

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 433 109**

51 Int. Cl.:

C07D 405/12 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 31/506 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.01.2010 E 10700169 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2013 EP 2376481**

54 Título: **Derivados de pirimidin-carboxamida como inhibidores de la Syk cinasa**

30 Prioridad:

13.01.2009 US 144210 P

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

09.12.2013

73 Titular/es:

**GLAXO GROUP LIMITED (100.0%)
980 Great West Road
Brentford, Middlesex TW8 9GS , GB**

72 Inventor/es:

**ATKINSON, FRANCIS, LOUIS y
PATEL, VIPULKUMAR, KANTIBHAI**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 433 109 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

Derivados de pirimidin-carboxamida como inhibidores de la Syk cinasa.

La presente invención se refiere a compuestos químicos novedosos que tienen actividad contra la tirosincinasa del bazo (Syk cinasa), a procedimientos para su preparación, formulaciones farmacéuticamente aceptables que los contienen, y a su uso en terapia.

La Syk cinasa es una tirosincinasa no receptora que está involucrada en el acoplamiento de los inmuno-receptores activados a los eventos corriente abajo de las señales que median diversas respuestas celulares, incluyendo proliferación, diferenciación, y fagocitosis. La Syk cinasa se expresa ampliamente en las células hematopoyéticas. Los inhibidores de la Syk cinasa tienen actividades anti-inflamatorias e inmunomoduladoras potenciales. Inhiben la señalización del receptor de BCR y del receptor de Fc épsilon y gamma de IgG mediada por la Syk cinasa, dando como resultado la inhibición de la activación de los mastocitos, los macrófagos, y las linfocitos B, y de las respuestas inflamatorias y daño del tejido relacionado. De conformidad con lo anterior, los inhibidores de la Syk cinasa han atraído el interés hacia una serie de áreas terapéuticas, incluyendo el tratamiento de artritis reumatoide, linfoma de linfocitos B, y asma / rinitis.

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmunitaria que afecta a aproximadamente el 1 % de la población. Se caracteriza por inflamación de las articulaciones, lo que conduce a una destrucción debilitante de los huesos y cartílagos. Estudios clínicos recientes con Rituximab, que provoca un agotamiento reversible de los linfocitos B (J. C.W. Edwards y colaboradores 2004, *New Eng. J. Med.* 350: 2572-2581), han demostrado que la función de dirección hacia los linfocitos B es una estrategia terapéutica apropiada en las enfermedades autoinmunitarias, tales como la artritis reumatoide (AR). El beneficio clínico se correlaciona con una reducción en los anticuerpos auto-reactivos (o Factor Reumatoide), y estos estudios sugieren que la función de las linfocitos B, y en realidad la producción de auto-anticuerpos, son fundamentales en la patología continua de la enfermedad.

Estudios que utilizan células de ratones deficientes en Syk cinasa han demostrado una función no redundante de esta cinasa en la función de los linfocitos B. La deficiencia en Syk cinasa se caracteriza por un bloqueo en el desarrollo de los linfocitos B (M. Turner y colaboradores 1995, *Nature* 379: 298-302, y Cheng y colaboradores 1995, *Nature* 378: 303-306). Estos estudios, junto con los estudios sobre los linfocitos B maduros deficientes en Syk cinasa (Kurasaki y colaboradores 2000, *Immunol. Rev.* 176: 19-29), demuestran que la Syk cinasa es requerida para la diferenciación y activación de los linfocitos B. Por consiguiente, la inhibición de la Syk cinasa en los pacientes con artritis reumatoide (AR) tiene probabilidades de bloquear la función de los linfocitos B y, por consiguiente, de reducir la producción del Factor Reumatoide. Además del papel de la Syk cinasa en la función de los linfocitos B, de relevancia para el tratamiento de la artritis reumatoide (AR), está el requerimiento de actividad de Syk cinasa en la señalización del receptor de Fc (FcR). Se ha sugerido que la activación del FcR mediante los complejos inmunitarios en la artritis reumatoide (AR) contribuye a la liberación de múltiples mediadores pro-inflamatorios.

La contribución de los procedimientos dependientes de la Syk cinasa a la patología de la artritis reumatoide (AR) ha sido recapitulada por Wong y colaboradores (2004, *ibid*).

Se han publicado los resultados de un estudio clínico de 12 semanas para el inhibidor de la Syk cinasa R788 (fostamatinib-disodio, Rigel): Treatment of rheumatoid arthritis with a syk kinase inhibitor: A twelve-week, randomized, placebo-controlled trial, *Arthritis & Rheumatis*, 58(11), 2008, 3309-3318.

Los inhibidores de Syk también pueden ser útiles en la terapia del cáncer, específicamente de las neoplasias malignas hemáticas, en particular de los linfomas no Hodgkin, incluyendo linfoma folicular (LF), linfoma de células de manto, linfoma de Burkitt, y linfoma difuso de linfocitos B grandes (DLBCL, del inglés Diffuse Large B Cell).

Los estudios han demostrado que la Syk está desregulada por sobre-expresión y/o activación constitutiva en una variedad de tumores primarios de linfoma B, y también en líneas celulares de linfoma B. La Syk, a través de la ruta de PI3K / AKT, la ruta de PLD, y la señalización independiente de AKT, activa el mTor (objetivo de rapamicina de mamífero), lo que a su vez aumenta la supervivencia y la proliferación de los linfocitos B. La inhibición de Syk, *in vitro*, da como resultado una disminución de la activación de mTor y una reducción de la clonogenicidad en las células del linfoma folicular (LF). La inhibición de la Syk cinasa con curcumina en un modelo de linfoma-B de murino (BKS-2), dio una reducción significativa en la carga tumoral, al medirse por el número total de esplenocitos. (Leseux L. y colaboradores, *Blood*, 15 de Diciembre de 2006, Volumen 108, Número 13, páginas 4156-4162, y Gururajan M. y colaboradores, *Journal of Immunology*, 2007, 178, páginas 111-121).

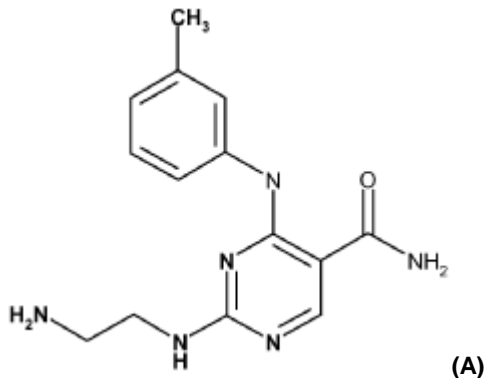
Los resultados de un estudio clínico en Fase 2 del R788 (fostamatinib-disodio) en los pacientes con linfoma no Hodgkin (NHL) de linfocitos B recurrente o refractario muestran que el compuesto es bien tolerado por estos pacientes, así como muestran un beneficio terapéutico en los pacientes que padecen de linfoma difuso de linfocitos B grandes (DLBCL), y leucemia linfocítica crónica/linfoma linfocítico microcelular (CLL/SLL). A pesar del hecho de que los pacientes inscritos en este estudio tenían la enfermedad avanzada y habían fracasado con el tratamiento con las terapias comercializadas, un número significativo de ellos respondieron particularmente a la inhibición de Syk con el R788 (www.Rigel.com).

5 Los inhibidores de Syk también pueden ser útiles en el tratamiento de asma y rinitis debido a que son importantes en la transducción de las señales celulares corriente abajo asociadas con la reticulación de los receptores FcεR1 y/o FcγR1, y se colocan temprano en la cascada de señalización. En los mastocitos, por ejemplo, la secuencia temprana de la señalización del FcεR1 después de la reticulación con el alérgeno de los complejos de receptor-IgE involucra primero a Lyn (una tirosincinasa de la familia Src), y luego a la Syk cinasa.

10 La rinitis alérgica y el asma son enfermedades asociadas con las reacciones de hipersensibilidad y los eventos inflamatorios que involucran una multitud de tipos de células, incluyendo mastocitos, eosinófilos, linfocitos T y células dendríticas. Después de la exposición al alérgeno, los receptores de inmunoglobulina de alta afinidad para IgE (FcεR1) e IgG (FcγR1) llegan a reticularse y a activar los procedimientos corriente abajo en los mastocitos y otros tipos de células, conduciendo a la liberación de los mediadores pro-inflamatorios y de los espasmógenos de las vías respiratorias. En el mastocito, por ejemplo, la reticulación del receptor de IgE por el alérgeno conduce a la liberación de mediadores, incluyendo la histamina, de los gránulos pre-formados, así como a la síntesis y liberación de los mediadores de lípidos recién sintetizados, incluyendo las prostaglandinas y los leucotrienos.

15 Se ha demostrado que el inhibidor de la Syk cinasa R112 (Rigel) dosificado intranasalmente en un estudio en fase I/II para el tratamiento de rinitis alérgica da una disminución estadísticamente significativa en PGD₂, un mediador inmunitario clave que está altamente correlacionado con mejoras en la rinorrea alérgica, así como es seguro a través de una gama de indicadores, proporcionando, por consiguiente, la primera evidencia de la seguridad y eficacia clínica de un inhibidor de la Syk cinasa tópico (véase Meltzer, Eli O.; Berkowitz, Robert B.; Grossbard, Elliott B. An intranasal Syk kinase inhibitor (R112) improves the symptoms of seasonal allergic rhinitis in a park environment. Journal of Allergy and Clinical Immunology (2005), 115(4), 791-796). En un estudio clínico en fase II adicional para la rinitis alérgica, sin embargo, se demostró que el R112 tenía una falta de eficacia contra el placebo (Clinical Trials.gov Identifier NCT0015089).

20 Los documentos EP1184376B1 / WO200007513 y EP1054004 / WO9903101073 (Yamanouchi Pharmaceutical Co Ltd) describen novedosos derivados heterocíclicos de carboxamida que tienen una actividad inhibidora de Syk. Éstos se describen adicionalmente en "Synthetic studies on novel Syk Inhibitors. Parte 1: Synthesis and structure-activity relationships of 5-pyrimidine-5-carboxamide derivatives (H. Hisamichi y colaboradores, Bioorg Med Chem 13 (2005) 4936 - 4951). En particular, a partir de este documento, parecería que el compuesto preferente es el compuesto de la fórmula (A):

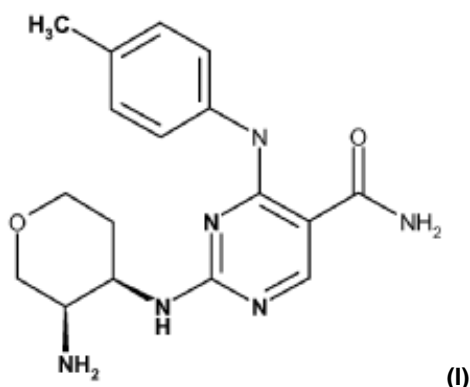


30 El alcance del documento WO9903101073 describe una gama más amplia de análogos, incluyendo un conjunto en donde el resto de etilendiamina está reemplazado por *cis*-1,2-diaminociclohexilo.

El documento WO 04/035604 divulga las coordenadas estructurales de la proteína Syk humana.

Sin embargo sigue existiendo la necesidad de identificar compuestos adicionales que sean inhibidores de la Syk cinasa.

35 Por consiguiente, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de la fórmula (I):



o una sal, preferentemente una sal farmacéuticamente aceptable, del mismo.

El compuesto de la fórmula (I) tiene el nombre químico:

2-[(3R,4R)-3-aminotetrahidro-2H-piran-4-il-amino]-4-[(4-metilfenil)amino]-5-pirimidincarboxamida.

5 Los compuestos de la presente invención son útiles como inhibidores de Syk. Los compuestos de la presente invención también exhiben selectividad para la Syk cinasa frente a otras cinasas clave, por ejemplo al menos 10 veces (basándose ya sea en los valores pKi o pCI₅₀ para las enzimas), en particular las cinasas VEGFR2 y Aurora B. Los compuestos de la presente invención también exhiben una baja actividad en el ensayo de hERG, una medida clave de la toxicidad cardíaca potencial.

10 Los compuestos de la presente invención, por consiguiente, son potencialmente útiles en el tratamiento de algunas terapias de cáncer, en particular de neoplasias malignas hemínicas, así como de enfermedades inflamatorias que involucren a los linfocitos B y/o a los macrófagos activados, y también de enfermedades resultantes de una activación inapropiada de los mastocitos, por ejemplo, enfermedades alérgicas e inflamatorias.

15 Cuando se utiliza en este documento, la expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a los compuestos, materiales, composiciones, y formas farmacéuticas que, dentro del alcance de un buen juicio médico, sean adecuados para utilizarse en contacto con los tejidos de los seres humanos y animales sin una toxicidad excesiva, irritación, u otro problema o complicación, de una manera acorde con una relación razonable de beneficio/riesgo. El experto apreciará que se pueden preparar sales farmacéuticamente aceptables del compuesto de la presente invención.

20 Como se utiliza en este documento, la expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a las sales que conservan la actividad biológica deseada del compuesto objeto y que exhiben efectos toxicológicos indeseados mínimos. Estas sales farmacéuticamente aceptables se pueden preparar *in situ* durante el aislamiento y la purificación final del compuesto, o haciendo reaccionar por separado el compuesto purificado en su forma de ácido libre o de base libre, con una base o ácido adecuado, respectivamente. En realidad, en ciertas realizaciones de la
 25 invención, se pueden preferir las sales farmacéuticamente aceptables sobre la base libre o el ácido libre respectivo, debido a que estas sales imparten mayor estabilidad o solubilidad a la molécula, facilitando de esta manera la formulación en una forma farmacéutica.

El compuesto de la fórmula (I) es básico y, de conformidad con lo anterior, en términos generales, es capaz de formar sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables mediante tratamiento con un ácido adecuado. Los
 30 ácidos adecuados incluyen los ácidos inorgánicos farmacéuticamente aceptables y los ácidos orgánicos farmacéuticamente aceptables. Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables representativas incluyen clorhidrato, bromhidrato, nitrato, metilnitrato, sulfato, bisulfato, sulfamato, fosfato, acetato, hidroxiacetato, fenilacetato, propionato, butirato, isobutirato, valerato, maleato, hidroximaleato, acrilato, fumarato, malato, tartrato, citrato, salicilato, p-aminosalicilato, glicolato, lactato, heptanoato, ftalato, oxalato, succinato, benzoato, o-
 35 acetoxibenzoato, clorobenzoato, metilbenzoato, dinitrobenzoato, hidroxibenzoato, metoxibenzoato, mandelato, tanato, formiato, estearato, ascorbato, palmitato, oleato, piruvato, pamoato, malonato, laurato, glutarato, glutamato, estolato, metansulfonato (mesilato), etansulfonato (esilato), 2hidroxietansulfonato, bencensulfonato (besilato), p-aminobencensulfonato, ptoluensulfonato (tosilato), y naftalen-2-sulfonato.

