aceptado o conocido para la enfermedad particular. Por tanto, dependiendo de la aplicación particular, los mastocitos o basófilos pueden derivarse de una amplia variedad de fuentes animales, que oscilan entre, por ejemplo, mamíferos inferiores tales como ratones y ratas, y perros, ovejas y otros mamíferos comúnmente empleados en pruebas clínicas, y mamíferos superiores tales como monos, chimpancés y simios, y seres humanos. Los ejemplos específicos de células adecuadas para llevar a cabo los ensayos *in vitro* incluyen, pero no se limitan a, basófilos de roedor o ser humano, líneas celulares de leucemia de basófilos de rata, mastocitos de ratón primarios (tales como mastocitos de ratón derivados de médula ósea "BMBC") y mastocitos humanos primarios aislados de la médula espinal ("CHMC") u otros tejidos tales como pulmón. Se conocen bien métodos para aislar y cultivar estos tipos de células o se proporcionan en la sección de ejemplos (véase, por ejemplo, Demo *et al.*, 1999, Cytometry 36(4):340-348 y la solicitud en tramitación junto con la presente con n.º de serie 10/053.355, presentada el 8 de noviembre de 2001, cuya descripción se incorpora en el presente documento como referencia). Por supuesto, también pueden usarse otros tipos de células inmunitarias que se desgranulan tras la activación de la cascada de señalización de Fc ϵ RI, incluyendo, por ejemplo, eosinófilos.

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

- En referencia de nuevo a la figura 1, la desgranulación es sólo una de las varias respuestas iniciadas por la cascada de señalización de FcεRI. Además, la activación de esta ruta de señalización conduce a la síntesis *de novo* y liberación de citocinas y quimiocinas tales como IL-4, IL-5, IL-6, TNF-α, IL-13 y MIP1-α, y a la liberación de mediadores lipídicos tales como leucotrienos (por ejemplo, LTC₄), factor de activación plaquetario (PAF) y prostaglandinas. Por consiguiente, los compuestos de 2,4-pirimidindiamina de la invención también pueden evaluarse para determinar su actividad cuantificando la cantidad de uno o más de estos mediadores liberados y/o sintetizados por células activadas.
- A diferencia de los componentes específicos de gránulos comentados anteriormente, estos mediadores de “fase tardía” no se liberan inmediatamente tras la activación de la cascada de señalización de FcεRI. Por consiguiente, cuando se cuantifican estos mediadores de fase tardía, debe tenerse cuidado para garantizar que el cultivo celular activado se incuba durante un tiempo suficiente para dar como resultado la síntesis (si es necesario) y la liberación del mediador que está cuantificándose. En general, se liberan PAF y mediadores lipídicos tales como leucotrieno C₄ 3-30 min. tras la activación de FcεRI. Las citocinas y otros mediadores de fase tardía se liberan aproximadamente 4-8 h. tras la activación de FcεRI. Resultarán evidentes para los expertos en la técnica tiempos de incubación adecuados para un mediador específico. Se proporcionan ensayos y orientación específicos en la sección de ejemplos.
- La cantidad de un mediador de fase tardía particular liberada puede cuantificarse usando cualquier técnica convencional. En una realización, la(s) cantidad(es) puede(n) cuantificarse usando ensayos ELISA. Están disponibles kits de ensayos ELISA adecuados para cuantificar la cantidad de TNFα, IL-4, IL-5, IL-6 y/o IL-13 liberada de, por ejemplo, Biosource International, Inc., Camarillo, CA 93012 (véanse, por ejemplo, los n.ºs de catálogo KHC3011, KHC0042, KHC0052, KHC0061 y KHC0132). Están disponibles kits de ensayos ELISA adecuados para cuantificar la cantidad de leucotrieno C₄ (LTC₄) liberada a partir de las células de Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI 48108 (véase, por ejemplo, el n.º de catálogo 520211).

Normalmente, los compuestos de 2,4-pirimidindiamina activos de la invención presentarán CI₅₀ con respecto a la liberación o síntesis de mediadores y/o desgranulación mediada por FcεRI de aproximadamente 20 μM o inferior, tal como se mide en un ensayo *in vitro*, tal como uno de los ensayos *in vitro* descritos anteriormente o en la sección de ejemplos. Por supuesto, los expertos en la técnica apreciarán que los compuestos que presentan CI₅₀ inferiores, por ejemplo del orden de 10 μM, 1 μM, 100 nM, 10 nM, 1 nM, o incluso inferiores, son particularmente útiles.

Los expertos en la técnica apreciarán que los diversos mediadores comentados anteriormente pueden inducir diferentes efectos adversos o presentar diferentes potencias con respecto al mismo efecto adverso. Por ejemplo, el mediador lipídico LTC₄ es un potente vasoconstrictor (es aproximadamente 1000 veces más potente en la inducción de vasoconstricción que la histamina). Como otro ejemplo, además de mediar en reacciones de hipersensibilidad de tipo I o atópicas, las citocinas también pueden provocar remodelación tisular y proliferación celular. Por tanto, aunque compuestos que inhiben la liberación y/o síntesis de uno cualquiera de los mediadores químicos comentados anteriormente son útiles, los expertos en la técnica apreciarán que compuestos que inhiben la liberación y/o síntesis de una pluralidad de, o incluso todos, los mediadores descritos anteriormente encuentran uso particular, ya que tales compuestos son útiles para mejorar o evitar conjuntamente una pluralidad de, o incluso todos, los efectos adversos inducidos por los mediadores particulares. Por ejemplo, compuestos que inhiben la liberación de los tres tipos de mediadores (específicos de gránulos, lipídicos y de citocina) son útiles para tratar o prevenir reacciones de hipersensibilidad de tipo I inmediatas así como los síntomas crónicos asociados con las mismas.

Pueden identificarse compuestos de la invención que pueden inhibir la liberación de más de un tipo de mediador (por ejemplo, específico de gránulos o de fase tardía) determinando la CI₅₀ con respecto a un mediador representativo de cada clase usando los diversos ensayos *in vitro* descritos anteriormente (u otros ensayos *in vitro* equivalentes). Los compuestos de la invención que pueden inhibir la liberación de más de un tipo de mediador presentarán normalmente una CI₅₀ para cada tipo de mediador sometido a prueba inferior a aproximadamente 20 μM. Por ejemplo, un compuesto que presenta una CI₅₀ de 1 μM con respecto a la liberación de histamina (CI₅₀^{histamina}) y una CI₅₀ de 1 nM con respecto a la síntesis y/o liberación de leucotrieno LTC₄ (CI₅₀^{LTC₄}) inhibe la liberación de mediadores tanto de fase inmediata (específicos de gránulos) como de fase tardía. Como otro ejemplo específico, un compuesto que presenta una CI₅₀^{triptasa} de 10 μM, una CI₅₀^{LTC₄} de 1 μM y una CI₅₀^{IL-4} de 1 μM inhibe la liberación de mediadores inmediatos (específicos de gránulos), lipídicos y de citocina. Aunque los ejemplos específicos anteriores utilizan las CI₅₀ de un mediador representativo de cada clase, los expertos en la técnica apreciarán que pueden obtenerse las CI₅₀ de una pluralidad de, o incluso todos, los mediadores que comprenden una o más de las clases. La(s) cantidad(es) e identidad(es) de mediadores para los que deben determinarse los datos de CI₅₀ para un compuesto y aplicación particulares resultará(n) evidente(s) para los expertos en la técnica.

Pueden utilizarse ensayos similares para confirmar la inhibición de cascadas de transducción de señales iniciadas por otros receptores de Fc, tales como señalización por FcαRI, FcγRI y/o FcγRIII, con modificación de rutina. Por ejemplo, la capacidad de los compuestos para inhibir la transducción de señales de FcγRI puede confirmarse en ensayos similares a los descritos anteriormente, con la excepción de que la cascada de señalización de FcγRI se

activa, por ejemplo, incubando las células con IgG y un anticuerpo o alérgeno específico de IgG, en lugar de IgE y un anticuerpo o alérgeno específico de IgE. Resultarán evidentes para los expertos en la técnica tipos celulares, agentes activantes y agentes adecuados para cuantificar para confirmar la inhibición de otros receptores de Fc, tales como receptores de Fc que comprenden un homodímero gamma.

5 Una clase particularmente útil de compuestos incluye los compuestos de 2,4-pirimidindiamina que inhiben la liberación de mediadores inmediatos específicos de gránulos y mediadores de fase tardía con CI_{50} aproximadamente equivalentes. Por aproximadamente equivalente quiere decirse que las CI_{50} para cada tipo de mediador están dentro de aproximadamente un intervalo de 10 unas de otras. Otra clase particularmente útil de compuestos incluye los
10 compuestos de 2,4-pirimidindiamina que inhiben la liberación de mediadores inmediatos específicos de gránulos, mediadores lipídicos y mediadores de citocina con CI_{50} aproximadamente equivalentes. En una realización específica, tales compuestos inhiben la liberación de los siguientes mediadores con CI_{50} aproximadamente equivalentes: histamina, triptasa, hexosaminidasa, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, $TNF\alpha$ y LTC4. Tales compuestos son particularmente útiles para, entre otras cosas, mejorar o evitar conjuntamente las respuestas de fase tanto temprana
15 como tardía asociadas con reacciones de hipersensibilidad de tipo I inmediatas o atópicas.