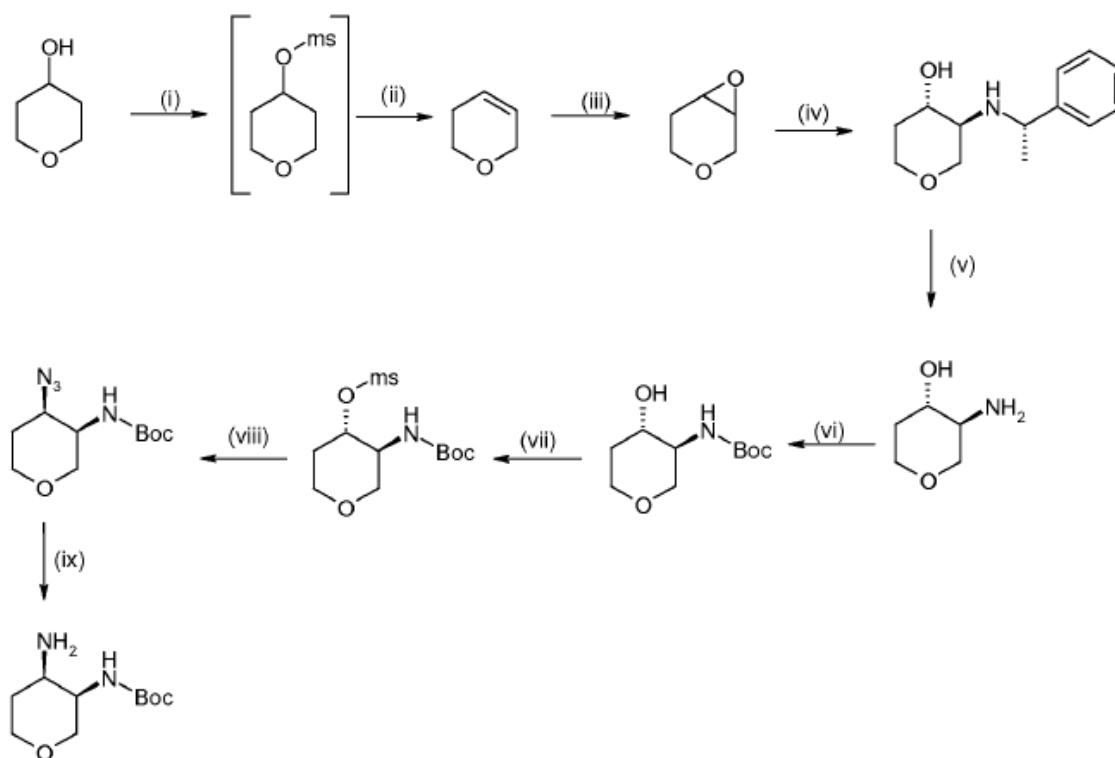
Un compuesto de la presente invención puede existir en una forma sólida o líquida. En el estado sólido, el
 40 compuesto de la presente invención puede existir en forma cristalina o no cristalina (amorfa), o como una mezcla de las mismas. Para un compuesto de la presente invención que está en forma cristalina, el experto apreciará que se pueden formar solvatos farmacéuticamente aceptables cuando se incorporan moléculas de disolvente en la red cristalina durante la cristalización. Los solvatos pueden involucrar disolventes no acuosos, tales como, pero no limitándose a, etanol, isopropanol, butanol normal, isobutanol, acetona, tetrahidrofurano, dioxano, dimetilsulfóxido,
 45 ácido acético, etanolamina, y acetato de etilo, o pueden involucrar agua como el disolvente que se incorpore en la

red cristalina. Los solvatos en los que el disolvente incorporado en la red cristalina es agua se designan generalmente como "hidratos". Los hidratos incluyen a los hidratos estequiométricos, así como las composiciones que contengan cantidades variables de agua. La invención incluye todos estos solvatos.

5 El experto apreciará además que un compuesto de la presente invención que exista en una forma cristalina, incluyendo los diferentes solvatos del mismo, puede exhibir polimorfismo (es decir, la capacidad para presentarse en diferentes estructuras cristalinas). Estas diferentes formas cristalinas son generalmente conocidas como "polimorfos". La invención incluye todos estos polimorfos. Los polimorfos tienen la misma composición química pero difieren en el empaquetado, configuración geométrica, y otras propiedades descriptivas del estado sólido cristalino. Los polimorfos, por consiguiente, pueden tener diferentes propiedades físicas, tales como las propiedades de forma, densidad, dureza, deformabilidad, estabilidad, y disolución. Los polimorfos generalmente exhiben diferentes puntos de fusión, espectros IR, y patrones de difracción en polvo de rayos X, los cuales se pueden utilizar para la identificación. El experto apreciará que se pueden producir diferentes polimorfos, por ejemplo, cambiando o ajustando las condiciones de reacción o los reactivos utilizados en la elaboración del compuesto. Por ejemplo, los cambios en la temperatura, presión, o disolvente, pueden dar como resultado polimorfos. Además, un polimorfo se puede convertir de una manera espontánea en otro polimorfo bajo ciertas condiciones.

El compuesto de la fórmula (I), o la sal del mismo, se puede preparar mediante el esquema sintético general descrito a continuación en este documento.

Esquema 1 - Síntesis de [(3R,4R)-4-amino-tetrahydro-2H-piran-3-il]-carbamato de 1,1-dimetil-etilo



20

(i) Cloruro de mesilo, Et₃N, DCM;

(ii) DBU;

(iii) mCPBA, CHCl₃;

(iv) [(1S)-1-feniletil]amina, 2-PrOH/70°C o 2-BUOH/90°C;

25

(v) Pd(OH)₂/C, H₂, EtOH;

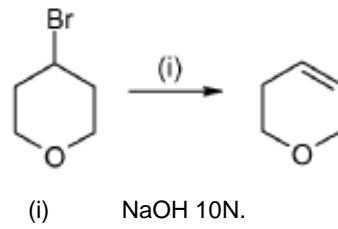
(vi) (Boc)₂O, Et₃N, MeOH;

(vii) Cloruro de mesilo, Et₃N, DCM;

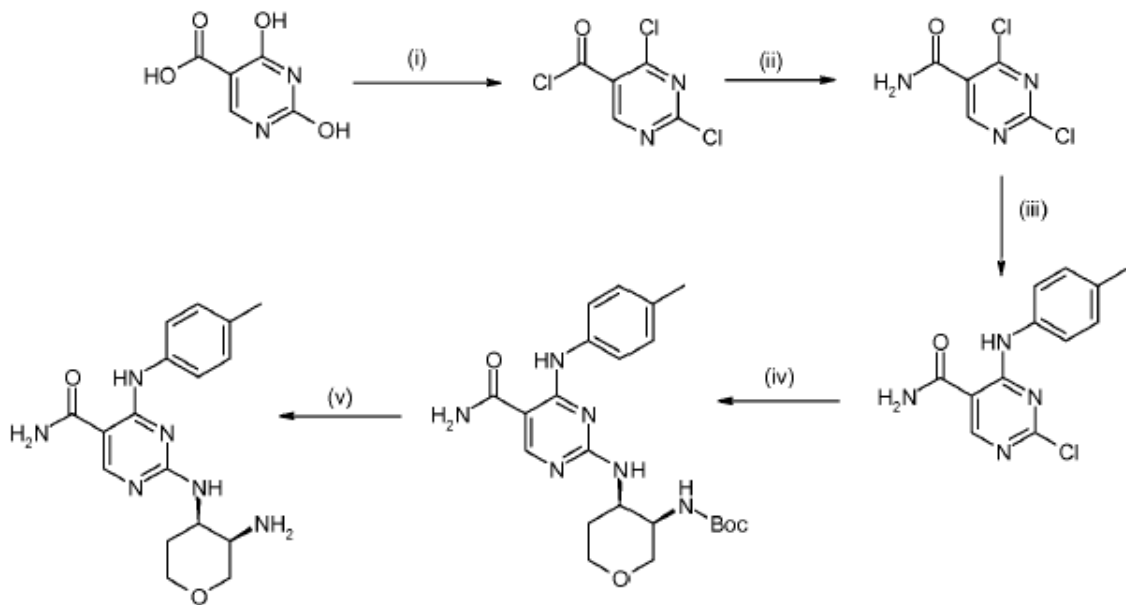
(viii) NaN₃, NaOAc, DMF;

(ix) PtO₂, H₂, EtOH.

Esquema 2 - Síntesis alternativa de 3,6-dihidro-2H-pirano



5 Esquema 3



(i) PCl₅;

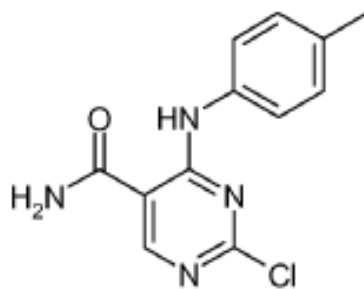
(ii) NH₃, 1,4-dioxano;

10 (iii) P-toluidina, Et₃N, DMF;

(iv) [(3R,4R)-4-aminotetrahidro-2H-piran-3-il]carbamato de 1,1-dimetiletilo, Et₃N, DMF;

(v) HCl / isopropanol.

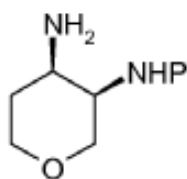
De conformidad con lo anterior, en un aspecto adicional, la presente invención proporciona un procedimiento para la preparación de un compuesto de la fórmula (I), procedimiento que comprende tratar un compuesto de la fórmula (II):



(II)

15

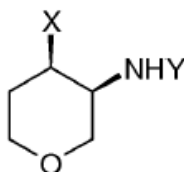
con un compuesto de la fórmula:



(III)

en donde P es un grupo protector, por ejemplo, terc-butoxicarbonilo (Boc), y posteriormente, eliminar el grupo protector.

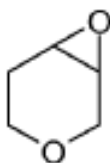
- 5 Los siguientes compuestos intermedios de la fórmula (IV):



(IV)

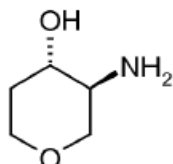
- 10 en la que X es N₃ o NH₂, e Y es un grupo protector, por ejemplo terc-butoxicarbonilo (Boc), y que tiene la estereoquímica **(3R,4R)**; son novedosos y útiles en la preparación de los compuestos de la fórmula (I), y por consiguiente, proporcionan un aspecto adicional de la invención.

Un aspecto importante en la preparación de un compuesto de la fórmula (III) y (IV) es la introducción de la estereoquímica apropiada en C-3 y C-4. Se ha encontrado que esto se puede efectuar convenientemente mediante la apertura regioespecífica del epóxido de la fórmula (V):



(V)

- 15 en C-3, mediante la reacción con un precursor de amina quiral, tal como [(1S)-1-feniletil]amina, en un alcohol de 2 a 4 átomos de carbono, preferentemente un alcohol secundario, tal como 2-propanol o 2-butanol, a una temperatura elevada, preferentemente bajo condiciones de reflujo. La reacción también se puede llevar a cabo en presencia de trimetilaluminio, en un disolvente tal como diclorometano, seguido por el procesamiento con fluoruro de sodio, para descomponer el aluminato. El producto de reacción inicial es potencialmente una mezcla de dos diastereoisómeros C-3 y dos diastereoisómeros C-4, dependiendo la relación C-3 : C-4, de la regioespecificidad de la apertura del anillo de epóxido. La mezcla de regioisómeros C-3 se puede separar entonces, y se elimina el resto quiral, para dar el intermedio deseado de 3-amino, 4-hidroxi-tetrahidropirano de la fórmula (VI):



(VI)

- 25 con una alta pureza enantiomérica.

- 30 De conformidad con lo anterior, en un aspecto adicional, la presente invención proporciona la preparación de un compuesto de la fórmula (IV) o (IV), cuyos procedimientos comprende el paso de hacer reaccionar el compuesto de la fórmula (V) con un precursor de amina quiral, tal como [(1S)-1-feni-etil]amina, en un alcohol de 2 a 4 átomos de carbono, preferentemente un alcohol secundario, tal como 2-propanol o 2-butanol, a una temperatura elevada, preferentemente bajo condiciones de reflujo.

Se apreciará que en algunas casos puede ser útil emplear un grupo protector. Los ejemplos de los grupos

- 5 protectores y de los medios para su eliminación se pueden encontrar en T. W. Greene 'Protective Groups in Organic Synthesis' (J. Wiley and Sons, 1991). Los grupos protectores de amina adecuados incluyen, pero no se restringen a, sulfonilo (tal como tosilo), acilo (tal como benciloxicarbonilo o terc-butoxicarbonilo), y arilalquilo (tal como bencilo), los cuales se pueden eliminar mediante hidrólisis o hidrogenólisis, como sea apropiado. Otros grupos protectores de amina adecuados incluyen trifluoroacetilo (-C(O)CF₃), el cual se puede eliminar mediante hidrólisis catalizada por base, o un grupo bencilo enlazado a resina en fase sólida, tal como un grupo 2,6-dimetoxibencilo enlazado a resina Merrifield (enlazador de Ellman), el cual se puede eliminar mediante hidrólisis catalizada por ácido (utilizando, por ejemplo, ácido trifluoroacético).
- 10 Los compuestos de la presente invención son útiles como inhibidores de Syk y, por consiguiente, son potencialmente útiles en el tratamiento de algunas terapias de cáncer, en particular de neoplasias malignas hemáticas, así como de enfermedades inflamatorias que involucren a los linfocitos B, y también de las enfermedades resultantes de una activación inapropiada de los mastocitos, por ejemplo, de enfermedades alérgicas e inflamatorias.
- 15 Por consiguiente, en un aspecto adicional, la presente invención proporciona un compuesto de la fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en terapia.
- 15 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un procedimiento, que comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad efectiva de un compuesto de la fórmula (I), o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para inhibir la Syk cinasa.
- 20 Los inhibidores de Syk pueden ser útiles en la terapia del cáncer, específicamente de las neoplasias malignas hemáticas, en particular de los linfomas no Hodgkin, incluyendo linfoma folicular (LF), linfoma de células de manto, linfoma linfocítico microcelular/linfoma linfocítico crónico (SLL/CLL), linfoma de Burkitt, y linfoma difuso de linfocitos B grandes (DLBCL).
- 25 De conformidad con lo anterior, en un aspecto adicional, la presente invención proporciona un procedimiento para el tratamiento de cáncer, específicamente de las neoplasias malignas hemáticas, en particular de los linfomas no Hodgkin, incluyendo linfoma folicular (LF), linfoma de células de manto, linfoma de Burkitt, y linfoma difuso de linfocitos B grandes (DLBCL), procedimiento que comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad efectiva de un compuesto de la fórmula (I), o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 30 Los compuestos de la presente invención también se pueden utilizar en la quimioterapia de cáncer en combinación con otras clases de agentes de quimioterapia de cáncer que son conocidos en la técnica. Las clases representativas de los agentes para utilizarse en estas combinaciones para linfomas no Hodgkin incluyen ritaximab, BEXXAR (tositumomab y yodo I 131 tositumomab), pixantrona y quimioterapia. La combinación de los compuestos de la presente invención también se puede utilizar en combinación con la pauta de fármacos CHOP (Ciclofosfamida, Adriamicina, Vincristina, Prednisona) o CHOP más ritaximab (CHOP+R).
- 35 Los compuestos de la presente invención son potencialmente útiles en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias que involucren la activación de los linfocitos B y/o de los macrófagos, por ejemplo, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjorgens, granulomatosis de Wegener, penfigoide bulloso, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), arteriosis de células gigantes, urticaria idiopática crónica con y sin estado de auto-anticuerpos (urticaria autoinmunitaria crónica) (New concepts in chronic urticaria Current Opinions in Immunology 2008 20: 709-716), glomerulonefritis, rechazo crónico de trasplante, y artritis reumatoide.
- 40 También se describe un procedimiento para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria que involucre a los linfocitos B, procedimiento que comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad efectiva de un compuesto de la fórmula (I), o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- Los compuestos de la presente invención son potencialmente útiles en el tratamiento de las enfermedades resultantes de una activación inapropiada de los mastocitos, por ejemplo, enfermedades alérgicas e inflamatorias.
- 45 También se describe un procedimiento para el tratamiento de una activación inapropiada de los mastocitos, procedimiento que comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad efectiva de un compuesto de la fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- También se describe un procedimiento para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria, procedimiento que comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad efectiva de un compuesto de la fórmula (I), o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 50 También se describe un procedimiento para el tratamiento de un trastorno alérgico, que comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad efectiva de un compuesto de la fórmula (I), o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 55 Las enfermedades y las afecciones patológicas que se piensa que son mediadas por la Syk cinasa incluyen los trastornos inflamatorios y alérgicos que involucran la activación de los mastocitos, tales como enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), síndrome disneico agudo del adulto (SDAA), asma, colitis ulcerosa, enfermedad de

Crohn, bronquitis, conjuntivitis, soriasis, esclerodoma, urticaria, dermatitis, y rinitis alérgica.