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

Además de las rutas de desgranulación de $Fc\epsilon RI$ o $Fc\gamma RI$ comentadas anteriormente, puede inducirse la desgranulación de mastocitos y/o basófilos mediante otros agentes. Por ejemplo, la ionomicina, un ionóforo de calcio que evita la maquinaria de transducción de señales de $Fc\epsilon RI$ o $Fc\gamma RI$ temprana de la célula, induce directamente un
25 flujo de calcio que desencadena la desgranulación. En referencia de nuevo a la figura 2, la $PLC\gamma$ activada inicia rutas que conducen a, entre otras cosas, movilización de iones calcio y posterior desgranulación. Tal como se ilustra, esta movilización de Ca^{2+} se desencadena tardíamente en la ruta de transducción de señales de $Fc\epsilon RI$. Tal como se mencionó anteriormente, y tal como se ilustra en la figura 3, la ionomicina induce directamente movilización de Ca^{2+} y un flujo de Ca^{2+} que conduce a desgranulación. Otros ionóforos que inducen desgranulación de esta manera
30 incluyen A23187. La capacidad de los ionóforos que inducen desgranulación tales como la ionomicina para sortear las fases tempranas de las cascadas de señalización de $Fc\epsilon RI$ y/o $Fc\gamma RI$ puede usarse como un sistema de cribado para identificar compuestos activos de la invención que ejercen específicamente su actividad inhibitoria de la desgranulación bloqueando o inhibiendo las cascadas de señalización de $Fc\epsilon RI$ o $Fc\gamma RI$ tempranas, tal como se comentó anteriormente. Los compuestos que inhiben específicamente tal desgranulación mediada por $Fc\epsilon RI$ o $Fc\gamma RI$
35 temprana inhiben no sólo la desgranulación y la posterior liberación rápida de histamina, triptasa y otros contenidos de gránulos, sino que también inhiben las rutas de activación proinflamatorias que provocan la liberación de $TNF\alpha$, IL-4, IL-13 y los mediadores lipídicos tales como LTC4. Por tanto, los compuestos que inhiben específicamente tal desgranulación mediada por $Fc\epsilon RI$ y/o $Fc\gamma RI$ temprana bloquean o inhiben no sólo reacciones de hipersensibilidad de tipo I o atópicas agudas, sino también respuestas tardías que implican múltiples mediadores inflamatorios.
40

Los compuestos de la invención que inhiben específicamente la desgranulación temprana mediada por $Fc\epsilon RI$ y/o $Fc\gamma RI$ son los compuestos que inhiben la desgranulación mediada por $Fc\epsilon RI$ y/o $Fc\gamma RI$ (por ejemplo, tienen una CI_{50} de menos de aproximadamente 20 μM con respecto a la liberación de un componente o mediador específico de gránulos tal como se mide en un ensayo *in vitro* con células estimuladas con un agente de unión a IgE o IgG) pero
45 que no inhiben apreciablemente la desgranulación inducida por ionóforos. En una realización, se considera que los compuestos no inhiben apreciablemente la desgranulación inducida por ionóforos si presentan una CI_{50} de la desgranulación inducida por ionóforos de más de aproximadamente 20 μM , tal como se mide en un ensayo *in vitro*. Por supuesto, son particularmente útiles compuestos activos que presentan CI_{50} incluso superiores de la desgranulación inducida por ionóforos, o que no inhiben la desgranulación inducida por ionóforos en absoluto. En
50 otra realización, se considera que los compuestos no inhiben apreciablemente la desgranulación inducida por ionóforos si presentan una diferencia de más de 10 veces en sus CI_{50} de la desgranulación mediada por $Fc\epsilon RI$ y/o $Fc\gamma RI$ y la desgranulación inducida por ionóforos, tal como se mide en un ensayo *in vitro*. Los ensayos adecuados para determinar la CI_{50} de la desgranulación inducida por ionóforos incluyen cualquiera de los ensayos de desgranulación descritos anteriormente, con la modificación de que las células se estimulan o se activan con un
55 ionóforo de calcio que induce desgranulación tal como ionomicina o A23187 (A.G. Scientific, San Diego, CA) en lugar de anticuerpos anti-IgE o un alérgeno específico de IgE. Se proporcionan en la sección de ejemplos ensayos específicos para evaluar la capacidad de un compuesto de 2,4-pirimidindiamina particular de la invención para inhibir la desgranulación inducida por ionóforos.

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

otros mecanismos de desgranulación. Compuestos que presentan un alto grado de selectividad son generalmente 10 veces o más selectivos para la desgranulación mediada por FcεRI o FcγRI con respecto a la desgranulación inducida por ionóforos, tal como desgranulación inducida por ionomicina .

5 Por consiguiente, la actividad de los compuestos de 2,4-pirimidindiamina de la invención también puede confirmarse en ensayos celulares o bioquímicos de la actividad Syk cinasa. En referencia de nuevo a la figura 2, en la cascada de señalización de FcεRI en mastocitos y/o basófilos, Syk cinasa fosforila LAT y PLC-gamma1, lo que conduce a, entre otras cosas, desgranulación. Puede usarse cualquiera de estas actividades para confirmar la actividad de los compuestos de 2,4-pirimidindiamina de la invención. En una realización, la actividad se confirma poniendo en
10 contacto una Syk cinasa aislada, o un fragmento activo de la misma, con un compuesto de 2,4-pirimidindiamina en presencia de un sustrato de Syk cinasa (por ejemplo, un péptido sintético o una proteína que se sabe que va a fosforilarse por Syk en una cascada de señalización) y evaluando si la Syk cinasa fosforilaba el sustrato. Alternativamente, el ensayo puede llevarse a cabo con células que expresan una Syk cinasa. Las células pueden expresar la Syk cinasa de manera endógena o pueden modificarse por ingeniería genética para que expresen una
15 Syk cinasa recombinante. Las células también pueden expresar opcionalmente el sustrato de Syk cinasa. Resultarán evidentes para los expertos en la técnica células adecuadas para realizar tales ensayos de confirmación, así como métodos de modificación por ingeniería genética de células adecuadas. Se proporcionan ejemplos específicos de ensayos celulares y bioquímicos adecuados para confirmar la actividad de los compuestos de 2,4-pirimidindiamina en la sección de ejemplos.

20 En general, los compuestos que son inhibidores de Syk cinasa presentarán una CI_{50} con respecto a una actividad Syk cinasa, tal como la capacidad de Syk cinasa para fosforilar un sustrato sintético o endógeno, en un ensayo celular o *in vitro* en el intervalo de aproximadamente 20 μ M o menos. Los expertos en la técnica apreciarán que son particularmente útiles compuestos que presentan CI_{50} inferiores, tales como en el intervalo de 10 μ M, 1 μ M, 100 nM,
25 10 nM, 1 nM, o incluso inferiores.

Usos y composiciones

30 Tal como se comentó anteriormente, los compuestos activos de la invención inhiben las cascadas de señalización de receptores de Fc, especialmente los receptores de Fc que incluyen un homodímero gamma, tales como las cascadas de señalización de FcεRI y/o FcγRI, que conducen a, entre otras cosas, la liberación y/o síntesis de mediadores químicos a partir de células, mediante o bien desgranulación o bien otros procesos. Tal como se comentó también, los compuestos activos son también potentes inhibidores de Syk cinasa. Como consecuencia de estas actividades, los compuestos activos de la invención pueden usarse en una variedad de contextos *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo* para regular o inhibir Syk cinasa, cascadas de señalización en las que Syk cinasa desempeña un papel, cascadas de señalización de receptores de Fc y las respuestas biológicas efectuadas por tales cascadas de señalización. Por ejemplo, en una realización, los compuestos pueden ser para su uso en la inhibición de Syk cinasa, o bien *in vitro* o bien *in vivo*, en prácticamente cualquier tipo de célula que exprese Syk cinasa. También pueden ser para su uso en la regulación de cascadas de transducción de señales en las que Syk cinasa desempeña
40 un papel. Tales 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. Los compuestos también pueden ser para su uso *in vitro* o *in vivo* para regular, y en particular inhibir, respuestas biológicas o celulares efectuadas por tales cascadas de transducción de señales dependientes de Syk. Tales respuestas biológicas o celulares 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+} . De manera importante, los compuestos pueden ser para su uso en la inhibición de Syk cinasa *in vivo* como enfoque terapéutico hacia el tratamiento o la prevención de enfermedades mediadas, o bien completamente o bien en parte, por una actividad Syk cinasa. Ejemplos no limitativos de enfermedades mediadas por Syk cinasa en las que los compuestos de la invención pueden ser para su uso en el tratamiento o la prevención son las comentadas en más
50 detalle, a continuación.

En otra realización, los compuestos activos pueden usarse en la regulación o inhibición de las cascadas de señalización de receptores de Fc y/o la desgranulación mediada por FcεRI y/o FcγRI como enfoque terapéutico hacia el tratamiento o la prevención de enfermedades caracterizadas por, provocadas por y/o asociadas con la liberación o síntesis de mediadores químicos de tales cascadas de señalización de receptores de Fc o desgranulación. Tales tratamientos pueden administrarse a animales en contextos veterinarios o a seres humanos. Las enfermedades que están caracterizadas por, provocadas por o asociadas con la liberación, síntesis o desgranulación de tales mediadores, y en las que los compuestos de la invención pueden ser por tanto para su uso en el tratamiento o la prevención incluyen, a modo de ejemplo y no de limitación, hipersensibilidad anafiláctica o atópica o reacciones alérgicas, alergias (por ejemplo, conjuntivitis alérgica, rinitis alérgica, asma atópica, dermatitis atópica y alergias alimentarias), cicatrización de bajo grado (por ejemplo, de esclerodermia, fibrosis aumentada, queloides, cicatrices posquirúrgicas, fibrosis pulmonar, espasmos vasculares, migraña, lesión por reperfusión y tras infarto de miocardio), enfermedades asociadas con destrucción tisular (por ejemplo, de EPOC, cardiobronquitis y tras infarto de miocardio), enfermedades asociadas con inflamación tisular (por ejemplo, síndrome del intestino
65 irritable, colon irritable y enfermedad inflamatoria del intestino), inflamación y cicatrización.

Además de la multitud de enfermedades comentadas anteriormente, los datos empíricos celulares y en animales confirman que los compuestos de 2,4-pirimidindiamina descritos en el presente documento también pueden ser para su uso en el tratamiento o la prevención de enfermedades autoinmunitarias, así como de los diversos síntomas asociados con tales enfermedades. Los tipos de enfermedades autoinmunitarias en las que los compuestos de la invención pueden ser para su uso en el tratamiento o la prevención incluyen generalmente los trastornos que implican lesión tisular que se produce como resultado de respuesta humoral y/o mediada por células a inmunógenos o antígenos de origen endógeno y/o exógeno. Tales enfermedades se denominan frecuentemente enfermedades que implican las reacciones de hipersensibilidad no anafilácticas (es decir, de tipo II, tipo III y/o tipo IV).

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

Las reacciones de hipersensibilidad de tipo II (también denominadas reacciones de hipersensibilidad citotóxicas, dependientes del complemento citolíticas o de estimulación celular), resultan cuando reaccionan inmunoglobulinas con componentes antigénicos de células o tejido, o con un antígeno o hapteno que se ha acoplado de manera íntima a células o tejido. Las enfermedades que están asociadas comúnmente con 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 de complejo tóxico, complejo soluble o complejo inmunitario), resultan de la deposición de complejos de antígeno-inmunoglobulina circulantes solubles en vasos o en tejidos, con reacciones inflamatorias agudas acompañantes en el sitio de deposición de complejos inmunitarios. Los ejemplos no limitativos 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 vesicular.

Las reacciones de hipersensibilidad de tipo IV (frecuentemente denominadas reacciones de hipersensibilidad celulares, mediadas por células, retardadas o de tipo tuberculina) están provocadas por linfocitos T sensibilizados que resultan del contacto con un antígeno específico. Los ejemplos no limitativos de enfermedades que se menciona que implican reacciones de tipo IV son dermatitis de contacto y rechazo de aloinjerto incluyendo, pero sin limitarse a, trasplante de corazón.

Los compuestos de la invención pueden ser para su uso en el tratamiento o la prevención de enfermedades autoinmunitarias asociadas con cualquiera de las reacciones de hipersensibilidad no anafilácticas anteriores. En particular, los compuestos de la invención pueden ser para su uso en métodos usados para tratar o prevenir las enfermedades autoinmunitarias frecuentemente caracterizadas como trastornos autoinmunitarios de un solo órgano o de un solo tipo celular incluyendo, pero sin limitarse a: tiroiditis de Hashimoto, anemia hemolítica autoinmunitaria, gastritis atrófica autoinmunitaria de la anemia perniciosa, encefalomiелitis autoinmunitaria, orquitis autoinmunitaria, enfermedad de Goodpasture, trombocitopenia autoinmunitaria, oftalmia simpática, miastenia grave, enfermedad de Grave, cirrosis biliar primaria, hepatitis agresiva crónica, colitis ulcerosa y glomerulopatía membranosa, así como las enfermedades autoinmunitarias que se caracteriza frecuentemente que implican trastorno autoinmunitario sistémico, que incluyen pero no se limitan a: lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, síndrome de Sjorgen, síndrome de Reiter, polimiositis-dermatomiositis, esclerosis sistémica, poliarteritis nudosa, esclerosis múltiple y penfigoide vesicular.

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

Como ejemplo específico, la artritis reumatoide (RA) da como resultado normalmente hinchazón, dolor, pérdida de movimiento y sensibilidad a la palpación de articulaciones diana por todo el cuerpo. La AR se caracteriza por sinovio inflamado de manera crónica que está densamente poblado de linfocitos. La membrana sinovial, que normalmente tiene el espesor de una capa celular, se vuelve intensamente celular y adopta una forma similar a tejido linfoide, incluyendo células dendríticas, células T, B y NK, macrófagos y agrupaciones de células plasmáticas. Este proceso, así como una plétora de mecanismos inmunopatológicos incluyendo la formación de complejos de 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. Los compuestos de la invención pueden ser para su uso en métodos que tratan o mejoran uno cualquiera, varios o todos

de estos síntomas de RA. Por tanto, en el contexto de la RA, se considera que los métodos proporcionan beneficio terapéutico (comentado más generalmente a continuación) cuando se logra una reducción o mejora de cualquiera de los síntomas comúnmente asociados con RA, independientemente de si el tratamiento da como resultado un tratamiento concomitante de la RA subyacente y/o una reducción en la cantidad de factor reumatoide ("RF") circulante.

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

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

Cuando se usan en el tratamiento o la prevención de tales enfermedades, los compuestos activos pueden ser para su administración individualmente, como mezclas de uno o más compuestos activos o en mezcla o combinación con otros agentes útiles para tratar tales enfermedades y/o los síntomas asociados con tales enfermedades. Los compuestos activos también pueden ser para su administración en mezcla o en combinación con agentes útiles para tratar otros trastornos o enfermedades, tales como esteroides, estabilizadores de la membrana, inhibidores de 5LO, inhibidores de receptores y de la síntesis de leucotrienos, inhibidores del cambio al isotipo IgE o de la síntesis de IgE, del cambio al isotipo IgG o de la síntesis de IgG, β -agonistas, inhibidores de triptasa, aspirina, inhibidores de COX, metotrexato, fármacos anti-TNF, retuxina, inhibidores de PD4, inhibidores de P38, inhibidores de PDE4 y antihistamínicos, por nombrar unos cuantos. Los compuestos activos pueden ser para su administración *per se* en forma de profármacos o como composiciones farmacéuticas, que comprenden un compuesto activo o profármaco.

Pueden fabricarse composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos activos de la invención (o profármacos de los mismos) por medio de procedimientos de mezclado, disolución, granulación, levigación para preparar comprimidos recubiertos de azúcar, emulsionamiento, encapsulación, atrapamiento o liofilización convencionales. Las composiciones pueden formularse de manera convencional usando uno o más portadores, diluyentes, excipientes o agentes auxiliares fisiológicamente aceptables que facilitan el procesamiento de los compuestos activos para dar preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente.

El compuesto activo o profármaco puede formularse en las composiciones farmacéuticas *per se*, o en forma de un hidrato, solvato, N-óxido o sal farmacéuticamente aceptable, tal como se describió anteriormente. Normalmente, tales sales son más solubles en disoluciones acuosas que las bases y los ácidos libres correspondientes, aunque también pueden formarse sales que tienen inferior solubilidad que las bases y los ácidos libres correspondientes.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden adoptar una forma adecuada para prácticamente cualquier modo de administración, incluyendo, por ejemplo, tópica, ocular, oral, bucal, sistémica, nasal, por inyección, transdérmica, rectal, vaginal, etc., o una forma adecuada para administración mediante inhalación o insuflación.

Para administración tópica, el/los compuesto(s) activo(s) o profármaco(s) puede(n) formularse como disoluciones, geles, pomadas, cremas, suspensiones, etc. tal como se conoce bien en la técnica.

Las formulaciones sistémicas incluyen las diseñadas para administración mediante inyección, por ejemplo, inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intratecal o intraperitoneal, así como las diseñadas para administración transdérmica, transmucosa oral o pulmonar.

Las preparaciones inyectables útiles incluyen suspensiones, disoluciones o emulsiones estériles del/de los compuesto(s) activo(s) en vehículos acuosos u oleosos. Las composiciones también pueden contener agentes de formulación, tales como agente de suspensión, estabilización y/o dispersión. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma farmacéutica unitaria, por ejemplo, en ampollas o recipientes de múltiples dosis, y pueden contener conservantes añadidos.

Alternativamente, la formulación inyectable puede proporcionarse en forma de polvo para su reconstitución con un vehículo adecuado, incluyendo pero sin limitarse a agua estéril libre de pirógenos, tampón, disolución de dextrosa, etc., antes de su uso. Para este fin, el/los compuesto(s) activo(s) puede(n) secarse mediante cualquier técnica conocida en la técnica, tal como liofilización, y reconstituirse antes de su uso.

Para administración transmucosa, se usan en la formulación agentes de penetración apropiados para la barrera que

va a permearse. Tales agentes de penetración se conocen en la técnica.

Para administración oral, las composiciones farmacéuticas pueden adoptar la forma de, por ejemplo, pastillas para chupar, comprimidos o cápsulas preparados por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes de unión (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); cargas (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o hidrogenofosfato de calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); disgregantes (por ejemplo, almidón de patata o glicolato sódico de almidón); o agentes humectantes (por ejemplo, laurilsulfato de sodio). Los comprimidos pueden recubrirse mediante métodos bien conocidos en la técnica con, por ejemplo, azúcares, películas o recubrimientos entéricos.

Las preparaciones líquidas para administración oral pueden adoptar la forma de, por ejemplo, elixires, disoluciones, jarabes o suspensiones, o pueden presentarse como un producto seco para su constitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Tales preparaciones líquidas pueden prepararse por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes de emulsión (por ejemplo, lecitina o goma arábiga); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendras, 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 de tampones, conservantes, agentes aromatizantes, colorantes y edulcorantes según sea apropiado.

Pueden formularse adecuadamente preparaciones para administración oral para proporcionar liberación controlada del compuesto activo o profármaco, tal como se conoce bien.

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

Para vías de administración rectal y vaginal, el/los compuesto(s) activo(s) puede(n) formularse como disoluciones (para enemas de retención), supositorios o pomadas que contienen bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

Para administración nasal o administración mediante inhalación o insuflación, el/los compuesto(s) activo(s) o profármaco(s) puede(n) administrarse convenientemente en forma de un pulverizador de aerosol a partir de envases presurizados o un nebulizador con el uso de un propelente adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, fluorocarbonos, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para administrar una cantidad medida. Pueden formularse cápsulas y cartuchos para su uso en un inhalador o insuflador (por ejemplo cápsulas y cartuchos compuestos por gelatina) que contienen una mezcla de polvo del compuesto y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

Un ejemplo específico de una formulación de suspensión acuosa adecuada para administración nasal usando dispositivos de pulverizador nasal disponibles comercialmente incluye los siguientes componentes: compuesto activo o profármaco (0,5-20 mg/ml); cloruro de benzalconio (0,1-0,2 mg/ml); polisorbato 80 (TWEEN® 80; 0,5-5 mg/ml); carboximetilcelulosa de sodio o celulosa microcristalina (1-15 mg/ml); feniletanol (1-4 mg/ml); y dextrosa (20-50 mg/ml). El pH de la suspensión final puede ajustarse para que oscile entre aproximadamente pH 5 y pH 7, siendo típico un pH de aproximadamente pH 5,5.

Otro ejemplo específico de una suspensión acuosa adecuada para la administración de los compuestos mediante inhalación, y en particular para tal administración de un compuesto de la invención, contiene 1-20 mg/ml del compuesto o profármaco, polisorbato 80 al 0,1-1% (v/v) (TWEEN®80), citrato 50 mM y/o cloruro de sodio al 0,9%.

Para administración ocular, el/los compuesto(s) activo(s) o profármaco(s) puede(n) formularse como una disolución, emulsión, suspensión, etc. adecuada para su administración al ojo. Se conocen en la técnica una variedad de vehículos adecuados para administrar compuestos al ojo. Se describen ejemplos no limitativos específicos en la patente estadounidense n.º 6.261.547; la patente estadounidense n.º 6.197.934; la patente estadounidense n.º 6.056.950; la patente estadounidense n.º 5.800.807; la patente estadounidense n.º 5.776.445; la patente estadounidense n.º 5.698.219; la patente estadounidense n.º 5.521.222; la patente estadounidense n.º 5.403.841; la patente estadounidense n.º 5.077.033; la patente estadounidense n.º 4.882.150; y la patente estadounidense n.º 4.738.851.

Para administración prolongada, el/los compuesto(s) activo(s) o profármaco(s) puede(n) formularse como una preparación de depósito para su administración mediante implantación o inyección intramuscular. El principio activo puede formularse con materiales hidrófobos o poliméricos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados ligeramente solubles, por ejemplo como una sal ligeramente soluble. Alternativamente, pueden usarse sistemas de administración transdérmica fabricados como un parche o disco adhesivo que libera lentamente el/los compuesto(s) activo(s) para su absorción percutánea. Para

este fin, pueden usarse potenciadores de la permeación para facilitar la penetración transdérmica del/de los compuesto(s) activo(s). Se describen parches transdérmicos adecuados en, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.407.713; la patente estadounidense n.º 5.352.456; la patente estadounidense n.º 5.332.213; la patente estadounidense n.º 5.336.168; la patente estadounidense n.º 5.290.561; la patente estadounidense n.º 5.254.346; la patente estadounidense n.º 5.164.189; la patente estadounidense n.º 5.163.899; la patente estadounidense n.º 5.088.977; la patente estadounidense n.º 5.087.240; la patente estadounidense n.º 5.008.110; y la patente estadounidense n.º 4.921.475.

Alternativamente, pueden emplearse otros sistemas de administración farmacéutica. Liposomas y emulsiones son ejemplos bien conocidos de vehículos de administración que pueden usarse para administrar compuesto(s) activo(s) o profármaco(s). También pueden emplearse determinados disolventes orgánicos tales como dimetilsulfóxido (DMSO), aunque habitualmente con el coste de mayor toxicidad.