Los compuestos de la presente invención también se pueden utilizar en combinación con otras clases de agentes terapéuticos que son conocidos en la técnica. Las clases representativas de los agentes para utilizarse en estas combinaciones incluyen, para el tratamiento de asma, esteroides antiinflamatorios (en particular, corticosteroides),
 5 inhibidores de PDE4, inhibidores de IKK2, agonistas de A2a, agonistas de los adrenorreceptores β_2 (incluyendo los agonistas de los adrenorreceptores β_2 tanto de acción corta como de acción larga), inhibidores de integrina-alfa 4, y anti-muscarínicos y, para el tratamiento de alergias, los agentes anteriores, así como antagonistas de los receptores de histamina, incluyendo los antagonistas H1 y H1/H3. Los agentes representativos para utilizarse en la terapia de combinación para el tratamiento de asma severo incluyen los inhibidores de p38 de acción tópica, y los inhibidores de IKK2.

Los corticosteroides antiinflamatorios son bien conocidos en la técnica. Ejemplos representativos incluyen propionato de fluticasona (por ejemplo, véase la patente de los EE.UU. 4.335.121), éster 17-propionato de beclometasona, éster 17,21-dipropionato de beclometasona, dexametasona o un éster de la misma, mometasona o un éster de la misma (por ejemplo, furoato de mometasona), ciclesonida, budesonida, y flunisolida. Otros ejemplos de corticosteroides antiinflamatorios se describen en el documento WO 02/12266 A1 (Glaxo Group Ltd), en particular, los compuestos del Ejemplo 1 (S-fluorometiléster del ácido 6 α ,9 α -difluoro-17 α -[(2-furanilcarbonil)oxi]-11 β -hidroxi-16 α -metil-3-oxo-androsta-1,4-dieno-17 β -carbotoico), y del Ejemplo 41 (S-fluorometiléster del ácido 6 α ,9 α -difluoro-11 β -hidroxi-16 α -metil-17 α -[(4-metil-1,3-tiazol-5-carbonil)-oxi]3oxoandrosta-1,4dieno-17 β -carbotoico), o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

Los ejemplos de los agonistas de los adrenorreceptores β_2 incluyen salmeterol (por ejemplo, como el racemato o un enantiómero individual, tal como el enantiómero-R), salbutamol, formoterol, salmefamol, fenoterol o terbutalina, y las sales de los mismos, por ejemplo, la sal de xinafoato de salmeterol, la sal de sulfato o la base libre de salbutamol, o la sal de fumarato de formoterol. Se prefieren los agonistas de los adrenorreceptores β_2 de larga acción, en especial aquéllos que tienen un efecto terapéutico durante un período de 24 horas, tales como salmeterol o formoterol.

Los ejemplos de antihistamínicos incluyen metapirileno, o loratadina, cetirizina, desloratadina o fexofenadina.

Los ejemplos de los compuestos anticolinérgicos incluyen antagonistas de los receptores muscarínicos (M), en particular antagonistas de los receptores M₁, M₂, M₁/M₂, o M₃, en particular un antagonista del receptor M₃ (selectivo). Ejemplos de los compuestos anticolinérgicos se describen en los documentos WO 03/01 1274 A2 y WO 02/069945 A2 / US 2002/0193393 A1 y US 2002/052312 A1. Los ejemplos de los antagonistas del receptor muscarínico M₃ incluyen bromuro de ipratropio, bromuro de oxitropio o bromuro de tiotropio.

Los inhibidores de PDE4 o de PDE3/4 mixtos representativos que se pueden utilizar en combinación con los compuestos de la invención incluyen AWD-12-281 (Elbion), PD-168787 (Pfizer), roflumilast, y cilomilast (GlaxoSmithKline). Otros ejemplos de los inhibidores de PDE4 se describen en los documentos WO 2004/103998, WO2005/030212, WO2005/030725, WO2005/058892, WO2005/090348, WO2005/ 090352, WO2005/090353, WO2005/090354, WO2006/053784, WO2006/097340, WO2006/133942, WO2007/036733, WO2007/ 036734 y WO2007/045861 (Glaxo Group Ltd).

La presente invención también proporciona la denominada como terapia de "triple combinación", que comprende un compuesto de la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, junto con un agonista de los adrenorreceptores β_2 y un corticosteroide antiinflamatorio. Preferentemente, esta combinación es para el tratamiento y/o la profilaxis de asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), o rinitis alérgica. El agonista de los adrenorreceptores β_2 y/o el corticosteroide antiinflamatorio puede ser como se describe anteriormente y/o como se describe en el documento WO 03/030939 A1. Un ejemplo representativo de esta combinación "triple" comprende un compuesto de la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, salmeterol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, xinafoato de salmeterol), y propionato de fluticasona.

El compuesto de la presente invención normalmente, pero no necesariamente, se formulará en composiciones farmacéuticas antes de su administración a un paciente. De conformidad con lo anterior, en otro aspecto, la invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de la invención y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden preparar y emvasar en una forma a granel, de donde se puede extraer una cantidad segura y efectiva de un compuesto de la invención, y entonces se da al paciente, tal como con polvos o jarabes. De una manera alternativa, las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden preparar y emvasar en una forma farmacéutica unitaria, en donde cada unidad físicamente independiente contenga una cantidad segura y efectiva de un compuesto de la invención. Las composiciones farmacéuticas de la invención también se pueden preparar y emvasar en una forma farmacéutica sub-unitaria, en donde dos o más formas farmacéuticas sub-unitarias proporcionen la forma farmacéutica unitaria. Cuando se preparan en una forma farmacéutica unitaria, las composiciones farmacéuticas de la invención generalmente contienen de aproximadamente el 0,1 al 99,9 % en peso del compuesto de la invención, dependiendo de la naturaleza de la formulación.

Además, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender opcionalmente además uno o más compuestos farmacéuticamente activos adicionales.

Como se utiliza en este documento, "excipiente farmacéuticamente aceptable" significa un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, involucrado en dar forma o consistencia a la composición farmacéutica. Cada excipiente debe ser compatible con los otros ingredientes de la composición farmacéutica cuando se mezclen, de tal manera que se eviten las interacciones que reducirían sustancialmente la eficacia del compuesto de la invención cuando se administran a un paciente y que darían como resultado composiciones farmacéuticamente inaceptables. Además, cada excipiente, desde luego, debe ser de una pureza suficientemente alta para hacerlo farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones de la presente invención que comprenden un compuesto de la invención y el excipiente o los excipientes farmacéuticamente aceptables, generalmente se proporcionarán como una forma farmacéutica adaptada para su administración al paciente por la vía de administración deseada. Por ejemplo, las formas farmacéuticas incluyen aquellas adaptadas para: (1) inhalación, tales como aerosoles y soluciones; (2) administración intranasal, tales como soluciones o aspersiones; (3) administración oral, tales como comprimidos, cápsulas, comprimidos, píldoras, trociscos, polvos, jarabes, elixires, suspensiones, soluciones, emulsiones, bolsitas, y sellos; y (4) administración parenteral, tales como soluciones y suspensiones estériles, y polvos para su reconstitución.

Se apreciará que las formas farmacéuticas adaptadas para inhalación o para administración oral se utilizan comúnmente para el tratamiento de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC); las formas farmacéuticas adaptadas para administración intranasal se utilizan comúnmente para el tratamiento de rinitis alérgica; y las formas farmacéuticas adaptadas para su administración oral se utilizan comúnmente para el tratamiento de artritis reumatoide y de las neoplasias malignas hemáticas.

Los excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados variarán dependiendo de la forma farmacéutica particular seleccionada. Además, los excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados se pueden seleccionar para una función particular en la que puedan servir en la composición. Por ejemplo, se pueden seleccionar ciertos excipientes farmacéuticamente aceptables por su capacidad para facilitar la producción de formas farmacéuticas uniformes. Ciertos excipientes farmacéuticamente aceptables se pueden seleccionar por su capacidad para facilitar la producción de formas farmacéuticas estables. Ciertos excipientes farmacéuticamente aceptables se pueden seleccionar por su capacidad para facilitar la portación o el transporte del compuesto de la presente invención una vez administrado al paciente, desde un órgano, o desde una parte del cuerpo, hasta otro órgano, o hasta otra parte del cuerpo. Ciertos excipientes farmacéuticamente aceptables se pueden seleccionar por su capacidad para mejorar el cumplimiento del paciente.

Los excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen los siguientes tipos de excipientes: diluyentes, cargas, aglutinantes, desintegrantes, lubricantes, deslizantes, agentes de granulación, agentes de recubrimiento, humectantes, disolventes, co-disolventes, agentes de suspensión, emulsionantes, edulcorantes, saborizantes, agentes enmascaradores de sabor, colorantes, antiapelmazantes, humectantes, quelantes, plastificantes, agentes incrementadores de viscosidad, antioxidantes, conservantes, estabilizantes, tensoactivos, y agentes tamponantes. El experto apreciará que ciertos excipientes farmacéuticamente aceptables pueden servir para más de una función, y pueden servir para funciones alternativas, dependiendo de cuánto del excipiente esté presente en la formulación, y de cuáles otros ingredientes estén presentes en la formulación.

Los expertos poseen el conocimiento y la experiencia en la materia para hacerles posible seleccionar los excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados en las cantidades apropiadas para utilizarse en la invención. Además, hay un número de recursos que están disponibles para el experto, que describen los excipientes farmacéuticamente aceptables, y que pueden ser útiles en la selección de los excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados. Los ejemplos incluyen Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company), Remington: The Science and Practice of Pharmacy, (Lippincott Williams & Wilkins), The Handbook of Pharmaceutical Additives (Gower Publishing Limited), y The Handbook of Pharmaceutical Excipients (The American Pharmaceutical Association and the Pharmaceutical Press).

Las composiciones farmacéuticas de la invención se preparan empleando técnicas y procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Algunos de los procedimientos comúnmente empleados en este campo se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company).

Las formas farmacéuticas sólidas orales, tales como los comprimidos, generalmente comprenden uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, los cuales, por ejemplo, pueden ayudar a impartir características satisfactorias de procesamiento y compresión, o pueden proporcionar características físicas deseables adicionales al comprimido. Estos excipientes farmacéuticamente aceptables se pueden seleccionar de diluyentes, aglutinantes, deslizantes, lubricantes, desintegrantes, colorantes, saborizantes, edulcorantes, polímeros, ceras, u otros materiales moduladores de la solubilidad.

Las formas farmacéuticas para su administración parenteral comprenderán en general fluidos, en particular fluidos intravenosos, es decir, soluciones estériles de productos químicos simples, tales como azúcares, aminoácidos o

electrolitos, los cuales pueden ser fácilmente transportados por el sistema circulatorio y asimilados. Tales fluidos se preparan generalmente con agua para inyectables USP. Los fluidos utilizados comúnmente para su uso intravenoso (IV) se dan a conocer en Remington, The Science and Practice of Pharmacy [la cita completa se proporciona anteriormente]. El pH de estos fluidos intravenosos (IV) puede variar, y generalmente será de 3,5 a 8, como se conoce en la técnica.

Las formas farmacéuticas para administración nasal o inhalada, de una manera conveniente, se pueden formular como aerosoles, soluciones, gotas, geles o polvos secos.

Las formas farmacéuticas para su administración tópica a la cavidad nasal (administración nasal) incluyen formulaciones presurizadas en aerosol y formulaciones acuosas administradas a la nariz mediante una bomba presurizada. Las formulaciones que no están presurizadas y que están adaptadas para administración nasal son de un interés particular. Las formulaciones adecuadas contienen agua como el diluyente o vehículo para este propósito. Las formulaciones acuosas para su administración a la nariz se pueden proporcionar con excipientes convencionales, tales como agentes tamponantes, agentes modificadores de la tonicidad, y similares. Las formulaciones acuosas también se pueden administrar a la nariz mediante nebulización.

En una realización adicional, se proporcionan formas farmacéuticas para administración nasal en un dispositivo de dosis medida. La forma farmacéutica se puede proporcionar como una formulación fluida para suministrarse a partir de un dosificador de fluido que tenga una boquilla de dosificación o un orificio de dosificación a través del cual se dosifique una dosis medida de la formulación fluida después de la aplicación de una fuerza aplicada por un usuario a un mecanismo de bombeo del dosificador de fluido. Estos dosificadores de fluido se proporcionan en términos generales con un depósito de múltiples dosis medidas de la formulación fluida, pudiéndose dosificar la dosis después de accionamientos de bombeo en secuencia. La boquilla o el orificio de dosificación se puede configurar para insertarse en las fosas nasales del usuario para dosificar por aspersion la formulación fluida en la cavidad nasal. En una realización, el dosificador de fluido es del tipo general descrito e ilustrado en el documento WO-A-2005/044354. El dosificador tiene un alojamiento que aloja a un dispositivo de descarga de fluido que tiene una bomba de compresión montada sobre un recipiente para contener una formulación fluida. El alojamiento tiene cuando menos una palanca lateral que se puede accionar con el dedo, la cual se puede mover hacia dentro con respecto al alojamiento para elevar el recipiente hacia arriba en el alojamiento para hacer que la bomba comprima y bombee una dosis medida de la formulación hacia fuera del vástago de la bomba a través de una boquilla nasal del alojamiento. Un dosificador de fluido particularmente preferente es del tipo general ilustrado en las Figuras 30 a 40 del documento WO-A-2005/044354.

Para las composiciones adecuadas y/o adaptadas para su administración inhalada, se prefiere que el compuesto o la sal de la fórmula (I) esté en una forma con el tamaño de partículas reducido, y más preferentemente, la forma con el tamaño reducido se obtiene o se puede obtener mediante micronización. El tamaño de partículas preferente del compuesto o la sal o el solvato de tamaño reducido (por ejemplo, micronizado) es definido por un valor D_{50} de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 10 micrómetros (por ejemplo, como se mide utilizando difracción de láser).

Las composiciones en aerosol, por ejemplo, para la administración inhalada, pueden comprender una solución o una suspensión fina de la sustancia activa en un disolvente acuoso o no acuoso farmacéuticamente aceptable. Las formulaciones en aerosol se pueden presentar en cantidades de una sola dosis o de múltiples dosis en una forma estéril en un recipiente sellado, el cual puede tomar la forma de un cartucho o repuesto para utilizarse con un dispositivo atomizador o inhalador. De una manera alternativa, el recipiente sellado puede ser un dispositivo de dosificación unitario, tal como un inhalador nasal de una sola dosis o un dosificador de aerosol adaptado con una válvula medidora (inhalador de dosis medida), el cual se pretenda para desecharse una vez que se haya agotado el contenido del recipiente.

Cuando la forma farmacéutica comprende un dosificador de aerosol, preferentemente contiene un propulsor adecuado bajo presión, tal como aire comprimido, dióxido de carbono, o un propulsor orgánico, tal como un hidrofluorocarburo (HFC). Los propulsores de hidrofluorocarburo (HFC) adecuados incluyen 1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano y 1,1,1,2-tetrafluoroetano. Las formas farmacéuticas en aerosol también pueden tomar la forma de un atomizador de bomba. El aerosol presurizado puede contener una solución o una suspensión del compuesto activo. Esto puede requerir de la incorporación de excipientes adicionales, por ejemplo, co-disolventes y/o tensoactivos, para mejorar las características de dispersión y la homogeneidad de las formulaciones en suspensión. Las formulaciones en solución también pueden requerir de la adición de co-disolventes, tales como etanol. También se pueden incorporar otros modificadores de excipientes para mejorar, por ejemplo, la estabilidad y/o el sabor y/o las características de la masa de partículas finas (cantidad y/o perfil) de la formulación.

Para las composiciones farmacéuticas adecuadas y/o adaptadas para su administración inhalada, se prefiere que la composición farmacéutica sea una composición inhalable en polvo seco. Esta composición puede comprender una base de polvo, tal como lactosa, glucosa, trehalosa, manitol o almidón, el compuesto de la fórmula (I) o la sal o el solvato del mismo (preferentemente en una forma de tamaño de partículas reducido, por ejemplo, en una forma micronizada), y opcionalmente un modificador de la eficacia, tal como L-leucina u otro aminoácido, octaacetato de celobiosa y/o sales de metales de ácido esteárico, tales como estearato de magnesio o de calcio. Preferentemente,

la composición inhalable en polvo seco comprende una mezcla de polvo seco de lactosa y el compuesto de la fórmula (I) o la sal del mismo. La lactosa es preferentemente hidrato de lactosa, por ejemplo, monohidrato de lactosa y/o es preferentemente lactosa de grado de inhalación y/o de grado fino. Preferentemente, el tamaño de partículas de la lactosa se define porque el 90 % o más (por peso o por volumen) de las partículas de lactosa son menores de 1000 micras (micrómetros) (por ejemplo, de 10 a 1000 micras, por ejemplo, de 30 a 1000 micras) de diámetro, y/o el 50 % o más de las partículas de lactosa son menores de 500 micras (por ejemplo, de 10 a 500 micras) de diámetro. Más preferentemente, el tamaño de partículas de la lactosa se define porque el 90 % o más de las partículas de lactosa son menores de 300 micras (por ejemplo, de 10 a 300 micras, por ejemplo, de 50 a 300 micras) de diámetro, y/o el 50 % o más de las partículas de lactosa son menores de 100 micras de diámetro. Opcionalmente, el tamaño de partículas de la lactosa se define porque el 90 % o más de las partículas de lactosa son menores de 100 a 200 micras de diámetro, y/o el 50 % o más de las partículas de lactosa son menores de 40 a 70 micras de diámetro. Más importante, es preferente que de aproximadamente el 3 a aproximadamente el 30 % (por ejemplo, aproximadamente el 10 %) (por peso o por volumen) de las partículas son menores de 50 micras o menores de 20 micras de diámetro. Por ejemplo, sin limitación, una lactosa de grado de inhalación adecuada es la lactosa E9334 (10 % de partículas finas) (Borculo Domo Ingredients, Hanzeplein 25, 8017 JD Zwolle, Holanda).

Opcionalmente, en particular para las composiciones inhalables en polvo seco, se puede incorporar una composición farmacéutica para su administración inhalada en una pluralidad de recipientes de dosis sellados (por ejemplo, que contengan la composición en polvo seco) montados longitudinalmente en una tira o cinta dentro de un dispositivo de inhalación adecuado. El recipiente se puede romper o se puede abrir por desprendimiento sobre demanda, y se puede administrar la dosis, por ejemplo, de la composición en polvo seco, mediante inhalación por medio del dispositivo, tal como el dispositivo DISKUS TM, comercializado por GlaxoSmithKline. El dispositivo de inhalación DISKUS TM, por ejemplo, se describe en el documento GB 2242134 A, y en este dispositivo está definido cuando menos un recipiente para la composición farmacéutica en forma de polvo (siendo el recipiente o los recipientes preferentemente una pluralidad de recipientes de dosis sellados montados longitudinalmente en una tira o cinta), entre dos miembros asegurados desprendiblemente uno al otro; y el dispositivo comprende: un medio para definir una estación de abertura para el recipiente o los recipientes mencionados; un medio para desprender los miembros y separarlos en la estación de abertura, con el fin de abrir el recipiente; y una salida, que se comunica con el recipiente abierto, a través de la cual un usuario puede inhalar la composición farmacéutica en forma de polvo del recipiente abierto.

Una composición de la presente invención, para su administración intranasal, también se puede adaptar para su dosificación mediante insuflación como una formulación en polvo seco.

Se apreciará que cuando el compuesto de la presente invención se administra en combinación con otros agentes terapéuticos normalmente administrados por la vía inhalada, intravenosa, oral o intranasal, la composición farmacéutica resultante se puede administrar por las mismas vías.

El compuesto de la presente invención se puede administrar de una manera conveniente en cantidades, por ejemplo, de 1 microgramo a 2 gramos. Desde luego, la dosis precisa dependerá de la edad y estado del paciente, y de la vía de administración particular seleccionada.

Procedimientos de Prueba Biológicos

Los compuestos de la invención se pueden probar para determinar la actividad *in vitro* de acuerdo con los siguientes ensayos:

Actividad Enzimática Básica

1. Ensayo Enzimático de Syk - Ensayo de cinasa de transferencia de energía de resonancia con fluorescencia resuelta en el tiempo

La Syk humana recombinante se expresó como una proteína marcada con His⁷. La actividad de Syk se evaluó utilizando un ensayo de transferencia de energía de resonancia con fluorescencia resuelta en el tiempo (TR-FRET).

La Syk se activó previamente a temperatura ambiente durante 30 minutos en presencia de MgCl₂ 16,6 mM, ATP 8,3 mM, y entonces se diluyó hasta 4 nM en Hepes 40 mM, pH de 7,4, albúmina de suero bovino (BSA) al 0,01 %. Se agregaron 3 microlitros de reactivo de sustrato que contenía el péptido biotinilado, Biotina-AAAEEIYGEI (0,5 μM final), ATP (30 μM final), y MgCl₂ (10 mM final) en HEPES 40 mM, pH de 7,4, albúmina de suero bovino (BSA) al 0,01 %, a los pocillos que contenían 0,1 microlitros de diferentes concentraciones del compuesto o del vehículo de sulfóxido de dimetilo (1,7 % final) en una placa negra Greiner de bajo volumen de 384 pocillos. La reacción se inició mediante la adición de 3 microlitros de Syk diluida (2 nM final). La reacción se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente, entonces se terminó mediante la adición de 3 microlitros de reactivo de lectura que contenía EDTA 60 mM, NaCl 150 mM, estreptavidina APC 50 nM (Prozyme, San Leandro, California, EUA), anticuerpo anti-fosfotirosina 0,5 nM marcado con quelato de europio W-1024 (Wallac OY, Turku, Finlandia) en HEPES 40 mM, pH de 7,4, albúmina de suero bovino al 0,03 %. La reacción se incubó adicionalmente durante 45 minutos a temperatura ambiente. El grado de fosforilación de la Biotina-AAAEEIYGEI se midió utilizando un lector de placas BMG Rubystar

(BMG LabTechnologies Ltd, Aylesbury, Reino Unido) como una proporción de la señal de transferencia de energía específica a 665 nanómetros a la señal de referencia de europio a 620 nanómetros.

El compuesto de la fórmula (I) tiene un valor de CI_{50} en este ensayo, de 40 nM.

* Preparación de cinasa de tirosina de bazo de longitud completa humana recombinante (Syk)Syk

5 Se expresó Syk humana de longitud completa con una marca 6His sobre el extremo N, utilizando el sistema de baculovirus (Invitrogen, Paisley, Escocia). Las células se rompieron mediante homogeneización, el desecho se eliminó mediante centrifugación, y el lisado se puso en contacto con NiNTA Superflow (Qiagen, Crawley, Reino Unido). El NiNTA se cargó en una columna y se eluyó utilizando 10 volúmenes de la columna, cada uno de tampón (Tris 20 mM, pH de 8,0, NaCl 300 mM, β McEtOH 10 mM, glicerol al 10 %), tampón + NaCl 1 M, tampón + Imidazol 20 mM, y tampón + imidazol 300 mM. Las fracciones de imidazol 300 mM se reservaron, se intercambió el tampón utilizando G25M (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Reino Unido) en MES 20 mM, pH de 6,0, NaCl 20 mM, β McEtOH 10 mM, glicerol al 10 %. La 6His-Syk intercambiada con el tampón se cargó sobre una columna Source15S (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Reino Unido), y la columna se eluyó utilizando un gradiente de NaCl de 0 500 mM sobre 50 volúmenes de la columna. Las fracciones que contenían la 6His-Syk se reservaron, y se concentraron mediante ultra-filtración. La identidad de la 6His-Syk se confirmó por la huella dactilar de la masa peptídica y mediante la CL-EM intacta.

Selectividad de Cinasa

2. Ensayo enzimático de Aurora B - Ensayo de cinasa de polarización de fluorescencia

20 Se expresó Aurora B humana recombinante (2-344) como una proteína marcada con Flag-6His-Thr^{*}. La actividad de Aurora B se evaluó utilizando un ensayo IMAP de Polarización de Fluorescencia (Molecular Devices, Sunnyvale, EE.UU.).

25 La Aurora B (2 μ M) se activó previamente mediante una concentración equivalente de GST-INCENP[§] en Tris-HCl 30 mM, pH de 8,0, ATP 0,4 mM, $MgCl_2$ 2 mM, EGTA 0,1 mM, BME al 0,1 % (beta-mercapto-etanol), vanadato de sodio 0,1 mM, DTT 10mM durante 3 horas a 30°C. Esta solución se dializó entonces durante 5 horas contra Tris-HCl 50 mM, pH de 7,5, sacarosa 270 mM, NaCl 150 mM, EDTA 0,1 mM, BME al 0,1 %, benzamidina 1 mM, y PMSF 0,2 mM a 4°C. El complejo de Aurora B/INCENP se puso en alícuotas y se congeló a -80°C.

30 Se agregó una concentración final de 2 nM del complejo de Aurora B/INCENP al tampón de ensayo (HEPES 25 mM, NaCl 25 mM, Tween-20 al 0,0025 %, pH de 7,2, albúmina de suero bovino (BSA) al 0,015 %, DTT 1 μ M). Se agregaron 3 microlitros de esta solución a los pocillos que contenían 0,1 microlitros de diferentes concentraciones del compuesto o del vehículo de dimetilsulfóxido en una placa negra Greiner de bajo volumen de 384 pocillos a temperatura ambiente durante 30 minutos. La reacción se inició mediante la presencia de 3 microlitros de reactivo de sustrato que contenía 5FAM-PKA-tide 100 nM (GRTGRRNSI-NH₂), ATP 2 μ M, y $MgCl_2$ 2 mM en tampón de ensayo (HEPES 25 mM, NaCl 25 mM, Tween-20 al 0,0025 %, pH de 7,2, albúmina de suero bovino (BSA) al 0,015 %, DTT 1 μ M) con un nivel final de dimetilsulfóxido del 1,7 %. La reacción se incubó durante 120 minutos adicionales a temperatura ambiente, y entonces se terminó mediante la adición de 6 microlitros de una solución de reactivo de enlace progresivo de dilución a 1:500 (Parte: R7287) en el tampón A de los fabricantes (Parte: R7285), y en el tampón B de los fabricantes (Parte R7286), y se dejó incubándose durante 120 minutos a temperatura ambiente. El grado de fosforilación de la 5FAM-PKA-tide (GRTGRRNSI-NH₂) se midió utilizando un lector de placas Acquest (Molecular Devices, Sunnyvale, EE.UU.) con excitación a 485 nanómetros, emisión a 530 nanómetros, y utilizando un lente dicróico de 505 nanómetros. Los datos se capturaron en la dirección paralela y perpendicular, y se convirtieron en el p.f. mediante el instrumento.

El compuesto de la fórmula (I) tiene una actividad en este ensayo, de 20 μ M.

* Preparación de Aurora B humana de longitud completa recombinante

45 La Aurora B humana de longitud completa se expresó con una marca 6His sobre la región N-terminal utilizando el sistema de baculovirus (Invitrogen, Paisley, Escocia). Las células sf9 se lisaron mediante sonicación, el desecho se removió mediante centrifugación, y el lisado se puso en contacto con NiNTA Superflow (Qiagen, Crawley, Reino Unido). El NiNTA se cargó en una columna y se eluyó utilizando un gradiente de 1-imidazol 300 mM. Las fracciones de imidazol 300 mM se reservaron y se dializaron contra Tris-HCl 50 mM, pH de 8,0, NaCl 250 mM, y DTT 2 mM, para remover el imidazol. Se recuperó la proteína aproximadamente el 60 % pura después de la diálisis. La identidad de la Aurora B se confirmó mediante análisis de secuencia N-terminal y CL-EM.

§ El clon DU930 de INCENP humano (826-919) se recibió de la Universidad de Dundee, y es una proteína marcada con GST N-terminal.

3. Ensayo Enzimático de VEGFR2 (KDR) - Ensayo de cinasa de transferencia de energía de resonancia con fluorescencia resuelta en el tiempo

Se expresó el dominio intracelular del VEGFR2 humano recombinante (KDR) (incluyendo el dominio de cinasa entero) como una proteína marcada con GST-6His*. La actividad del VEGFR2 se evaluó utilizando un ensayo de transferencia de energía de resonancia con fluorescencia resuelta en el tiempo (TR-FRET). Se agregaron los compuestos de prueba en la concentración deseada en el 100 % de dimetilsulfóxido, o el 100 % de vehículo de dimetilsulfóxido, a 0,1 microlitros, a una placa negra Greiner de bajo volumen, de 384 pocillos (#784076). La placa se centrifugó mínimamente a 1000 revoluciones por minuto durante 1 minuto, para forzar a todo el líquido hasta el fondo de los pocillos antes de la adición de cualquiera de los reactivos del ensayo.