Las composiciones farmacéuticas, si se desea, pueden presentarse en un envase o dispositivo dispensador que puede contener una o más formas farmacéuticas unitarias que contienen el/los compuesto(s) activo(s). El envase, por ejemplo, puede comprender una lámina de plástico o metal, tal como un envase de blíster. El envase o dispositivo dispensador puede ir acompañado de instrucciones para la administración.

Dosificaciones eficaces

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

Para administración profiláctica, el compuesto puede administrarse a un paciente que corre el riesgo de desarrollar uno de los episodios descritos anteriormente. Por ejemplo, si se desconoce si un paciente es alérgico a un fármaco particular, puede administrarse el compuesto antes de la administración del fármaco para evitar o mejorar una respuesta alérgica al fármaco. Alternativamente, puede aplicarse administración profiláctica para evitar la aparición de síntomas en un paciente al que se le diagnostica el trastorno subyacente. Por ejemplo, puede administrarse un compuesto a un individuo que padece alergia antes de la exposición esperada al alérgeno. También pueden administrarse profilácticamente compuestos a individuos sanos que se exponen repetidamente a agentes conocidos para una de las enfermedades descritas anteriormente que previenen la aparición del trastorno. Por ejemplo, puede administrarse un compuesto a un individuo sano que se expone repetidamente a un alérgeno que se sabe que induce alergias, tal como látex, en un esfuerzo por prevenir que el individuo desarrolle una alergia. Alternativamente, puede administrarse un compuesto a un paciente que padece asma antes de ser partícipe en actividades que desencadenan ataques de asma para atenuar la gravedad de, o evitar totalmente, un episodio asmático.

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

Pueden estimarse inicialmente dosificaciones eficaces a partir de ensayos *in vitro*. Por ejemplo, puede formularse una dosificación inicial para su uso en animales para lograr una concentración sérica o sanguínea circulante de compuesto activo que está en o por encima de una CI_{50} del compuesto particular tal como se mide en un ensayo *in vitro*, tal como el ensayo de CHMC o BMMC *in vitro* y otros ensayos *in vitro* descritos en la sección de ejemplos. El cálculo de las dosificaciones para lograr tales concentraciones séricas o sanguíneas circulantes teniendo en cuenta la biodisponibilidad del compuesto particular está muy dentro de las capacidades de los expertos en la técnica. Para orientación, se remite al lector a Finl & Woodbury, "General Principles", en: The Pharmaceutical Basis of Therapeutics de Goodman and Gilman, capítulo 1, págs. 1-46, última edición, Pagamonon Press, y las referencias mencionadas en el mismo.

También pueden estimarse dosificaciones iniciales a partir de datos *in vivo*, tales como modelos animales. Se conocen bien en la técnica modelos animales útiles para someter a prueba la eficacia de los compuestos para tratar

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

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

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

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

Ejemplos

Compuestos de 2,4-pirimidindiamina

Se prepararon una variedad de N4-sustituidas-N2-monosustituidas-4-pirimidindiaminas basándose en los procedimientos descritos en el presente documento. Tales compuestos se representan en la tabla 1.

Los compuestos de 2,4-pirimidindiamina de la invención inhiben la desgranulación mediada por el receptor FcεRI

Se demostró la capacidad de los compuestos de 2,4-pirimidindiamina de la invención para inhibir la desgranulación inducida por IgE en una variedad de ensayos celulares con mastocitos humanos en cultivo (CHMC) y/o células derivadas de médula ósea de ratón (BMMC). Se midió la inhibición de la desgranulación a densidad celular tanto baja como alta cuantificando la liberación de los factores específicos de gránulos triptasa, histamina y hexosaminidasa. Se evaluó la inhibición de la liberación y/o síntesis de mediadores lipídicos midiendo la liberación de leucotrieno LTC4 y se monitorizó la inhibición de la liberación y/o síntesis de citocinas cuantificando TNF-α, IL-6 e IL-13. Se cuantificaron triptasa y hexosaminidasa usando sustratos fluorogénicos tal como se describe en sus ejemplos respectivos. Se cuantificaron histamina, TNFα, IL-6, IL-13 y LTC4 usando los siguientes kit de ELISA comerciales: histamina (Immunotech n.º 2015, Beckman Coulter), TNFα (Biosource n.º KHC3011), IL-6 (Biosource n.º KMC0061), IL-13 (Biosource n.º KHC0132) y LTC4 (Cayman Chemical n.º 520211). A continuación se facilitan los protocolos de los diversos ensayos.

Cultivo de basófilos y mastocitos humanos

Se cultivaron basófilos y mastocitos humanos a partir de células progenitoras negativas para CD34 tal como se describe a continuación (véanse también los métodos descritos en la solicitud estadounidense en tramitación junto con la presente con n.º de serie 10/053.355, presentada el 8 de noviembre de 2001, cuya descripción se incorpora en el presente documento como referencia).

1. Preparación de medio completo STEMPRO-34

Para preparar el medio completo ("CM") STEMPRO-34, se añadieron 250 ml de medio libre de suero STEMPRO-34™ ("SFM"; GibcoBRL, n.º de catálogo 10640) a un matraz con filtro. A esto se le añadieron 13 ml de aporte complementario de nutrientes STEMPRO-34 ("NS"; GibcoBRL, n.º de catálogo 10641) (preparado tal como se describe en más detalle, a continuación). Se enjuagó el envase de NS con aproximadamente 10 ml de SFM y se añadió el enjuagado al matraz con filtro. Tras la adición de 5 ml de L-glutamina (200 mM; Mediatech, n.º de catálogo MT 25-005-CI) y 5 ml de penicilina/estreptomicina 100X ("pen-estrep"; HyClone, n.º de catálogo SV30010), se enrasó a 500 ml con SFM y se filtró la disolución.

El aspecto más variable de la preparación del CM es el método mediante el que se descongela el NS y se mezcla antes de la adición al SFM. El NS debe descongelarse en un baño de agua a 37°C y removerse, no moverse con vórtex ni agitarse, hasta que esté completamente en disolución. Mientras se mueve, debe observarse si hay algún líquido que todavía no esté en disolución. Si están presentes lípidos y el NS no tiene un aspecto uniforme, debe devolverse al baño de agua y repetirse el proceso de removido hasta que tenga un aspecto uniforme. En ocasiones este componente entra en disolución inmediatamente, en ocasiones tras un par de ciclos de removido y en ocasiones no se disuelve en absoluto. Si tras un par de horas, el NS todavía no está en disolución, debe desecharse y descongelar una nueva unidad. No debe usarse NS que no tenga un aspecto uniforme tras la descongelación.

2. Expansión de células CD34+

Se expandió una población de partida de células positivas para CD34 (CD34+) de número relativamente pequeño ($1-5 \times 10^6$ células) hasta un número relativamente grande de células progenitoras negativas para CD34 (aproximadamente $2-4 \times 10^9$ células) usando los medios de cultivo y métodos descritos a continuación. Las células CD34+ (procedentes de un único donante) se obtuvieron de Allcells (Berkeley, CA). Puesto que hay un grado de variación en la calidad y el número de células CD34+ que Allcells proporciona normalmente, las células recién suministradas se transfirieron a un tubo cónico de 15 ml y se enrasó a 10 ml en CM antes de su uso.

En el día 0, se realizó un recuento de células en las células viables (fase brillante) y se centrifugaron las células a 1200 rpm hasta que sedimentaron. Se resuspendieron las células hasta una densidad de 275.000 células/ml con CM que contenía factor de células madre humano recombinante 200 ng/ml ("SCF"; Peprotech, n.º de catálogo 300-07) y ligando flt-3 humano 20 ng/ml (Peprotech, n.º de catálogo 300-19) ("medio CM/SCF/flt-3"). Aproximadamente en el día 4 ó 5, se comprobó la densidad del cultivo realizando un recuento de células y se diluyó el cultivo hasta una densidad de 275.000 células/ml con medio CM/SCF/flt-3 nuevo. Aproximadamente en el día 7, se transfirió el cultivo a un tubo estéril y se realizó el recuento de células. Se centrifugaron las células a 1200 rpm y se resuspendieron hasta una densidad de 275.000 células/ml con medio CM/SCF/flt-3 nuevo.

Se repitió este ciclo, empezando en el día 0, un total de 3-5 veces a lo largo del periodo de expansión.

Cuando el cultivo es grande y está manteniéndose en múltiples matraces y va a resuspenderse, se combina el contenido de todos los matraces en un único envase antes de realizar un recuento de células. Esto garantiza que se logra un recuento de células preciso y proporciona un grado de uniformidad de tratamiento para toda la población. Se comprueba cada matraz por separado para detectar contaminación bajo el microscopio antes de combinar para evitar la contaminación de toda la población.

Entre los días 17-24, el cultivo puede comenzar a entrar en declive (es decir, muere aproximadamente el 5-10% del número total de células) y deja de expandirse tan rápidamente como antes. Entonces se monitorizan las células diariamente durante este tiempo, ya que la pérdida del cultivo puede tener lugar en tan sólo 24 horas. Una vez que ha comenzado el declive, se cuentan las células, se centrifugan a 850 rpm durante 15 minutos y se resuspenden a una densidad de 350.000 células/ml en medio CM/SCF/flt-3 para inducir una o dos divisiones más del cultivo. Se monitorizan las células diariamente para evitar la pérdida del cultivo.

Cuando es evidente una muerte celular mayor del 15% en el cultivo de células progenitoras y están presentes algunos residuos en el cultivo, las células progenitoras negativas para CD34 están listas para diferenciarse.

3. Diferenciación de células progenitoras negativas para CD34 en mastocitos de la mucosa

Se realiza una segunda fase para convertir las células progenitoras negativas para CD34 expandidas en mastocitos de la mucosa diferenciados. Estos mastocitos humanos en cultivo ("CHMC") de la mucosa se derivan de células CD34+ aisladas de sangre del cordón umbilical y se tratan para formar una población proliferada de células progenitoras negativas para CD34, tal como se describió anteriormente. Para producir las células progenitoras negativas para CD34, el ciclo de resuspensión para el cultivo fue igual al descrito anteriormente, excepto porque se sembró el cultivo a una densidad de 425.000 células/ml y se añadió un 15% de medio adicional aproximadamente en el día cuatro o cinco sin realizar un recuento de células. Además, se modificó la composición de citocinas del medio de manera que contuviera SCF (200 ng/ml) e IL-6 humana recombinante (200 ng/ml; Peprotech, n.º de catálogo 200-06 reconstituida hasta 100 ug/ml en ácido acético 10 mM estéril) ("medio CM/SCF/IL-6").

Las fases I y II juntas abarcan aproximadamente 5 semanas. Son evidentes algo de muerte y residuos en el cultivo

durante las semanas 1-3 y hay un periodo durante las semanas 2-5 durante el cual un pequeño porcentaje del cultivo ya no está en suspensión, sino que en su lugar está unido a la superficie del recipiente de cultivo.