El VEGFR2 (100 nM típicamente) se activó a temperatura ambiente durante 20 minutos. En presencia de HEPES 100 mM, pH de 7,5, MgCl₂ 10 mM, ATP 100 μM, DTT 300 μM, y 0,1 miligramos/mililitro de albúmina de suero bovino (BSA). Se agregó una solución de sustrato que contenía MgCl₂ 20 mM, ATP 100 μM, péptido biotinilado 0,72 μM (Biotina-amino-hexil-EEEEYFELVAKKKK-NH₂), a 5 microlitros, a la placa del ensayo. La solución de VEGFR2 activado se diluyó 100 veces en HEPES 200 mM, pH de 7,5, 0,2 miligramos/mililitro de albúmina de suero bovino (BSA), y DTT 0,6 mM. La reacción catalizada por VEGFR2 se inició mediante la adición de 5 microlitros del VEGFR2 activado diluido. Las concentraciones finales del ensayo fueron: HEPES 100 mM, pH de 7,5, MgCl₂ 10 mM, ATP 50 μM, 0,1 miligramos/mililitro de albúmina de suero bovino (BSA), DTT 300 μM, sustrato de péptido biotinilado 0,36 μM, y VEGFR2 0,5 nM (la concentración final del ensayo de VEGFR2 puede variar dependiendo de la actividad específica de diferentes lotes de enzima). La reacción se ejecutó durante 90 minutos a temperatura ambiente, y entonces se terminó mediante la adición de 5 microlitros de EDTA 150 mM, pH de 8. La señal de fondo del ensayo se estableció en los pocillos en donde la adición del EDTA 150 mM se hizo en su lugar, antes de agregar las soluciones de sustrato y enzima. La solución de detección de HTRF que contenía HEPES 200 mM, pH de 7,5, 0,1 miligramos/mililitro de albúmina de suero bovino (BSA), estreptavidina SureLight®-APC 30nM (PerkinElmer, Boston, MA, EE.UU.), y anticuerpo anti-fosfotirosina marcado con europio LANCE® 4 nM (PerkinElmer, Boston, MA, EE.UU.), a 5 microlitros. Después de la incubación durante 10 minutos a temperatura ambiente, se midió la fosforilación del sustrato de péptido biotinilado como una proporción de la señal de transferencia de energía específica a 665 nanómetros, a la señal de referencia de europio a 615 nanómetros, utilizando un Viewlux 1430 ultraHTS Microplate Imager (PerkinElmer, Turku, Finlandia).

El compuesto de la fórmula (I) tiene un valor de CI₅₀ en este ensayo, de >7,9 μM.

* Purificación de GST-6His-VEGFR2 recombinante

Se sobre-expresó GST-6His-VEGFR2 con las marcas N-terminales GST y 6His utilizando el sistema de expresión de baculovirus en células de insecto Sf9. Las células (de 100 a 120 gramos) se suspendieron en HEPES 50 mM, pH de 8,0, NaCl 100 mM, e imidazol 20 mM (5 mililitros/gramo de células) a temperatura ambiente. Todos los demás procedimientos de purificación fueron a 4°C. Las células se lisaron con un sonicador Branson 450 (potencia del 70 %, ciclo del 50 % durante un minuto), y el lisado celular se centrifugó a 30,000 x g durante 30 minutos. El sobrenadante se filtró a través de un filtro Pall de 1,2 micras, y entonces se cargó (de 10 a 20 mililitros/minuto) sobre una columna de Ni-NTA Qiagen de 150 mililitros (QIAGEN Inc., Valencia, CA, EUA) equilibrada con HEPES 50 mM, pH de 8,0, NaCl 100 mM, e imidazol 20 mM. La columna se lavó con HEPES 50 mM, pH de 8,0, NaCl 100 mM, e imidazol 20 mM, hasta que la absorbancia a 280 nanómetros fue menor de 0,1, entonces se eluyó con un gradiente de 5 volúmenes de la columna desde HEPES 50 mM, pH de 8,0, NaCl 100 mM, Imidazol 20 mM hasta HEPES 50 mM, pH de 8,0, NaCl 100 mM, imidazol 250 mM. Las fracciones (de 10 a 30 mililitros) se recolectaron. Las fracciones de proteína deseadas se reservaron y se cargaron (5 mililitros/minuto) sobre una columna de 25 mililitros de glutatona-Sepharose (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EE.UU.) equilibrada con HEPES 50 mM, pH de 7,5, NaCl 150 mM, y EDTA 2 mM. La columna se lavó con HEPES 50 mM, pH de 7,5, NaCl 150 mM, y EDTA 2 mM, y la proteína se eluyó con un gradiente de 3 volúmenes de la columna hasta HEPES 50 mM, pH de 7,5, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, y glutatona 20 mM. Las fracciones se recolectaron, y las fracciones de proteína deseadas se reservaron y se concentraron hasta aproximadamente 20 mililitros con un concentrador Pall JumboSep con membrana de 10,000 MWCO (Pall Corporation, Portsmouth, Inglaterra). Una columna de 1800 mililitros Superdex S200 o de 23 mililitros G25 (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EUA) se equilibró con HEPES 20 mM, pH de 7,5, NaCl 50 mM, EDTA 0,1 mM, y DTT 1 mM. El concentrado se cargó sobre la columna a 8 mililitros/minuto, y la columna se eluyó con HEPES 20 mM, pH de 7,5, NaCl 50 mM, EDTA 0,1 mM, y DTT 1 mM. Las fracciones de proteína (aproximadamente 20 mililitros) se recolectaron, y las fracciones deseadas se reservaron y se concentraron con un concentrador Pall JumboSep con membrana de 10,000 MWCO. La proteína concentrada se almacenó a -80°C en alícuotas del volumen deseado para su uso posterior en el ensayo de actividad enzimática de VEGFR2. La identidad del GST-6His-VEGFR2 se confirmó mediante cromatografía de líquidos intacta y espectrometría de masas (LC/MS), y mediante digestión proteolítica, seguida por el análisis de los péptidos resultantes mediante cromatografía de líquidos y espectrometría de masas en fila (LC/MS/MS).

B Ensayos de actividad celular**4. Ensayo de pErk Ramos**Principio del ensayo

5 Los linfocitos B Ramos (linfocitos B humanos de Linfoma de Burkitt) se estimulan utilizando anti-IgM. Esto da como resultado el reclutamiento de SYK hacia el receptor de linfocitos B. La siguiente autofosforilación de Syk conduce al inicio de una cascada de señalización que da como resultado la activación de los linfocitos B por medio de la ruta de Cinasa MAP Erk. Como un resultado, la Erk se fosforila, y tras la lisis celular se detecta mediante un ensayo de inmunocaptura.

Estimulación de células Ramos con anti-IgM

10 Se aplicaron las células a la placa en una densidad de 5×10^5 /pocillo, en un volumen de 25 microlitros del medio de ensayo (RPMI que contenía suero bovino fetal inactivado por calor al 10 %, L-glutamina al 1 %, y Penicilina/Estreptomina al 1 %) en placas de polipropileno de 96 pocillos-v. Se agregaron 25 microlitros de la solución del compuesto apropiadamente diluida, y la placa se incubó durante 30 minutos a 37°C con CO₂ al 5 %. Las células se estimularon con 5 microlitros de fragmentos Fab'₂ de IgM de cabra anti-humano (5 microgramos/mililitro final) durante 7 minutos a 37°C. Las células se lisaron mediante la adición de 55 microlitros de tampón de lisis RIPA 2x durante 2 horas a 4°C.

Ensayo MSD de pErk

20 50 microlitros del lisado celular se transfirieron a una placa MSD de 96 pocillos recubierta con el anticuerpo de captura anti-pErk1/2 (Thr/Thy: 202/204; 185/187), y se incubaron durante 16 horas a 4°C. La placa se lavó, y se agregó un anticuerpo de detección anti-pErk (25 microlitros/pocillo) durante 2 horas a temperatura ambiente. Éste se removió, se agregaron 150 microlitros de tampón de lectura MSD, y se midió la señal de electro-quimiluminiscencia resultante.

El compuesto de la fórmula (I) tiene un valor de CI₅₀ en este ensayo, de 50 nM.

Preparación del compuesto

25 El compuesto se preparó como una solución madre 10 mM en dimetilsulfóxido (DMSO), y se preparó una serie de dilución en dimetilsulfóxido (DMSO) utilizando 9 diluciones sucesivas 5 veces. Esta serie de dilución se diluyó además a 1:100 con el medio de ensayo, para dar el intervalo de concentración a probar de 5×10^{-5} a $2,56 \times 10^{-11}$ M. Las diluciones del compuesto se prepararon utilizando los sistemas pipeteadores robóticos automatizados Biomek 2000 y Biomek Nx.

30 5. Ensayo de PBMC CD69Principio del ensayo

35 Los linfocitos B de sangre periférica se estimulan *ex-vivo* utilizando anti-IgM. Esto da como resultado el reclutamiento de Syk hacia el receptor de linfocitos B. La siguiente autofosforilación de Syk conduce al inicio de una cascada de señalización que da como resultado la activación de los linfocitos B como se indica mediante la expresión del marcador de activación CD69 sobre la superficie celular. Los linfocitos B de sangre entera CD20/CD69+ve se detectan mediante citometría de flujo.

Estimulación de los linfocitos B de sangre periférica con anti-IgM

40 Se prepararon linfocitos B de sangre periférica a partir de sangre humana heparinizada mediante centrifugación en gradiente de densidad. Los linfocitos se aplicaron a la placa a una densidad de 1×10^5 /pocillo, en un volumen de 25 microlitros del medio de ensayo (RPMI que contenía suero fetal de becerro inactivado por calor al 10 %, L-glutamina al 1 %, y Penicilina/Estreptomina al 1 %) en placas de polipropileno de 96 pocillos-v. Se agregaron 25 microlitros de la solución del compuesto apropiadamente diluida, y la placa se incubó durante 30 minutos a 37°C con CO₂ al 5 %. Las células se estimularon con 5 microlitros de fragmentos Fab'₂ de IgM de cabra anti-humano (5 microgramos/mililitro final) durante 3,5 horas adicionales bajo las condiciones anteriormente descritas. Cualesquiera glóbulos rojos sanguíneos presentes se lisaron, y todas las demás células se fijaron mediante la adición de 200 microlitros de tampón de Lisado/Fijación durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Ensayo de CD69

50 Las células se tiñeron utilizando un cóctel de anticuerpos conjugados con FITC de CD20 de ratón anti-humano y con APC de CD69 de ratón anti-humano. Los linfocitos B CD20/CD69+ve presentes en la muestra se detectaron mediante citometría de flujo.

Preparación del compuesto

El compuesto se preparó como una solución madre 10 mM en dimetilsulfóxido (DMSO), y se preparó una serie de dilución en dimetilsulfóxido (DMSO) utilizando 9 diluciones sucesivas 5 veces. Esta serie de dilución se diluyó además a 1:100 con el medio de ensayo, para dar el intervalo de concentración a probar de 5×10^{-5} a $2,56 \times 10^{-11}$ M. Las diluciones del compuesto se prepararon utilizando los sistemas pipeteadores robóticos automatizados Biomek 2000 y Biomek Nx.

6. Ensayo de sangre entera CD69Principio del ensayo

Los linfocitos B de sangre entera se estimulan *ex-vivo* utilizando anti-IgM. Esto da como resultado el reclutamiento de Syk hacia el receptor de linfocitos B. La siguiente autofosforilación de Syk conduce al inicio de una cascada de señalización que da como resultado la activación de los linfocitos B, como se indica mediante la expresión del marcador de activación CD69 sobre la superficie celular. Los linfocitos B de sangre entera CD20/CD69+ve se detectan mediante citometría de flujo.

Estimulación de las linfocitos B de sangre entera con anti-IgM

Se agregaron 100 microlitros de sangre humana heparinizada a un tubo de polipropileno de 5 mililitros que contenía 1 microlitro de la solución del compuesto apropiadamente diluida, y se incubaron durante 30 minutos a 37°C con CO₂ al 5 %. Los linfocitos B se estimularon con 10 microlitros de fragmentos Fab'₂ de IgM de cabra anti-humano (67,5 microgramos/mililitro final) durante 3,5 horas adicionales, bajo las condiciones anteriormente descritas. Los glóbulos rojos sanguíneos se lisaron, y todas las demás células se fijaron mediante la adición de 2 mililitros de tampón de Lisis/Fijación durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Ensayo de CD69

Las células se tiñeron utilizando un cóctel de anticuerpos conjugados con FITC de CD20 de ratón anti-humano y con APC de CD69 de ratón anti-humano. Los linfocitos B CD20/CD69+ve presentes en la muestra se detectaron mediante citometría de flujo.

Preparación del compuesto

El compuesto se preparó como una solución madre 10 mM en dimetilsulfóxido (DMSO), y se preparó una serie de dilución en dimetilsulfóxido (DMSO) utilizando 7 diluciones sucesivas 3 veces, para dar el intervalo de concentración que a probar de 1×10^{-5} a $4,5 \times 10^{-10}$ M. Las diluciones del compuesto se prepararon utilizando el sistema pipeteador robótico automatizado Biomek 2000.

30 Actividad de los Mastocitos**7. Ensayo de LAD2**Principio del ensayo

LAD2 es una línea celular de mastocitos humanos dependientes del factor de células madre (SCF) que se estableció mediante el NIH a partir de los aspirados de médula ósea de un paciente con sarcoma/leucemia de mastocitos. Las células LAD2 se parecen a los mastocitos humanos derivados de CD34+, y expresan el FcεR1 funcional. El FcεR1 se regula por incremento en presencia de IL-4, SCF e IgE, y la subsiguiente reticulación de la IgE enlazada a las células da como resultado la desgranulación, la cual se puede medir como liberación de hexosaminidasa.

Cebado de las células LAD2 para regular por incremento el FcεR1

Las células LAD2 se vuelven a suspender a 1×10^5 /mililitro en Complete Stem Pro-34SFM (Gibco Cat 10640-019, medio que contiene el suplemento nutriente Stem Pro-34 (1:40), glutamina (2 mM), penicilina (100 microgramos/mililitro), estreptomina (100 microgramos/mililitro)) con suplementos adicionales de SCF recombinante humano (100 nanogramos/mililitro; R&D Systems), Interleucina-4 humana recombinante (6 nanogramos/mililitro; R&D Systems), e IgE (100 microgramos/mililitro; Calbiochem). Las células se mantienen entonces durante 5 días a 37°C, con CO₂ al 5 % en una atmósfera humidificada.

Preparación del compuesto

Los compuestos se titulan a partir de una solución madre 2 mM en dimetilsulfóxido (DMSO) al 100 %, para dar 9 diluciones sucesivas a 1:3 (Nunc V de 96 pocillos; Biomek 2000). A partir de esta placa maestra, se dosifican 3 microlitros en una placa hija (NuncBiomek Fx plana de 96 pocillos), la cual entonces se diluye a 1:40 en RPMI con glutamina 2 mM, y se transfieren 20 microlitros del compuesto diluido a la placa de células Greiner. Por consiguiente el intervalo de concentración final del compuesto es de 1×10^{-5} M a 5×10^{-10} M en dimetilsulfóxido (DMSO) al 0,5 % constante. Los pocillos de control se tratan con dimetilsulfóxido (DMSO) al 0,5 %.

Activación de células LAD2 con anti-IgE

Las células LAD2 preparadas se centrifugan (400 g, 5 minutos), el sobrenadante se desecha, y el sedimento celular se vuelve a suspender a 1×10^4 células/mililitro en RPMI complementado con glutamina (2 mM). En seguida de una centrifugación adicional (400 g, 5 minutos), las células se vuelven a suspender en RPMI fresco con glutamina (2 mM), se ajustan a una densidad de $5,7 \times 10^5$ /mililitro, y se pasan por pipeta a las placas de pocillos-V estériles (70 microlitros/pocillo; Greiner) que contienen 20 microlitros del compuesto diluido (preparado como se detalla anteriormente). Las células se incuban entonces durante 1 hora (37°C, CO₂ al 5 % en una atmósfera humidificada) antes de activarse con una concentración sub-máxima de anti-IgE (volumen de 10 microlitros, para dar una dilución final del ensayo de 1:2700; Sigma). Después de una incubación durante 40 minutos (37°C, CO₂ al 5 % en una atmósfera humidificada), las placas se centrifugan (1200 g, 10 minutos, 4°C), y el sobrenadante se elimina para el ensayo de hexosaminidasa. El sedimento celular se lisa en 100 microlitros/pocillo de triton-X (al 0,5 % en RPMI-glutamina 2 mM) a 37°C durante 30 minutos.

Ensayo de beta-hexosaminidasa

Se mide la actividad de beta-hexosaminidasa mediante la conversión de la 4-metil-umbeliferil-N-acetil-ε-D-glucosaminida (Sigma) en un producto fluorescente.

El sobrenadante o el lisado (25 microlitros) se incubaba con un volumen igual de 4-metil-umbeliferil-N-acetil-ε-D-glucosaminida (500 μM en tampón de citrato de sodio 0,2 M, pH de 4,5) en una placa negra de 96 pocillos (Nunc) durante 1 hora a 37°C. La reacción se termina entonces mediante la adición de Trizma, pH de 9 (90 microlitros), y el producto fluorescente se mide utilizando una excitación a 356 nanómetros, y una emisión a 450 nanómetros (Tecan Safire).

Actividad de hERG**8. Ensayo de enlace de flúor-ligando de Cy3B-Dofetilida para hERG**

Las potencias de los compuestos se determinaron mediante un ensayo de polarización de fluorescencia de flúor-ligando (Cy3b-Dofetilida).

Se incubaron membranas de CHO-K1 que expresaban hERG* (60 microgramos/mililitro) con flúor-ligando[§] 1,0 nM en tampón de ensayo (HEPES 25 mM, MgCl₂ 1,2 mM, KCl 100 mM, y Pluronic al 0,1 %, pH ajustado a 7,4 utilizando KOH 5 M). La concentración final de potasio en el ensayo fue de 100 mM. Después de 70 minutos de mezclar a temperatura ambiente, en la oscuridad, se dosificaron 10 microlitros en cada pocillo de una placa negra LV Greiner de 384 pocillos que contenía 0,1 microlitros del compuesto de prueba en dimetilsulfóxido (DMSO). Las placas se dejaron equilibrar durante 2 horas antes de leerse en un formador de imágenes Acquest^{MR} / Analyst^{MR}. Los datos de pCl₅₀ se generaron utilizando, a partir de una curva de inhibición de 11 puntos (concentración superior del ensayo de 50 μM y una dilución por pasos a 1:3), un ajuste de la curva de seis parámetros, que se aplicó utilizando ABase y XC50 para analizar los datos y generar los ajustes de la curva.

El compuesto de la fórmula (I) tiene un valor de Cl₅₀ en este ensayo, de 25 μM.

* Membranas de CHO-K1

Se cultivaron células de ovario de hámster chino (CHO) que expresan establemente el receptor de hERG humano hasta una confluencia del 80 % antes de cosecharse mediante tripsinización y de la subsiguiente centrifugación a 500 g durante 10 minutos. Los sedimentos celulares se congelaron a -80°C antes de la producción de la membrana. El sedimento congelado se descongeló sobre hielo, se volvió a suspender, y se homogeneizó en 10 volúmenes de tampón de membrana (HEPES 50 mM, pH de 7,4, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, Pepstatina A 2×10^{-6} M). La suspensión de membrana se centrifugó durante 20 minutos a 500 g, el aglomerado se desechó, y el sobrenadante se centrifugó nuevamente a 48,000 g durante 30 minutos. En seguida de la segunda centrifugación, el aglomerado restante que contenía la fracción de membrana se volvió a suspender en un volumen apropiado (4 mililitros por cada mililitro de aglomerado celular congelado), y se ensayó para determinar la concentración de proteína.

§ Flúor-ligando (2-sulfonato de octahidrobenczo[2",3"]indolizino[8",7":5",6']pirano[3',2':3,4]pirido[1,2-a]indol-5-io)

Sal de ácido trifluoroacético (TFA) descrita en J. M. C. 2007, 50(13), 2931-2941.

Se agregó N-[4-({2-[(6-aminohehexil)(2-{4-[(metilsulfonil)amino-fenil]etil}amino]etil}oxi)fenil]metansulfonamida (1,508 miligramos) como una solución en acetonitrilo (100 microlitros), al Cy3B-ONSu sólido (2-sulfonato de 14-{2-[(2,5-dioxo-1-pirrolidinil)oxi]-2-oxoetil}-16,16,18,18-tetrametil-6,7,7a,8a,9,10,16,18-octahidrobenczo[2",3"]indolizino[8",7":5",6']pirano[3',2':3,4]pirido[1,2a]indol-5-io) (1,7 miligramos, Publicación Internacional Número WO9931181) en un frasco de 4 mililitros silanizado. Se agregó una segunda porción de acetonitrilo (100 microlitros), seguida por base de Hunig (0,9 microlitros). Se agregaron dos porciones (50 microlitros,

2 veces) de dimetilformamida, y la mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida. El residuo se volvió a disolver en N,N-dimetilformamida (200 microlitros). Se agregó base de Hunig (0,9 microlitros), y la mezcla se mezcló en vórtex durante 22 horas. La mezcla de reacción se evaporó a sequedad, se volvió a disolver en acetonitrilo/agua/ácido acético (5/4/1, aproximadamente 500 microlitros), se filtró, y se aplicó a una columna de HPLC de semipreparación Spherisorb ODS2, la cual se eluyó con el siguiente gradiente (velocidad de flujo = 5 mililitros/minuto, AU 5,0, 214 nanómetros, AU 2, 256 nanómetros, A = ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1 %/agua, B = 90 % de acetonitrilo/10 % de agua/ácido trifluoroacético al 0,1 %): t = 0 minutos: B = 5 %; t = 10 minutos: B = 5 %; t = 30 minutos: B = 25 %; t = 90 minutos: B = 55 %; t = 105 minutos: B = 100 %; t = 120 minutos: B = 100 %. El componente mayor se eluyó entre el 46 % y el 48 % de B, y se recolectó en una fracción, la cual se evaporó a sequedad, y el sólido púrpura se transfirió a un frasco utilizando metanol como el disolvente. El metanol se removió bajo presión reducida, y el sólido púrpura se trituró con éter seco. El sólido se secó durante la noche a 1 hPa con una pistola de secado, para dar el compuesto del título (1,2 miligramos).

N-[4-((2-((6-aminohexil)(2-[4-((metilsulfonil)amino]fenil)etil)amino]etil)oxi)fenil)]metansulfonamida

Se disolvió N-[4-((2-[[6-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-2H-isoindol-2-il)hexil]](2-[4-((metilsulfonil)amino]fenil)etil)amino]etil)oxi)fenil)]metansulfonamida cruda (142 miligramos) en metilamina (al 33 % en etanol, 10 mililitros, 0,216 milimoles), y se dejó a 22°C durante 48 horas. El exceso del reactivo se evaporó bajo presión reducida, y el residuo oleoso se destiló azeotrópicamente con dos porciones adicionales de etanol. El producto crudo se disolvió en acetonitrilo/agua/ácido acético (5/4/, <2 mililitros), la mitad se aplicó a una columna de HPLC Phenomenex Jupiter C18, y se eluyó utilizando el siguiente gradiente (velocidad de flujo = 10 mililitros/minuto, AU 20,0, 214 nanómetros, AU 10, 256 nanómetros, A = ácido trifluoroacético al 0,1 %/agua, B = 90 % de acetonitrilo/10 % de agua/ácido trifluoroacético al 0,1 %): t = 0 minutos: B = 5 %; t = 10 minutos: B = 5 %; t = 100 minutos: B = 35 %; t = 115 minutos: B = 100 %; t = 130 minutos: B = 100 %. Las fracciones que contenían principalmente el componente de elución más lenta (>90 %) se reservaron y se evaporaron, para dar el compuesto del título (14,9 miligramos). El material bruto restante se aplicó a la columna C18, pero con un gradiente modificado: t = 0 minutos: B = 5 %; t = 10 minutos: B = 5 %; t = 15 minutos: B = 10 %; t = 95 minutos: B = 30 %; t = 110 minutos: B = 100 %; t = 125 minutos: B = 100 %. Las fracciones que contenían principalmente el producto deseado se combinaron y se evaporaron como antes, proporcionando el compuesto del título (21,3 miligramos - pureza del 80 %). El material se utilizó sin mayor purificación.

N-[4-((2-[[6-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-2H-isoindol-2-il)hexil]](2-[4-((metilsulfonil)amino]fenil)etil)amino]etil)oxi)fenil)]metansulfonamida

Se disolvió 2-[6-((2-(4-aminofenil)etil){2-[(4-aminofenil)oxi]etil}amino)hexil]-1H-isoindol-1,3(2H)-diona (108,3 miligramos) en diclorometano (5 mililitros), y se enfrió a 0-4°C en un baño de hielo. Se agregó base de Hunig (0,227 mililitros), seguida por la adición por goteo de cloruro de mesilo (0,051 mililitros). La reacción se mantuvo a 0-4°C durante 0,5 horas, y entonces se dejó calentar lentamente a temperatura ambiente. Después de 3 horas, la mezcla de reacción se evaporó a sequedad y se utilizó cruda en el siguiente paso.

2-[6-((2-(4-aminofenil)etil){2-[(4-aminofenil)oxi]etil}amino)hexil]-1H-isoindol-1,3(2H)-diona

Se disolvió 2-[6-((2-(4-nitrofenil)etil){2-[(4-nitrofenil)oxi]etil}amino)hexil]-1H-isoindol-1,3(2H)-diona (0,35 gramos) en una mezcla de etanol (40 mililitros), agua (5 mililitros), y ácido acético (5 mililitros), y la solución resultante se desgasificó bajo presión reducida. Se agregó paladio al 10 % sobre carbón (pasta al 56 %, 0,27 gramos), y la mezcla resultante se agitó vigorosamente bajo una atmósfera de hidrógeno (presión atmosférica) durante 12 horas. La mezcla de reacción se filtró a través de Celite^{MR} y se lavó con etanol. El filtrado y los lavados se evaporaron a sequedad, dando el compuesto del título (0,313 gramos), el cual se utilizó sin mayor purificación.

2-[6-((2-(4-nitrofenil)etil){2-[(4-nitrofenil)oxi]etil}amino)hexil]-1H-isoindol-1,3(2H)-diona

Se disolvieron [2-(4-nitrofenil)etil]{2-[(4-nitrofenil)oxi]etil}amina (253 miligramos), y 2-(6-bromohexil)-1H-isoindol-1,3(2H)-diona (1186 miligramos) en N,N-dimetilformamida (DMF) (4 mililitros), y se basificó mediante la adición de diisopropiletilamina (DIPEA) (0,665 mililitros). La reacción se agitó durante 120 horas. La mezcla de reacción se evaporó a sequedad, y el residuo se disolvió en diclorometano (DCM), la solución se absorbió en un lecho corto de sílice, y se purificó sobre un cartucho de sílice (12 gramos), eluyendo con el siguiente gradiente: (A = dicloro-metano (DCM), B = metanol), t = 0 minutos: B = 10 %; t = 7,5 minutos: B = 0 %; t = 22,5 minutos: B = 5 %. El producto deseado se eluyó a aproximadamente el 15 % de B (isocráticamente), y la evaporación de la solución a sequedad dio el compuesto del título (0,364 gramos).

[2-(4-nitrofenil)etil]{2-[(4-nitrofenil)oxi]etil}amina

Se disolvieron [[2-(4-nitrofenil)etil]amina (498,9 miligramos) y el 2-bromoetil-4-nitrofenil-éter de 111-[(2-bromoetil)oxi]-4-nitrobenzoceno (513 miligramos) en N,N-dimetilformamida (DMF) (5 mililitros) a 22°C, y se agregó diisopropiletilamina (DIPEA) (0,872 mililitros). La mezcla de reacción se dejó reposar durante 60 horas a 22°C, se evaporó a sequedad, y el residuo se disolvió en diclorometano. El compuesto se absorbió sobre sílice, y se purificó sobre un cartucho de sílice (12 gramos) en dos lotes, eluyendo con un gradiente de metanol / diclorometano (DCM)

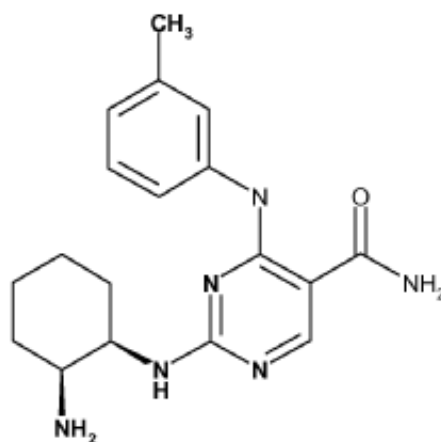
(del 0 al 15 %). Las fracciones que contenían el producto puro se reservaron, y el disolvente se removió bajo presión reducida. El compuesto del título resultante se aisló como un aceite amarillo profundo, el cual se solidificó parcialmente bajo un alto vacío (253 miligramos).

5 Resultados

| | Ejemplo 1 | | | Ejemplo de Referencia 1 | | |
|-------------------------------------|-------------------|----------|------------------|-------------------------|-----|------------------|
| | pCl ₅₀ | n | Cl ₅₀ | pCl ₅₀ | n | Cl ₅₀ |
| Ensayo enzimático de Syk (1) | 7,4 | 7 | 40 nM | 8,2 | 146 | 6,3 nM |
| Ensayo de pErk RAMOS (4) | 7,3 | 6 | 50 nM | 7,5 | 74 | 32 nM |
| Ensayo de sangre entera de CD69 (6) | <6,3 (6,5)* | 16 (14)* | 500 nM (320 nM)* | 6,3 | 73 | 500 nM |
| Ensayo de actividad de hERG (8) | 4,6 | 2 | 25 uM | 5,4 | 47 | 4,0 uM |
| Ensayo enzimático de Aurora B (2) | 4,7 | 3 | 20 uM | 5,8 | 111 | 1,6 uM |
| Ensayo enzimático de VEGFR (3) | <5,1 | 2 | >7,9 uM | 5,2 | 3 | 6,3 uM |

* 2 puntos de datos alejados a <5 y 5,2, excluidos de los datos entre paréntesis.

El ejemplo de referencia 1 es el compuesto:



10 que se describe en el documento WO9903101073 (Yamanouchi Pharmaceutical Co Ltd), como en el ejemplo 35, como la mezcla racémica.

Intermedios y EjemplosGeneralidades

Todas las temperaturas están en °C.

DBU se refiere a 1,8-diazabicyclo-[5,4,0]-undec-7-eno.

5 DCM se refiere a diclorometano.

DMSO se refiere a dimetilsulfóxido.

DMF se refiere a N,N-dimetilformamida.

dppf se refiere a 1,1'-bis-(difenilfosfino)ferroceno.

Éter se refiere a dietiléter.

10 HPLC se refiere a cromatografía de líquidos de alto rendimiento.

IPA se refiere a propan-2-ol.

mCPBA se refiere a ácido m-cloroperbenzoico.

t.a. se refiere a temperatura ambiente.

TBME se refiere a terc-butilmetiléter.

15 THF se refiere a tetrahidrofurano.

Los espectros de RMN de ¹H se registraron utilizando un Bruker DPX 400MHz, con referencia a tetrametilsilano.