5 Al igual que durante la fase I, cuando el cultivo va a resuspenderse en el día siete de cada ciclo, se combina el contenido de todos los matraces en un único envase antes de realizar un recuento de células para garantizar la uniformidad de toda la población. Se comprueba cada matraz por separado para detectar contaminación bajo el microscopio antes de combinar para evitar la contaminación de toda la población.

10 Cuando se combinan los matraces, se transfiere aproximadamente el 75% del volumen al envase común, dejando aproximadamente 10 ml más o menos en el matraz. Se golpeó fuerte y lateralmente el matraz que contenía el volumen restante para desplazar las células unidas. Se repitió el golpeo en ángulo recto con respecto al primer golpeo para desplazar completamente las células.

15 Se inclinó el matraz en un ángulo de 45 grados durante un par de minutos antes de transferir el volumen restante a un recipiente de recuento. Se centrifugaron las células a 950 rpm durante 15 min. antes de sembrar a 35-50 ml por matraz (a una densidad de 425.000 células/ml).

4. Diferenciación de células progenitoras negativas para CD34 en mastocitos de tipo tejido conjuntivo

20 Se prepara una población proliferada de células progenitoras negativas para CD34 igual que anteriormente y se trata para formar un fenotipo positivo para triptasa/quimasa (tejido conjuntivo). Los métodos se realizan tal como se describió anteriormente para los mastocitos de la mucosa, pero con la sustitución de IL-6 por IL-4 en el medio de cultivo. Las células obtenidas son típicas de mastocitos de tejido conjuntivo.

25 5. Diferenciación de células progenitoras negativas para CD34 en basófilos

30 Se prepara una población proliferada de células progenitoras negativas para CD34 tal como se describe en la sección 7.2.1.3, anterior y se usa para formar una población proliferada basófilos. Se tratan las células negativas para CD34 tal como se describe para los mastocitos de la mucosa, pero con la sustitución de IL-6 por IL-3 (a 20-50 ng/ml) en el medio de cultivo.

Activación por IgE de CHMC de baja densidad celular: Ensayos de triptasa y LTC4

35 A placas de fondo en U de 96 pocillos por duplicado (Costar 3799) se le añaden 65 ul de diluciones de compuesto o muestras control que se han preparado en MT [NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, CaCl₂ 1,8 mM, MgCl₂ 1,0 mM, glucosa 5,6 mM, Hepes 20 mM (pH 7,4), albúmina sérica bovina al 0,1%, (Sigma A4503)] que contiene MeOH al 2% y DMSO al 1%. Se sedimentan las células CHMC (980 rpm, 10 min.) y se resuspenden en MT calentado previamente. Se añaden 65 ul de células a cada placa de 96 pocillos. Dependiendo de la actividad de desgranulación para cada donante de CHMC particular, se cargan 1000-1500 células/pocillo. Se mezcla cuatro veces seguido por una
40 incubación de 1 h a 37°C. Durante la incubación de 1 h, se prepara una disolución de anticuerpo anti-IgE 6X [anticuerpo de conejo anti-IgE humana (1 mg/ml, Bethyl Laboratories A80-109A) diluido 1:167 en tampón MT]. Se estimulan las células añadiendo 25 ul de disolución de anticuerpo anti-IgE 6X a las placas apropiadas. Se añaden 25 ul de MT a pocillos control no estimulados. Se mezcla dos veces tras la adición del anticuerpo anti-IgE. Se incuba a 37°C durante 30 minutos. Durante la incubación de 30 minutos, se diluye la disolución madre de sustrato de triptasa 20 mM [(Z-Ala-Lys-Arg-AMC 2TFA; Enzyme Systems Products, n.º AMC-246)] 1:2000 en tampón de ensayo de triptasa [Hepes 0,1 M (pH 7,5), glicerol al 10% p/v, heparina 10 uM (Sigma H-4898) Na₃ al 0,01%]. Se centrifugan las placas a 1000 rpm durante 10 min. para sedimentar las células. Se transfieren 25 ul de sobrenadante a una placa de fondo negro de 96 pocillos y se añaden 100 ul de disolución de sustrato de triptasa recién diluida a cada pocillo. Se incuban las placas a temperatura ambiente durante 30 min. Se lee la densidad óptica de las placas
50 a 355 nm/460 nm en un lector de placas espectrofotométrico.

También se cuantifica el leucotrieno C4 (LTC4) usando un kit de ELISA en muestras de sobrenadante diluidas apropiadamente (determinado empíricamente para cada población de células donantes de modo que la medición de la muestra se encuentre dentro de la curva patrón) siguiendo las instrucciones del proveedor.

55 *Activación por IgE de CHMC de alta densidad celular: Ensayos de desgranulación (triptasa, histamina), leucotrieno (LTC4) y citocina (TNFalfa, IL-13)*

60 Se sensibilizaron mastocitos humanos en cultivo (CHMC) durante 5 días con IL-4 (20 ng/ml), SCF (200 ng/ml), IL-6 (200 ng/ml) e IgE humana (CP 1035K de Cortx Biochem, 100-500 ng/ml dependiendo de la generación) en medio CM. Tras la sensibilización, se contaron las células, se sedimentaron (1000 rpm, 5-10 minutos) y se resuspendieron a 1-2 x10⁶ células/ml en tampón MT. Se añaden 100 ul de suspensión celular a cada pocillo y 100 ul de diluciones de compuesto. La concentración de vehículo final es DMSO al 0,5%. Se incuba a 37°C (5% de CO₂) durante 1 hora. Tras 1 hora de tratamiento con el compuesto, se estimulan las células con anticuerpo anti-IgE 6X. Se mezclan los
65 pocillos con las células y se dejan incubar las placas a 37°C (5% de CO₂) durante una hora. Tras la incubación de 1 hora, se sedimentan las células (10 minutos, 1000 RPM) y se recogen 200 ul por pocillo del sobrenadante, teniendo

cuidado de no alterar el sedimento. Se coloca la placa de sobrenadante en hielo. Durante la etapa de 7 horas (véase a continuación) se realiza el ensayo de triptasa en el sobrenadante que se había diluido 1:500. Se resuspende el sedimento de células en 240 μ l de medio CM que contiene DMSO al 0,5% y la concentración correspondiente de compuesto. Se incuban las células CHMC durante 7 horas a 37°C (5% de CO₂). Tras la incubación, se sedimentan las células (1000 RPM, 10 minutos) y se recogen 225 μ l por pocillo y se colocan en -80°C hasta que están listas para realizar los ELISA. Se realizan los ELISA en muestras diluidas apropiadamente (determinado empíricamente para cada población de células donantes de modo que la medición de la muestra se encuentre dentro de la curva patrón) siguiendo las instrucciones del proveedor.

10 *Resultados*

Los resultados de los ensayos de CHMC de baja densidad se facilitan en la tabla 1. En la tabla 1, todos los valores notificados son CI₅₀ (en μ M). La mayoría de los compuestos sometidos a prueba tenían CI₅₀ inferiores a 10 μ M, mostrando muchos CI₅₀ en el intervalo submicromolar. En la tabla 1, todos los valores notificados son CI₅₀ (en μ M). Un valor de “-” indica una CI₅₀ > 10 μ M, sin actividad medible a una concentración de 10 μ M. La mayoría de los compuestos sometidos a prueba tenían CI₅₀ inferiores a 10 μ M, mostrando muchos CI₅₀ en el intervalo submicromolar. Un valor de “+” indica una CI₅₀ < 10 μ M. De los compuestos sometidos a prueba, los valores de BMMC son comparables a los notificados para los resultados de CHMC.

20 Los compuestos de 2,4-pirimidindiamina de la invención inhiben selectivamente la cascada del receptor de IgE anterior

Para confirmar que muchos de los compuestos de 2,4-pirimidindiamina de la invención ejercen su actividad inhibitoria bloqueando o inhibiendo la cascada de transducción de señales del receptor de IgE temprana, se sometieron a prueba varios de los compuestos en ensayos celulares para determinar la desgranulación inducida por ionomicina, tal como se describe a continuación.

Activación por ionomicina de CHMC de baja densidad celular: Ensayo de triptasa

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

35 *Resultados*

Los resultados de los ensayos de desgranulación inducida por ionomicina, notificados como valores de CI₅₀ (en μ M) se proporcionan en la tabla 1. De los compuestos activos sometidos a prueba (es decir, los que inhiben la desgranulación inducida por IgE), la inmensa mayoría no inhiben la desgranulación inducida por ionomicina, lo que confirma que estos compuestos activos inhiben selectivamente la cascada de transducción de señales del receptor de IgE temprana (o anterior). En la tabla 1, todos los valores notificados son CI₅₀ (en μ M). Un valor de “-” indica una CI₅₀ > 10 μ M, sin actividad medible a una concentración de 10 μ M. Un valor de “+” indica una CI₅₀ < 10 μ M.

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

Se sometieron a prueba muchos de los compuestos de 2,4-pirimidindiamina para determinar la capacidad para inhibir la fosforilación catalizada por Syk cinasa de un sustrato peptídico en un ensayo bioquímico de polarización de fluorescencia con Syc cinasa aislada. En este experimento, se diluyeron los compuestos hasta DMSO al 1% en tampón cinasa (HEPES 20 mM, pH 7,4, MgCl₂ 5 mM, MnCl₂ 2 mM, DTT 1 mM, gammaglobulina bovina acetilada 0,1 mg/ml). Se mezcló el compuesto en DMSO al 1% (DMSO al 0,2% final) con disolución de ATP/sustrato a temperatura ambiente. Se añadió Syk cinasa (Upstate, Lake Placid NY) a un volumen de reacción final de 20 μ l, y se incubó la reacción durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las condiciones de la reacción enzimática final fueron HEPES 20 mM, pH 7,4, MgCl₂ 5 mM, MnCl₂ 2 mM, DTT 1 mM, gammaglobulina bovina acetilada 0,1 mg/ml, 0,125 ng de Syk, ATP 4 μ M, sustrato peptídico 2,5 μ M (biotina-EQEDEPEGDYEEVLE-CONH₂, SynPep Corporation). Se añadieron EDTA (10 mM final)/anticuerpo anti-fosfotirosina (1X final)/indicador de fosfopéptido fluorescente (0,5X final) en tampón de dilución FP para detener la reacción para un volumen total de 40 μ l según las instrucciones del fabricante (PanVera Corporation) Se incubó la placa durante 30 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Se leyeron las placas en un lector de placas de polarización de fluorescencia Polarion (Tecan). Se convirtieron los datos a la cantidad de fosfopéptido presente usando una curva de calibración generada por la competición con el competidor de fosfopéptido proporcionado en el kit de ensayo de tirosina cinasa, Green (PanVera Corporation).