20 La CL/EM (Procedimiento A) se condujo en una columna C18 Acquity UPLC BEH (50 milímetros x 2,1 milímetros de diámetro interno (d.i.), 1,7 micrómetros de diámetro de empaquetado) a 40 grados centígrados, eluyendo con bicarbonato de amonio 10 mM en agua ajustada a un pH de 10 con una solución de amoníaco (Disolvente A), y acetonitrilo (Disolvente B) utilizando el siguiente gradiente de elución: de 0 a 1,5 minutos con el 1 al 97 % de B, de 1,5 a 1,9 minutos con el 97 % de B, de 1,9 a 2,0 minutos con el 100 % de B a una velocidad de flujo de 1 mililitro/minuto. La detección UV fue una señal sumada a partir de la longitud de onda de 210 nanómetros a 350 nanómetros. Los espectros de masas se registraron en un espectrómetro de masas Waters ZQ utilizando electropulverización positiva y negativa de exploración alternada. Los datos de ionización se redondearon hasta el entero más cercano.

30 La CL/MS (Procedimiento B) se condujo en una columna C18 Acquity UPLC BEH (50 milímetros x 2,1 milímetros de diámetro interno, 1,7 micrómetros de diámetro de empaquetado) a 40 grados Centígrados, eluyendo con una solución al 0,1 % por volumen/volumen de ácido fórmico en agua (Disolvente A), y una solución al 0,1 % por volumen/volumen de ácido fórmico en acetonitrilo (Disolvente B), utilizando el siguiente gradiente de elución: de 0 a 1,5 minutos con el 3 al 100 % de B, de 1,5 a 1,9 minutos con el 100 % de B, de 1,9 a 2,0 minutos con el 3 % de B a una velocidad de flujo de 1 mililitro/minuto. La detección UV fue una señal sumada a partir de la longitud de onda de 210 nanómetros a 350 nanómetros. Los espectros de masas se registraron en un espectrómetro de masas Waters ZQ utilizando electropulverización positiva y negativa de exploración alternada. Los datos de ionización se redondearon hasta el entero más cercano.

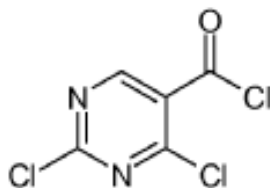
35 Las técnicas de cromatografía en sílice incluyen ya sea las técnicas automatizadas (Flashmaster) o bien cromatografía manual sobre cartuchos previamente empaquetados (SPE) o columnas de resolución rápida empaquetadas manualmente.

40 Cuando se da el nombre de un proveedor comercial después del nombre de un compuesto o de un reactivo, por ejemplo, "el compuesto X (Aldrich)" o "el compuesto X / Aldrich", esto significa que el compuesto X se puede obtener de un proveedor comercial, tal como el proveedor comercial nombrado.

De una manera similar, cuando se da una referencia de la bibliografía o de patente después del nombre de un compuesto, por ejemplo, el compuesto Y (documento EP 0 123 456), esto significa que la preparación del compuesto se describe en la referencia nombrada.

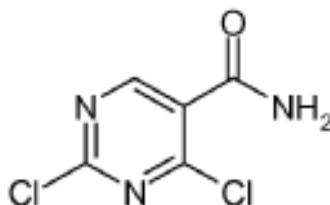
45 Los nombres de los Ejemplos anteriormente mencionados se obtuvieron utilizando el programa de nomenclatura de compuestos "ACD Name Pro 6,02".

Los compuestos de la presente invención tienen la estereoquímica absoluta (3R,4R).

Cloruro de 2,4-dicloro-5-pirimidincarbonilo

5 Una solución de ácido 2,4-dihidroxipirimidin-5-carboxílico (50 gramos), y pentacloruro de fósforo (239 gramos) en oxiclورو de fósforo (230 mililitros) se agitó a 115°C durante la noche. El exceso de oxiclورو de fósforo se eliminó al vacío, y se agregó acetato de etilo (200 mililitros) al residuo. La mezcla se filtró, y el filtrado se concentró, dando un aceite amarillo (78 gramos) como el cloruro de 2,4-dicloro-5-pirimidin-carbonilo bruto, el cual se utilizó en el siguiente paso sin mayor purificación.

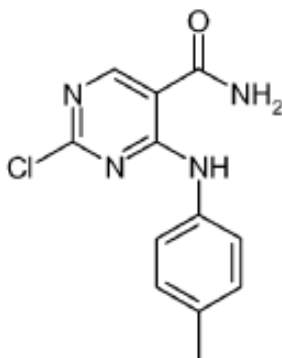
RMN de ^1H (300MHz, $\text{D}_6\text{-DMSO}$): δ H 9,13 (1H, s).

2,4-dicloro-5-pirimidincarboxamida

10 Una solución de amoníaco (14 gramos) en 1,4-dioxano (500 mililitros) se agregó por goteo a una solución agitada enfriada con hielo de cloruro de 2,4-dicloro-5-pirimidin-carbonilo (78 gramos, bruto) en 1,4-dioxano (400 mililitros) bajo nitrógeno. El baño de hielo se retiró y la solución se agitó durante 30 minutos y se concentró. El residuo sólido se repartió entre acetato de etilo (500 mililitros) y bicarbonato de sodio acuoso saturado (500 mililitros), y el material orgánico se lavó con bicarbonato de sodio acuoso saturado (500 mililitros, 2 veces), seguido por salmuera (300 mililitros). La fase orgánica se secó (sulfato de sodio), y se concentró dando un sólido amarillo. Al residuo se le agregó dietiléter (50 mililitros), y la suspensión resultante se trató bajo ondas ultrasónicas durante 8 minutos, y entonces se filtró. El residuo se lavó con etiléter (50 mililitros) dando el compuesto del título como un sólido blanco (30 gramos).

20 EM: MH^+ 192

RMN de ^1H (400 MHz, $\text{D}_6\text{-DMSO}$): δ H 8,90 (1H, s), 8,19 (1H, s), 8,07 (1H, s).

2-cloro-4-[(4-metilfenil)amino]-5-pirimidincarboxamida

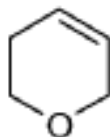
25 Una solución de p-toluidina (46,9 gramos) en N,N-dimetilformamida (100 mililitros) se agregó por goteo a una solución de 2,4-dicloro-5-pirimidincarboxamida (80 gramos) y trietilamina (63,9 mililitros) en N,N-dimetil-formamida (300 mililitros), con enfriamiento en hielo. La mezcla se agitó durante 2 horas, dejando calentar a temperatura ambiente, entonces se agregó a agua (1 litro) y se agitó durante 20 minutos. La pasta acuosa se filtró y el sólido se lavó con agua. El sólido se suspendió en una mezcla de metanol (500 mililitros) y éter (500 mililitros), se agitó durante 20 minutos y se filtró, dando la 2-cloro-4-[(4-metilfenil)amino]-5-pirimidincarboxamida como un sólido amarillo pálido (94,2 gramos).

30

LCEM (Procedimiento B): Rt 1,02 minutos, MH^+ 263/265.

RMN de ^1H (400MHz, MeOD): δH 8,63 (1H, s), 7,53 (2H, d), 7,18 (2H, d), 2,33 (3H, s).

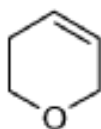
3,6-dihidro-2H-pirano



5 Se agregó hidróxido de sodio (10N, 1745 mililitros), a 4-bromo-tetrahidro-2H-pirano (1133,7 gramos), la mezcla se calentó a 90°C con agitación, y se agitó a aproximadamente 90°C durante 27 horas. La mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente, se separaron 1800 mililitros de la fase acuosa, y se recolectó el volumen a granel de la fase orgánica. La fase acuosa restante más un pequeño volumen de la fase orgánica y el material de interfase se lavaron con agua (20 mililitros), se filtraron, y el filtrado se lavó con una solución de hidróxido de sodio (10N, 5 mililitros). La fase orgánica se separó y se agregó al volumen a granel del material dando el 3,6-dihidro-2H-pirano (242,2 gramos).

10 ^1H RMN (400MHz, CDCl_3): δH 5,85 (1H, m), 5,72 (1H, d), 4,13 (2H, m), 3,79 (2H, t), 2,14 (2H, m).

3,6-dihidro-2H-pirano

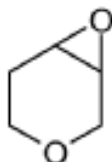


15 Se combinaron tetrahidro-4-piranol (1005,2 gramos), diclorometano (5530 mililitros) y trietilamina (1640 mililitros), y se enfriaron a 1°C . Se agregó cloruro de mesilo (1243,8 gramos) a la mezcla enfriada y la mezcla se agitó en una manera controlada durante aproximadamente 2,5 horas, manteniendo la temperatura por debajo de 15°C . El cloruro de mesilo se lavó con diclorometano (500 mililitros), y la reacción se dejó calentar a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla se trató con cloruro de amonio acuoso (aproximadamente 2 litros, 9,8 % en peso/peso), se agitó durante 5 minutos y las fases se separaron. La fase orgánica se lavó con cloruro de amonio acuoso (aproximadamente 2 litros, 9,8 % en peso/peso), agua (aproximadamente 2 litros), y se secó (sulfato de sodio). La fase orgánica se concentró al vacío (39°C , aproximadamente 15 hPa) obteniendo un aceite, el cual se solidificó rápidamente en reposo (1733,9 gramos). Este material se trató lentamente con DBU (aproximadamente 300 mililitros) a 52°C , durante 30 minutos, hasta que se formó una solución, y ésta se trató con DBU (1,71), y la mezcla se calentó a aproximadamente 100°C (temperatura externa) durante 1 hora, y se mantuvo a esta temperatura durante 2 horas. La temperatura se elevó lentamente hasta 148°C (externa), y se recolectó el 3,6-dihidro-2H-pirano destilado (527,5 gramos).

25

RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3): δH 5,85 (1H, m), 5,72 (1H, d), 4,13 (2H, m), 3,79 (2H, t), 2,14 (2H, m).

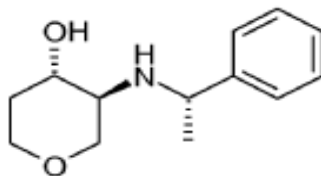
1,5:3,4-dianhidro-2-desoxipentitol



30 A una suspensión de mCPBA (71,1 %, 1524,2 gramos) en cloroformo (4,22 litros) a 13°C se le agregó 3,6-dihidro-2H-pirano (526,5 gramos) durante aproximadamente 2 horas, lavando el sólido del cuello del recipiente a intervalos con porciones de cloroformo (total de aproximadamente 1,5 litros). Se agregó una porción adicional de cloroformo (0,5 litros), y la mezcla de reacción se agitó a 15°C durante 2,25 horas. La mezcla de reacción se calentó a 20°C durante 40 minutos, y se agitó a 20°C durante la noche. La mezcla de reacción se enfrió a 0°C , se filtró, y el sólido se lavó con cloroformo enfriado ($3,5^\circ\text{C}$, 1055 mililitros). El filtrado y los lavados combinados se lavaron con carbonato de sodio acuoso (20 % en peso/ peso, 1582 mililitros), las fases se separaron, y la fase orgánica se trató con sulfito de sodio (1 kilogramo). El material orgánico se filtró y se concentró al vacío (25°C , 150 hPa), dando el compuesto del título (506 gramos). El disolvente de la concentración al vacío se volvió a concentrar al vacío, proporcionando una segunda porción del compuesto del título (41,2 gramos).

35

40 RMN de ^1H (400MHz, $\text{D}_6\text{-DMSO}$): δH 3,91 (1H, d), 3,77 (1H, d), 3,35-3,29 (3H, m parcialmente oscurecido por el agua), 3,15 (1H, s), 1,87 (2H, m).

1,5-anhidro-2,4-didesoxi-2-[[1(S)-1-feniletil]amino]-L-treo-pentitol**Procedimiento 1**

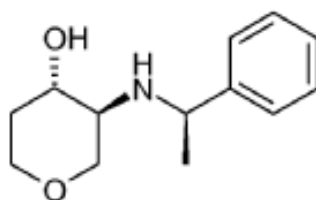
5 Se agregó 1,5:3,4-dianhidro-2-desoxipentitol (589,2 gramos, 92,7 % en peso/peso) a [(1S)-1-feniletil]amina (660 gramos) e isopropanol (500 mililitros). Se agregó isopropanol (2800 mililitros) adicional, la mezcla se calentó a 69°C y se mantuvo a esta temperatura durante 96 horas. El disolvente se evaporó al vacío, y el producto bruto se suspendió con terc-buti-metiléter (TBME) (2640 mililitros). La mezcla se filtró, el residuo se lavó con TBME (660 mililitros), TBME/heptano (1:1, 660 mililitros), y heptano (2 veces, 1320 mililitros), y se secó a 40°C al vacío durante la noche, dando el compuesto del título (297,5 gramos). El TBME y los lavados de TBME/heptano se combinaron y se redujeron a sequedad al vacío. El residuo se disolvió en TBME (990 mililitros) con calentamiento, la solución se enfrió a 32°C y se evaporó en rotavapor durante la noche. El sólido se aisló mediante filtración, se lavó con TBME (130 mililitros), TBME/heptano (1:1, 130 mililitros), y heptano (2 veces, 260 mililitros). El sólido se secó a 40°C al vacío durante la noche, dando una segunda cosecha del compuesto del título (58,69 gramos).

15 RMN de ¹H (400MHz, D₆-DEMO): δH 7,34-7,27 (4H, m), 7,19 (1H, t), 4,87 (1H, d), 3,88 (1H, m), 3,67 (1H, m), 3,35-3,30 (2H, m, parcialmente oscurecido por el agua), 3,20 (1H, t), 2,70 (1H, t), 2,25 (1H, m), 1,92 (1H, s), 1,76 (1H, dd), 1,38 (1H, m), 1,24 (3H, d).

Procedimiento 2

20 Se agregó 2-butanol (1,5 mililitros) a una mezcla de 1,5:3,4-dianhidro-2-desoxipentitol (1,68 gramos, 90,4 % en peso/peso), y [(1S)-1-feniletil]-amina (2,02 gramos), y la reacción se calentó a 90°C bajo nitrógeno durante 20 horas. La reacción se enfrió a 72°C y se agregó heptano (13,5 mililitros) por goteo durante 30 minutos a la mezcla de reacción. Se detuvo el calentamiento y la reacción se dejó enfriar a 34°C; como no se produjo un sólido, la reacción se volvió a calentar a 40°C y se sembró con 1,5-anhidro-2,4-dideoxi-2-[[1(S)-1-feniletil]amino]-L-treo-pentitol. La suspensión resultante se agitó a 35°C durante 30 minutos, se dejó enfriar a 23°C durante 30 minutos, y entonces se dejó a esta temperatura durante 2 horas 25 minutos. El sólido se recolectó mediante filtración, se lavó con 2-butanol/heptano (10 % por volumen/volumen, 3 mililitros), y entonces con heptano (2 veces, 6 mililitros). El sólido se secó al vacío a 35°C, dando el compuesto del título (1,10 gramos).

25 RMN de ¹H (400MHz, D₆-DMSO): δH 7,34-7,27 (4H, m), 7,20 (1H, t), 4,92 (1H, d), 3,88 (1H, m), 3,67 (1H, m), 3,36-3,29 (2H, m, parcialmente oscurecido mediante agua), 3,19 (1H, t), 2,69 (1H, t), 2,24 (1H, m), 1,94 (1H, s), 1,76 (1H, dd), 1,36 (1H, m), 1,23 (3H, d).