Estos datos, mostrados en la tabla 1, demuestran que la mayoría de los compuestos sometidos a prueba inhiben la fosforilación de la Syk cinasa con CI₅₀ en el intervalo submicromolar. La inmensa mayoría de los compuestos

sometidos a prueba inhiben la fosforilación de la Syk cinasa con Cl_{50} en el intervalo micromolar. En la tabla 1, todos los valores notificados son Cl_{50} (en μM). Un valor de “-” indica una $Cl_{50} > 10 \mu M$, sin actividad medible a una concentración de $10 \mu M$. Un valor de “+” indica una $Cl_{50} < 10 \mu M$.

Número de compuesto	Nombre de compuesto	Datos físicos	LD Triptasa, CHMH, IgE, 3 pt.	LD Triptasa, CHMH, IgE, 8 pt.	LD Triptasa, CHMH, lono, 3 pt.	fp_syk, 11 pt
269	N4-(2,2-Dimetil-1,1,3-trioxo-4H-benzotiazin-6-il)-5-fluoro-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidindiamina	CL-EM: tiempo de ret. 11,28 min., pureza: 99%; EM (m/e): 518 (MH+)		+		+
292	N4-(2,2-Dimetil-3-oxo-4H-benzo[1,4]tiazin-6-il)-5-fluoro-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidindiamina	CL-EM: tiempo de ret. 11,86 min., pureza: 99%; EM (m/e): 486 (MH+)		+		
543	N4-(2,2-Dimetil-3-oxo-4H-benz[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidindiamina	CL-EM: pureza: 98%: EM (m/e): 470 (MH+):	+	+		+
549	N4-(4-Acetil-2,2-dimetil-3-oxo-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidindiamina	CL-EM: pureza: 97%: EM (m/e): 513 (M+)				
673	Sal de ácido bencenosulfónico de N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidindiamina	1H -RMN (DMSO-d6): d 11,14 (s, 1H), 9,98 (s, 1H), 9,63 (s, 1H), 8,17 (d, J= 3,9 Hz, 1H), 7,62-7,52 (m, 3H), 7,36-7,25 (m, 4H), 6,87 (s, 2H), 3,66 (s, 6H), 3,61 (s, 3H), 1,43 (s, 6H).	+	+		
674	Sal del ácido metanosulfónico de N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidindiamina	1H -RMN (DMSO-d6): d 11,13 (s, 1H), 9,95 (s, 1H), 9,62 (s, 1H), 8,18 (d, J= 3,9 Hz, 1H), 7,56 (d, J= 9,0 Hz, 1H), 7,31 (d, J= 8,4 Hz, 1H), 6,88 (s, 2H), 3,66 (s, 6H), 3,61 (s, 3H), 2,33 (s, 3H), 1,43 (s, 6H).	+	+		
675	Sal del ácido toluenosulfónico de N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidindiamina	1H -RMN (DMSO-d6): d 11,12 (s, 1H), 9,89 (s, 1H), 9,57 (s, 1H), 8,17 (d, J= 3,9 Hz, 1H), 7,57 (d, J= 8,4 Hz, 1H), 7,45 (d, J= 7,8 Hz, 2H), 7,31 (d, J= 8,4 Hz, 1H), 7,09 (d, J= 7,8 Hz, 2H), 6,89 (s, 2H). 3,66 (s, 6H), 3,61 (s, 3H), 2,28 (s, 3H), 1,43 (s, 6H).	+	+		
676	Sal del ácido hidroxibencenosulfónico de N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidindiamina	1H -RMN (DMSO-d6): d 11,12 (s, 1H), 9,81 (s, 1H), 9,53 (s, 1H), 8,16 (d, J= 4,2 Hz, 1H), 7,58 (d, J= 8,1 Hz, 2H), 7,37 (d, J= 8,1 Hz, 2H), 7,31 (d, J= 8,7 Hz, 1H), 6,90 (s, 2H), 6,64 (d, J= 8,7 Hz, 2H), 3,66 (s, 6H), 3,61 (s, 3H), 1,43 (s, 6H).	+	+		

677	Sal del ácido 2,4,6-trimetilbencenosulfónico de N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidindiamina	¹ H-RMN (DMSO-d6): 11,10 (s, 1H), 9,72 (s, 1H), 9,47 (s, 1H), 8,15 (d, J= 4,2 Hz, 1H), 7,62-7,56 (m, 1H), 7,31 (d, J= 8,1 Hz, 1H), 6,91 (s, 2H), 6,72 (s, 2H), 3,66 (s, 6H), 3,61 (s, 3H), 2,48 (s, 6H), 2,16 (s, 3H), 1,43 (s, 6H).	+			
678	Sal del 0,5 ácido piridin-3-sulfónico de N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidindiamina	¹ H-RMN (DMSO-d6): d 11,08 (s, 2H), 9,46 (s, 2H), 9,30 (s, 2H), 8,91 (s, 1H), 8,70 (d, J= 5,4 Hz, 1H), 8,37 (dd, J= 1,5 y 7,8 Hz, 1H), 8,13 (d, J= 3,6 Hz, 2H), 7,80-7,74 (m, 1H), 7,62 (d, J= 8,1 Hz, 2H), 7,31 (d, J= 8,1 Hz, 2H), 6,97 (s, 4H), 3,66 (s, 1H)	+	+		
679	Sal del ácido p-etilbencenosulfónico de N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidindiamina	¹ H-RMN (DMSO-d6): d 11,08 (s, 1H), 9,44 (s, 1H), 9,26 (s, 1H), 8,13 (d, J= 3,3 Hz, 1H), 7,63 (d, J= 8,4 Hz, 1H), 7,47 (d, J= 8,1 Hz, 2H), 7,31 (d, J= 8,1 Hz, 1H), 7,12 (d, J= 7,8 Hz, 2H), 6,97 (s, 2H), 3,65 (s, 6H), 3,59 (s, 3H), 2,57 (q, J= 7,8 Hz, 2H),	+	+		
680	Sal del 0,5 ácido 1,2-etanodifulsónico de N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidindiamina	¹ H-RMN (DMSO-d6): d 11,08 (s, 2H), 9,54 (s, 2H), 9,35 (s, 2H), 8,14 (d, J= 3,9 Hz, 2H), 7,60 (d, J= 8,4 Hz, 2H), 7,31 (d, J= 8,4 Hz, 2H), 6,95 (s, 4H), 3,66 (s, 12H), 3,60 (s, 6H), 2,62 (s, 4H), 1,43 (s, 12H).	+	+		
681	Sal del ácido (1R)-10-carforsulfónico de N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidindiamina	¹ H-RMN (DMSO-d6): d 11,11 (s, 1H), 9,83 (s, 1H), 9,54 (s, 1H), 8,17 (d, J= 3,9 Hz, 1H), 7,57 (d, J=8,7 Hz, 1H), 7,30 (d, J= 8,4 Hz, 1H), 6,99 (s, 2H), 3,66 (s, 6H), 3,61 (s, 3H), 2,86 (d, J=14,7 Hz, 1H), 2,67 (t, J= 9,9 Hz, 1H), 2,38 (d, J= 14,7 Hz, 1H)	+	+		
682	Sal del ácido (1S)-10-canforsulfónico de N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-5-piridil[4,1]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidindiamina	¹ H-RMN (DMSO-d6): d 11,08 (s, 1H), 9,55 (s, 1H), 9,36 (s, 1H), 8,14 (d, J= 3,9 Hz, 1H), 7,60 (d, J= 8,7 Hz, 1H), 7,31 (d, J= 8,4 Hz, 1H), 6,94 (s, 2H), 3,66 (s, 6H), 3,60 (s, 3H), 2,85 (d, J=14,7 Hz, 1H), 2,68 (t, 11,4 Hz, 1H), 2,36 (d, J= 14,7 Hz, 1H),	+	+		

685	Sal de cloruro de hidrógeno de N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidindiamina	¹ H-RMN (DMSO-d6): d 11,31 (s, 1H), 9,89 (s, 1H), 9,66 (s, 1H), 8,18 (d, J= 4,5 Hz, 1H), 7,55 (d, J= 8,4 Hz, 1H), 7,30 (d, J= 8,7 Hz, 1H), 6,89 (s, 2H), 3,65 (s, 6H), 3,61 (s, 3H), 1,43 (s, 6H)	+	+		
689	5-Fluoro-N4-(3-oxo-2,2,4-trimetil-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidindiamina	¹ H-RMN (DMSO-d6): d 9,42 (s, 1H), 9,13 (s, 1H), 8,14 (d, J= 3,6 Hz, 1H), 7,80 (d, J= 8,4 Hz, 1H), 7,32 (d, J= 8,4 Hz, 1H), 7,03 (s, 2H), 3,66 (s, 6H), 3,60 (s, 3H), 1,44 (s, 6H); CL-EM: pureza: 97%; EM (m/e): 485 (MH ⁺).		+		
690	N4-(2,2-Dimetil-4-carbometoximetil-3-oxo-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidindiamina	¹ H-RMN (DMSO-d6): d 9,46 (s, 1H), 9,15 (s, 1H), 8,15 (d, J= 3,6 Hz, 1H), 7,86 (d, J= 8,7 Hz, 1H), 7,37 (d, J= 8,7 Hz, 1H), 7,04 (s, 2H), 4,80 (s, 2H), 3,67 (s, 6H), 3,66 (s, 3H), 3,60 (s, 3H), 1,47 (s, 6H); CL-EM: pureza: 96%; EM (m/e): 543 (MH ⁺).		+		
1007	N4-(2,2-Dimetil-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidindiamina	¹ H-RMN (DMSO-d6): d 11,14 (1H, s), 9,24 (1H, s), 9,19 (1H, s), 8,21 (1H, d, J = 3,3 Hz), 7,76 (1H, d, J = 8,7 Hz), 7,41 (1H, d, J = 8,7 Hz), 7,12 (2H, s), 3,75 (6H, s), 3,69 (3H, s), 1,52 (6H, s); pureza 96%; EM (m/e): 471 (MH ⁺)	+	+	-	+
1340	N4-(2,2-Dimetil-3-oxo-4H-N4-oxo-5-pirido[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidindiamina	CL-EM: tiempo de ret.: 3,48 min. (método de 7 min.); pureza: 97,4%; EM (m/e): 487,3(MH ⁺).	+	+		

Los compuestos son eficaces para el tratamiento de la autoinmunidad

5 Se evaluó la eficacia *in vivo* de determinados compuestos de 2,4-pirimidindiamina hacia enfermedades autoinmunitarias en la reacción de Arthus pasiva inversa, un modelo agudo de lesión tisular mediada por antígeno-anticuerpo, y en varios modelos de enfermedad de autoinmunidad e inflamación. Estos modelos son similares porque un anticuerpo frente a un antígeno específico media en la enfermedad inflamatoria desencadenada por complejo inmunitario (desencadenada por IC) y la posterior destrucción tisular. La deposición de IC en sitios anatómicos específicos (sistema nervioso central (SNC)) para encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE) y líquido sinovial para artritis inducida por colágeno (CIA)) conduce a activación de células que expresan FcγR y FcεR de superficie, particularmente mastocitos, macrófagos y neutrófilos, lo que da como resultado liberación de citocinas y quimiotaxia de neutrófilos. La activación de la respuesta inflamatoria es responsable de respuestas efectoras posteriores, incluyendo edema, hemorragia, infiltración de neutrófilos y liberación de mediadores proinflamatorios. Las consecuencias de estos acontecimientos desencadenados por IC son difíciles de identificar en trastornos autoinmunitarios; no obstante, muchos investigadores han demostrado que la inhibición de la ruta de señalización de FcγR en estos modelos animales ha dado como resultado una reducción significativa en la aparición y la gravedad de la enfermedad.

20 Los compuestos son eficaces en la reacción de Arthus en ratón

Se demostró la eficacia *in vivo* del compuesto 1007 para inhibir la cascada inflamatoria desencadenada por IC en un modelo de ratón de reacción de Arthus pasiva inversa (reacción de RPA).

1 Modelo

5 La lesión tisular inflamatoria aguda mediada por complejo inmunitario (IC) está implicada en una variedad de enfermedades autoinmunitarias humanas, incluyendo síndrome de vasculitis, síndrome de enfermedad del suero, lupus eritematoso sistémico (SLE), artritis reumatoide, síndrome de Goodpasture y glomerulonefritis. El modelo experimental clásico para la lesión tisular mediada por IC es la reacción de Arthus pasiva inversa. El modelo de reacción de RPA es un método *in vivo* conveniente para estudiar la inflamación localizada, inducida por IC, sin efectos sistémicos. La inyección intradérmica de anticuerpos (Ac) específicos frente a albúmina de huevo de pollo (IgG de conejo anti-OVA), seguida por inyección intravenosa (i.v.) de antígenos (Ag), específicamente albúmina de huevo de pollo (ovoalbúmina, OVA), produce deposición perivascular de IC y una rápida respuesta inflamatoria caracterizada por edema, infiltración de neutrófilos y hemorragia en los sitios de inyección. Aspectos del modelo de reacción de RPA en ratón se asemejan a la respuesta inflamatoria de pacientes con artritis reumatoide, SLE y glomerulonefritis.

15 2 Protocolo de estudio

20 En este sistema modelo, el compuesto de prueba se administra a varios puntos de tiempo antes de la administración de Ac y Ag. Se inyecta por vía intradérmica una disolución de IgG de conejo anti-OVA (50 µg en 25 µl/ratón) y le sigue inmediatamente una inyección intravenosa de albúmina de huevo de pollo (20 mg/kg de peso corporal) en una disolución que contiene colorante azul de Evans al 1%. Se mide el grado de edema y hemorragia en la piel dorsal de ratones C57BL/6 usando el colorante azul de Evans como indicador del daño tisular local. Se usa IgG de conejo policlonal purificada como control.

25 El tiempo de pretratamiento, en el que se administra el compuesto de prueba antes de la exposición a Ac/Ag, es de 0,5 h según las propiedades farmacocinéticas (PK) de cada compuesto individual. Cuatro horas tras la inducción de la reacción de Arthus, se sacrifican los ratones y se recogen tejidos para la evaluación del edema. Este sistema modelo permite examinar rápidamente la actividad *in vivo* del compuesto.

30 3 Resultados

El compuesto sometido a prueba se administró por vía oral.

35 El compuesto 1007 mostró eficacia de inhibición del edema en un 89,4% y un 81,3%, respectivamente, cuando se administró a 1,0 mg/kg, 30 minutos antes de la exposición.

40 El compuesto 1007 mostró una inhibición del 64,3%, el 78,7%, el 98,1% y el 99,8% de la formación de edema cuando se administró a niveles de dosis de 0,1 mg/kg, 0,5 mg/kg, 1,0 mg/kg y 5 mg/kg y un tiempo de pretratamiento de 30, respectivamente. Los resultados para el compuesto sometido a prueba se resumen en la tabla 2.

Resumen de reacción de Arthus pasiva inversa (RPA) cutánea en ratón							
Nombre de compuesto	Número de compuesto	Dosificación (mg/kg)	Tiempo de pretratamiento (h)	Tamaño de edema ± EEM	Concentración plasmática ± EEM (ng/ml)	Concentración plasmática ± EEM (ng/ml)	Potencia <i>in vitro</i> (IgE frente a CHMC)
1007		1	0,5	89,4 ± 2,2			
		3	0,5	86,3 ± 7,9			
		10	0,5	97,8 ± 1,1			
		30	0,5	88,2 ± 5,7			
1007		0,1	0,5	64,3 ± 11,2	24,4 ± 9,6	BLQ	
		0,5	0,5	78,7 ± 6,3	73,1 ± 14,5	BLQ	
		1	0,5	98,1 ± 0,8	90,0 ± 11,0	2,3 ± 0,9	

		5	0,5	99,8 ± 0,2	398,0 ± 30,2	19,8 ± 15,7	
--	--	---	-----	------------	--------------	-------------	--

Los compuestos son eficaces en un modelo de artritis inducida por anticuerpos frente al colágeno en ratón

5 La eficacia *in vivo* de los compuestos hacia enfermedades autoinmunitarias puede demostrarse en un modelo de ratón de artritis inducida por anticuerpos frente al colágeno (CAIA).

1 Modelo

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

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

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

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

40 Al final del estudio (1-2 semanas tras la inducción de la artritis), se sacrifican los ratones y se realiza un corte transversal en la tibia distal de las patas usando una guillotina y se pesa. Se determina la media ± error estándar de la media (EEM) para cada grupo cada día a partir de las puntuaciones clínicas de animales individuales y se calculan los pesos de las patas traseras para cada grupo experimental y se registran a la terminación del estudio. Se obtiene la evaluación histopatológica de las patas.

2 Resultados

45 Debe ser evidente una inflamación e hinchazón reducidas en animales tratados con compuestos de la invención y la artritis progresaría más lentamente. El tratamiento con los compuestos (b.i.d.) debe reducir significativamente la artritis crónica en comparación con los animales tratados con vehículo únicamente.

Los compuestos pueden ser eficaces en la artritis inducida por colágeno en ratas

50 La eficacia *in vivo* de los compuestos de la invención hacia enfermedades autoinmunitarias puede demostrarse en un modelo de rata de artritis inducida por colágeno (CIA).

1 Descripción del modelo

55 La artritis reumatoide (RA) se caracteriza por inflamación crónica de las articulaciones que conduce finalmente a destrucción irreversible del cartílago. Son abundantes IC que contienen IgG en el tejido sinovial de pacientes con RA. Aunque todavía se está debatiendo qué papel desempeñan estos complejos en la etiología y la patología de la enfermedad, los IC se comunican con las células hematopoyéticas a través de FcγR.

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

2 Protocolo del estudio

5 Se inmunizaron ratas LOU singénicas en el día 0 con CII/IFA de pollo nativo (obtenido en UCLA; E. Brahn, investigador principal). Comenzando en el día de la aparición de la artritis (día 10), puede tratarse a un total de 59 ratas o bien con un control con vehículo o bien con un compuesto de la invención a uno de cuatro niveles de dosis (1, 3, 10 y 30 mg/kg, q.d. mediante sonda nasogástrica por v.o.).

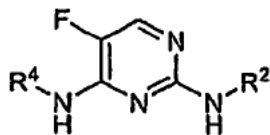
3 Resultados

10 Las extremidades traseras se puntuarían diariamente para determinar la gravedad de la artritis clínica usando un método normalizado basado en el grado de inflamación de las articulaciones. Pueden obtenerse radiografías digitales de alta resolución de las extremidades traseras a la conclusión del estudio (día 28). También pueden analizarse estas extremidades para determinar cambios histopatológicos. Pueden medirse los anticuerpos IgG
15 contra CII nativo por cuadruplicado mediante ELISA.

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

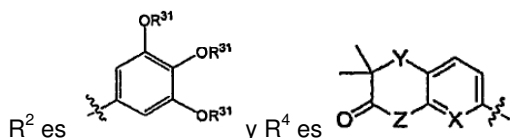
REIVINDICACIONES

1. Compuesto que es de fórmula estructural:



5

o es una sal, hidrato, solvato o N-óxido del mismo, en la que



10

en los que

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

15 Y se selecciona del grupo que consiste en O, S, SO, SO₂, SONR³⁶, NH, NR³⁵;

Z se selecciona del grupo que consiste en O, S, SO, SO₂, SONR³⁶, NH, NR³⁵;

20 cada R³¹ es independientemente alquilo (C1-C6);

20

cada R³⁵, independientemente de los otros, se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno y R⁸;

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

25

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

35

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

40

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

cada R^d es independientemente R^a;

50 cada m es independientemente un número entero desde 1 hasta 3;

50

cada n es independientemente un número entero desde 0 hasta 3; y

R³⁶ se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo (C1-C6).

55 2. Compuesto según la reivindicación 1, en el que R² es 3,4,5-trimetoxifenilo.

3. Compuesto según la reivindicación 2, en el que Y es O, Z es NH y X es N.

4. Compuesto según la reivindicación 1, seleccionado de:

N4-(2,2-dimetil-1,1,3-trioxo-4H-benzo[1,4]tiazin-6-il)-5-fluoro-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidindiamina;

N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-benzo[1,4]tiazin-6-il)-5-fluoro-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidindiamina;

N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-benz[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidindiamina;

N4-(4-acetil-2,2-dimetil-3-oxo-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidindiamina;

5-fluoro-N4-(3-oxo-2,2,4-trimetil-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidindiamina;

N4-(2,2-dimetil-4-carbometoximetil-3-oxo-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidindiamina;

o una sal, hidrato, solvato o N-óxido del mismo.

5. Sal del compuesto según la reivindicación 1, siendo el compuesto:

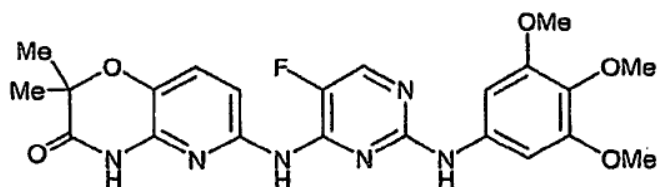
N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-5-pirid[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidindiamina, y seleccionándose la sal del grupo que consiste en: sal del ácido benzenosulfónico, sal del ácido metanosulfónico, sal del ácido p-toluenosulfónico, sal del ácido hidroxibenzenosulfónico, sal del ácido trimetilbenzenosulfónico, sal del ácido hemipiridin-3-sulfónico, sal del ácido p-etilbenzenosulfónico, sal del ácido hemi-1,2-etanodisulfónico, sal del ácido (1R)-10-canforsulfónico, sal del ácido (1S)-10-canforsulfónico y sal de cloruro de hidrógeno.

6. Compuesto según la reivindicación 2, en el que Y es O.

7. Compuesto según la reivindicación 2, en el que Z es NH.

8. Compuesto según la reivindicación 2, en el que X es N.

9. Compuesto según la reivindicación 1, que tiene la estructura:



10. Compuesto según la reivindicación 4 ó 9, que es una sal de adición de un ácido seleccionado de ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido yodhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido propiónico, ácido hexanoico, ácido ciclopentanopropiónico, ácido glicólico, ácido oxálico, ácido pirúvico, ácido láctico, ácido malónico, ácido succínico, ácido málico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido palmítico, ácido benzoico, ácido 3-(4-hidroxi-benzoil)benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido 1,2-etano-disulfónico, ácido 2-hidroxi-etanosulfónico, ácido benzenosulfónico, ácido 4-clorobenzenosulfónico, ácido 2-naftalenosulfónico, ácido 4-toluenosulfónico, ácido canforsulfónico, ácido 4-metilbencilo[2.2.2]-oct-2-en-1-carboxílico, ácido glucoheptónico, ácido 3-fenilpropiónico, ácido trimetilacético, ácido butilacético terciario, ácido laurilsulfúrico, ácido glucónico, ácido glutámico, ácido hidroxinaftoico, ácido salicílico, ácido esteárico y ácido mucónico.

11. Composición farmacéutica que comprende un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 y que comprende además un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

12. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.

13. Compuesto o composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para su uso en un método de tratamiento o prevención de una enfermedad autoinmunitaria.

14. Compuesto o composición según la reivindicación 13, seleccionándose la enfermedad autoinmunitaria del grupo que consiste en rechazo de aloinjerto, tiroiditis de Hashimoto, anemia hemolítica autoinmunitaria, gastritis atrófica autoinmunitaria de la anemia perniciosa, encefalomielititis autoinmunitaria, orquitis autoinmunitaria, enfermedad de

Goodpasture, trombocitopenia autoinmunitaria, oftalmia simpática, miastenia grave, enfermedad de Grave, cirrosis biliar primaria, hepatitis agresiva crónica, glomerulopatía membranosa y una enfermedad autoinmunitaria que implica un trastorno autoinmunitario sistémico.

- 5 15. Compuesto o composición según la reivindicación 14, seleccionándose la enfermedad autoinmunitaria que implica trastorno autoinmunitario sistémico del grupo que consiste en lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, síndrome de Sjorgen, síndrome de Reiter, polimiositis-dermatomiositis, esclerosis sistémica, poliarteritis nudosa, esclerosis múltiple y penfigoide vesicular.
- 10 16. Compuesto o composición según la reivindicación 13, siendo la enfermedad autoinmunitaria rechazo de aloinjerto.
- 15 17. Compuesto o composición según la reivindicación 13, siendo la enfermedad autoinmunitaria lupus eritematoso sistémico.
18. Compuesto o composición según la reivindicación 13, siendo la enfermedad autoinmunitaria artritis reumatoide.
19. Compuesto o composición según la reivindicación 13, siendo la enfermedad autoinmunitaria esclerosis múltiple.
- 20 20. Uso de un compuesto o composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-11 en la fabricación de un medicamento eficaz en el tratamiento o la prevención de una enfermedad autoinmunitaria.
21. Uso de un compuesto o composición según la reivindicación 20, siendo la enfermedad autoinmunitaria según una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 19.

FIG. 1

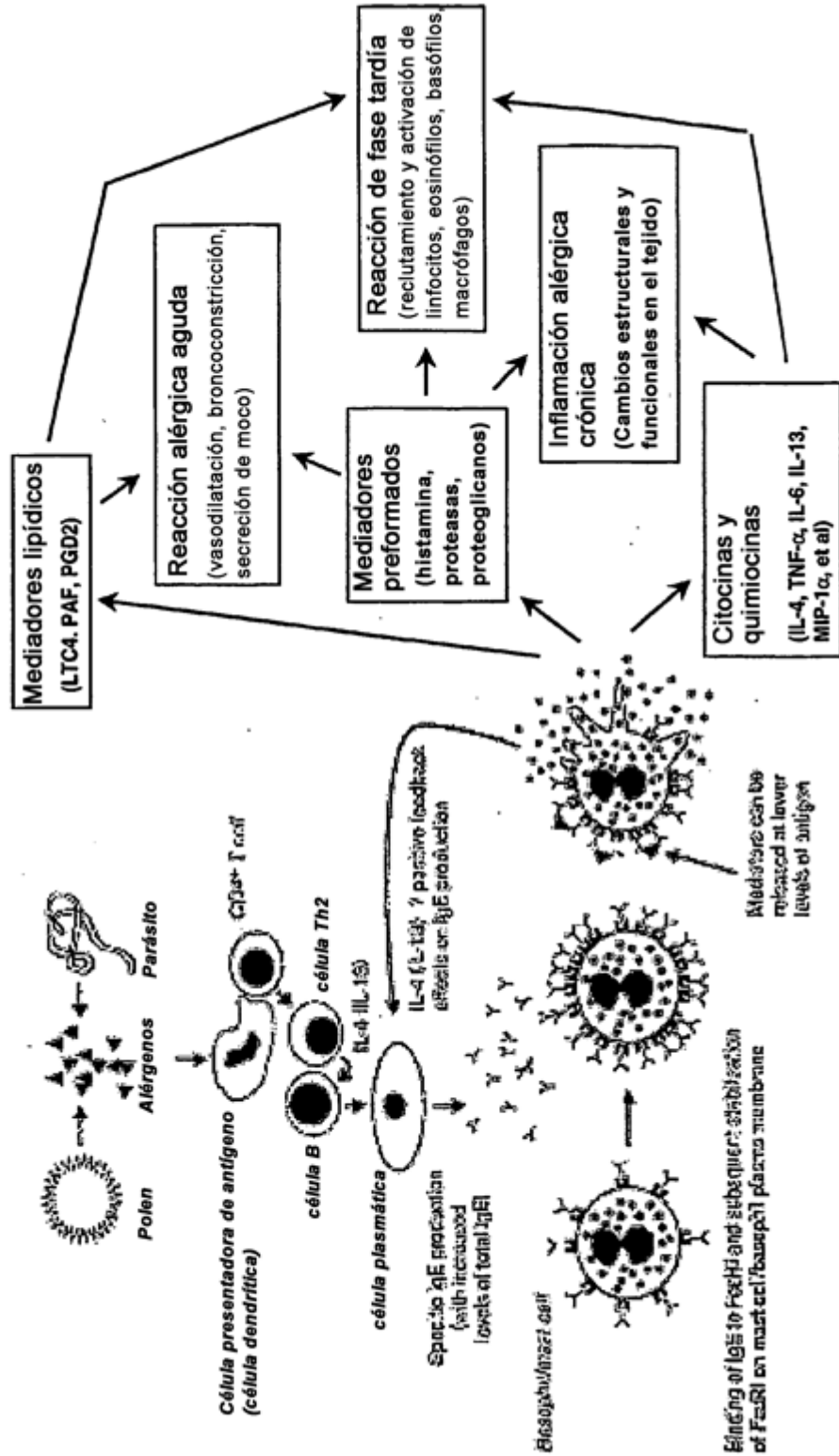


FIG. 2
Ruta de señalización de FcεRI de mastocitos

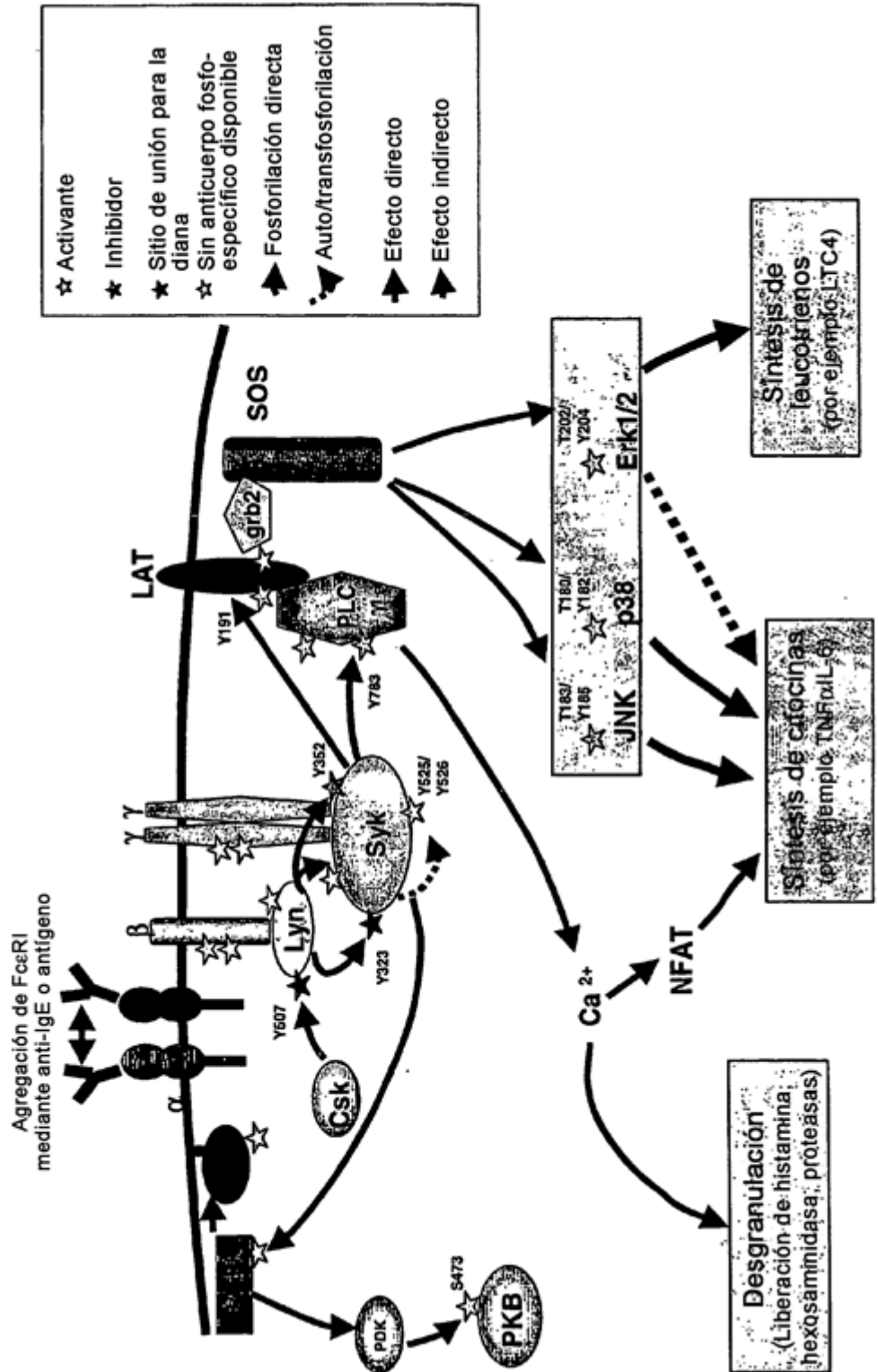


FIG. 3