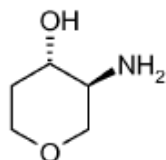
30 1,5-anhidro-2,4-dideoxi-2-[[1(R)-1-feniletil]amino]-L-treo-pentitol

35 A una solución de [(1R)-1-feniletil]amina (3,5 mililitros) en diclorometano (20 mililitros) agitada bajo nitrógeno de -5°C a 0°C se le agregó una solución de trimetilaluminio (14,6 mililitros) en tolueno en porciones durante 30 minutos. La mezcla de reacción se agitó a <0°C durante 40 minutos, y entonces se agregó una solución de epóxido de pirano (7,7 gramos) en diclorometano (20 mililitros), durante 10 minutos. Se continuó la agitación con enfriamiento en hielo durante 5 horas y la reacción se dejó calentar durante 15 horas. La mezcla se enfrió en hielo a 2,5°C y se le agregó fluoruro de sodio (5 gramos), seguido por agua (3,2 mililitros), lo que hizo que la temperatura se elevara a 28°C, y entonces cayó hasta 5°C en 15 minutos. El baño de hielo se retiró y se continuó la agitación durante 1 hora. La mezcla se filtró a través de un lecho corto de Celite, y el Celite se lavó con diclorometano (3 veces, 30 mililitros). El tercer lavado se desechó, pero el remanente del filtrado se concentró, dando un aceite incoloro (6,05 gramos), el cual se cristalizó obteniéndose un sólido ceroso. El sólido ceroso (5,94 gramos) se trituró con éter (10 mililitros), y se dejó reposar durante 1 hora. El sólido blanco resultante se filtró, se lavó con petróleo 40-60, y el residuo además se trituró con petróleo 40-60. El filtrado se evaporó, dando una goma (3,04 gramos), a la cual se le agregó petróleo 40-

60 (25 mililitros), la mezcla se centrifugó y se dejó reposar durante 1 hora. El petróleo se decantó y se dejó aparte. Los cristales formados se filtraron después de 3 días, dando el 1,5-anhidro-2,4-didesoxi-2-(((1R)-1-feniletil)amino)-L-treo-pentitol (104 miligramos).

- 5 RMN de ^1H (400MHz, D_6 -DMSO): δH 7,34-7,28 (4H, m), 7,21 (1H, m), 4,80 (1H, d), 3,87 (1H, dd), 3,78 (1H, m), 3,70 (1H, m), 3,31-3,22 (2H, m, parcialmente oscurecido mediante agua) 2,92 (1H, m), 2,21 (1H, m), 2,06 (1H, m), 1,72 (1H, m), 1,32-1,20 (4H, m).

2-amino-1,5-anhidro-2,4-didesoxi-L-treo-pentitol



Procedimiento 1

- 10 Una mezcla de 1,5-anhidro-2,4-didesoxi-2-(((1S)-1-feniletil)amino)-L-treo-pentitol (348,6 gramos) e hidróxido de paladio sobre carbón (20 % en peso/peso, húmedo con aproximadamente el 50 % de agua, 35 gramos), se suspendió en etanol (5230 mililitros). El recipiente de reacción se cargó con hidrógeno (15 psi [103,42 kPa]), y se ventiló (2 veces), y entonces la mezcla se hidrogenó bajo 15 psi [103,42 kPa] de hidrógeno a aproximadamente 25°C durante la noche. El recipiente se purgó con nitrógeno (8 veces), luego con hidrógeno (1 vez), y se continuó la hidrogenación bajo 15 psi [103,42 kPa] de hidrógeno durante aproximadamente 5 horas. El recipiente se purgó con nitrógeno (5 veces), luego hidrógeno (1 vez), y se continuó la hidrogenación bajo 15 psi [103,42 kPa] de hidrógeno durante aproximadamente 15 horas. La reacción se filtró a través de Celite y entonces a través de Dominick Hunter de 1 micrómetro antes de la evaporación del disolvente al vacío. El residuo se disolvió en metanol con calentamiento, se filtró a través de Celite, entonces a través de Dominick Hunter de 0,2 micrómetros antes de la evaporación del disolvente al vacío, dejando el compuesto del título. Este material se utilizó sin mayor purificación.

20 RMN de ^1H (400MHz, D_6 -DMSO incluye): δH 3,76 (1H, d), 3,69 (1H, dd), 3,26 (1H, t), 3,14 (1H, m), 2,85 (1H, t), 2,39 (1H, m), 1,74 (1H, dd), 1,36 (1H, m).

Procedimiento 2

- 25 Una solución de 1,5-anhidro-2,4-didesoxi-2-(((1S)-1-feniletil)amino)-L-treo-pentitol (25,5 gramos) en etanol (500 mililitros) se hidrogenó (1 atmósfera) sobre hidróxido de paladio al 20 % sobre carbón (2,5 gramos) durante 18 horas a temperatura ambiente. El catalizador se filtró a través de un cartucho de Celite (10 gramos), y el filtrado se redujo a sequedad al vacío, dando el compuesto del título (13,26 gramos).

RMN de ^1H (400MHz, D_6 -DMSO): δH 3,74 (1H, m), 3,67 (1H, m), 3,24 (1H, m), 3,13 (1H, m), 2,84 (1H, m), 2,38 (1H, m), 1,72 (1H, m), 1,34 (1H, m).

- 30 Rotación: +34,2°, c=1 en metanol a 24°C.

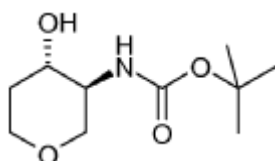
Procedimiento 3

- 35 Se disolvió 1,5-anhidro-2,4-didesoxi-2-(((1R)-1-feniletil)amino)-L-treo-pentitol (80 miligramos) en metanol (8 mililitros). La reacción se hidrogenó utilizando hidrogenación de flujo H-Cube^{MR} (ajustes: 50°C, 0,50 MPa, velocidad de flujo de 1 mililitro/minuto) sobre hidróxido de paladio sobre carbón (al 20 %, CatCart 30). La solución resultante se redujo a sequedad bajo una corriente de nitrógeno, y el sólido blanco resultante se secó al vacío, dando el 2-amino-1,5-anhidro-2,4-dideoxi-L-treo-pentitol (21 miligramos).

RMN de ^1H (400MHz, D_6 -DMSO incluye): δH 3,76 (1H, m), 3,69 (1H, m), 3,26 (1H, m), 3,15 (1H, m), 2,85 (1H, m), 2,40 (1H, m), 1,74 (1H, m), 1,35 (1H, m).

Rotación: +31°, c = 1,016 en metanol a 25,2°C.

- 40 **1,5-anhidro-2,4-dideoxi-2-(((1,1-dimetiletil)oxi)carbonil)amino)-L-treo-pentitol**



Procedimiento 1

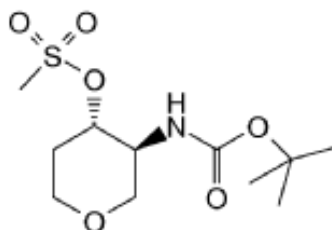
Se trató 2-amino-1,5-anhidro-2,4-didesoxi-L-treo-pentitol (aproximadamente 184 gramos) en metanol (1300 mililitros) con trietilamina (22 mililitros). Se agregó a la mezcla el dicarbonato de bis-(1,1-dimetiletilo) (369 gramos) disuelto en metanol (530 mililitros), durante 35 minutos, y se lavó con metanol (30 mililitros). La reacción se agitó a 20°C durante aproximadamente 21,5 horas, y se concentró bajo presión reducida. Se agregaron terc-butilmetiléter (TBME) (280 mililitros) y ciclohexano (2520 mililitros) al residuo, y la mezcla se evaporó en rotavapor a 20°C durante aproximadamente 2,5 horas. El sólido resultante se aisló mediante filtración y se lavó con ciclohexano (2 veces, 780 mililitros). El sólido se secó de 30°C a 35°C al vacío, dando el compuesto del título como un sólido blanco (325,76 gramos).

10 RMN de ¹H (400MHz, D₆-DMSO): δH 6,60 (1H, da), 4,77 (1H, d), 3,72 (2H, m), 3,39 (1H, m), 3,26-3,11 (2H, m), 2,89 (1H, t), 1,82 (1H, m), 1,38 (10H, m).

Procedimiento 2

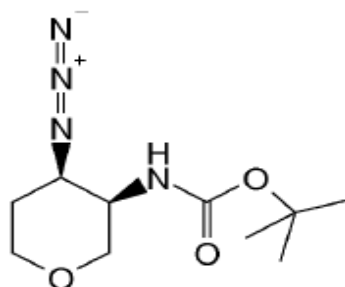
15 Se suspendió 2-amino-1,5-anhidro-2,4-didesoxi-L-treo-pentitol (13,2 gramos) en terc-butilmetiléter (TBME) (220 mililitros). Se agregaron trietilamina (1,57 mililitros) y dicarbonato de bis-(1,1-dimetil-etilo) (29,5 gramos), y la mezcla se calentó a reflujo durante la noche. Se agregó ciclohexano (220 mililitros) a la reacción, elevando la temperatura del baño hasta 85°C para mantener la mezcla a reflujo. La mezcla de reacción se dejó enfriar lentamente a temperatura ambiente durante 3 horas, y entonces se mantuvo en el refrigerador durante 2 horas. Los cristales se filtraron, se lavaron con ciclohexano/TBME frío (1:1, 25 mililitros), ciclohexano (25 mililitros), y se secó bajo presión reducida a 40°C, dando el compuesto del título (16,44 gramos). Se obtuvo una segunda cosecha del compuesto del título a partir del filtrado (0,495 gramos).

20 RMN de ¹H (400MHz, D₆-DMSO): δH 6,64(1H, d), 4,79(1H, d), 3,75(1H, m), 3,69(1H, dd), 3,38(1H, m), 3,26-3,12(2H, m), 2,88(1H, m), 1,82(1H, m), 1,44-1,35(10H, m). Rotación: +31,3°, c = 1 en metanol a 23,7°C.

1,5-anhidro-2,4-didesoxi-2-(((1,1-dimetiletil)oxi]carbonil)amino)-3-O-(metilsulfonil)-L-treo-pentitol

25 Se agregó por goteo cloruro de metansulfonilo (30 mililitros) en diclorometano (100 mililitros) a una solución de 1,5-anhidro-2,4-dideoxi-2-(((1,1-dimetiletil)oxi]carbonil)amino)-L-treo-pentitol (75 gramos), y trietilamina (58ml) en diclorometano (900 mililitros) a 0°C, manteniendo la temperatura por debajo de 3°C durante la adición. La mezcla se agitó durante 30 minutos, se calentó a 25°C, y se agitó durante 2 horas. La mezcla de reacción se lavó con agua (1,4 litros, 2 veces), la fase orgánica se secó, y el disolvente se evaporó, dando el 1,5-anhidro-2,4-dideoxi-2-(((1,1-dimetiletil-oxi]carbonil)amino)-3-O-(metilsulfonil)-L-treo-pentitol (103,1 gramos).

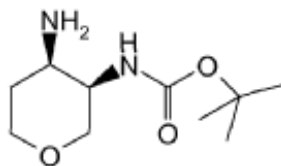
30 RMN de ¹H (400MHz, CDCl₃): δH 5,02(1H, bd), 4,75(1H, m), 4,01 (1H, dd), 3,87(1H, m), 3,70-3,57(2H, m), 3,46(1H, m), 3,10(3H, s), 2,20(1H, m), 1,93(1H, m), 1,45(9H, s).

35 [(3R,4R)-4-azidotetrahidro-2H-piran-3-il]carbamato de 1,1-dimetiletilo

Se mezclaron acetato de sodio (129 gramos), azida de sodio (102 gramos), y 1,5-anhidro-2,4-didesoxi-2-(((1,1-dimetiletil)oxi]carbonil]amino)-3-O-(metil-ulfonil)-L-treo-pentitol (232 gramos) en N,N-dimetil-formamida (DMF) (1 litro), y se agitaron y se calentaron a 95°C durante 6 horas. Se agregó agua (2 litros), y la mezcla se mezcló a fondo, se agregó acetato de etilo (1,5 litros), y la mezcla se agitó durante 5 minutos. Las fases se separaron, la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (1 litro), los extractos orgánicos combinados se lavaron con agua (2 litros, 2 veces), se secaron, y se redujeron a sequedad al vacío, dando el [(3R,4R)-4-azidotetrahidro-2H-piran-3-il]carbamato de 1,1-dimetiletilo (153 gramos).

RMN de ¹H (400MHz, CDCl₃): δH 4,84(1H, bd), 3,92(2H, m), 3,76(1H, m), 3,63(2H, m), 3,52(1H, m), 1,92(2H, m), 1,46(9H, s).

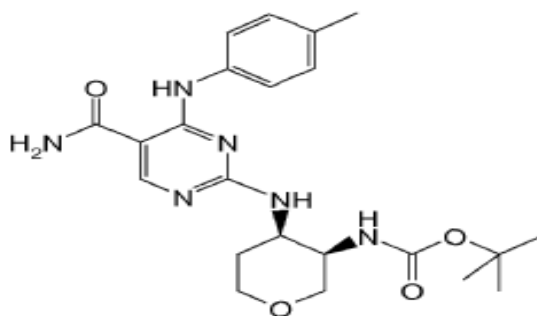
10 **1,5-anhidro-2,4-didesoxi-2-(((1,1-dimetiletil)oxi]carbonil]amino)-3-O-(metilsulfonil)-L-treo-pentitol**



Una mezcla de óxido de platino y [(3R,4R)-4-azidotetrahidro-2H-piran-3-il]carbamato de 1,1-dimetiletilo (42 gramos) se purgó con nitrógeno (3 veces), y se agregó etanol (1 litro). El recipiente se purgó (3 veces), se cargó con hidrógeno, y se agitó a 400 rpm mientras se enfriaba a 20°C, y se agitó durante 3 horas. El recipiente se purgó con nitrógeno (3 veces), se rellenoó con hidrógeno, y se agitó durante 3,5 horas adicionales. El recipiente se purgó y se rellenoó con hidrógeno a 15 psi [1,05 kg/cm²], y se agitó durante la noche. El recipiente se purgó, se rellenoó, y se agitó durante 1,5 horas. La mezcla se filtró a través de Celite bajo una atmósfera de nitrógeno, la torta del filtro se lavó con etanol (500 mililitros, 2 veces), y el filtrado se redujo a sequedad al vacío, dando el [(3R,4R)-4-aminotetrahidro-2H-piran-3-il]carbamato de 1,1-dimetiletilo (38 gramos).

20 RMN de ¹H (400MHz, CDCl₃): δH 5,00(1H, d), 3,90(1H, m), 3,81 (1 H₁ m), 3,74 (1H, m), 3,50(1H, dd), 3,44(1H, m), 3,02(1H, m), 1,71 (1H, m), 1,52-1,46(10H, m).

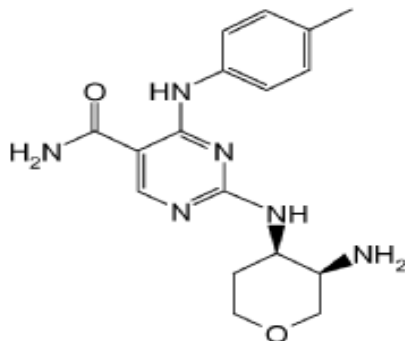
[(3R,4R)-4-((5-(aminocarbonil)-4-[(4-metilfenil)amino]-2-pirimidinil]amino)tetrahidro-2H-piran-3-il]carbamato de 1,1-dimetiletilo



25 Una mezcla de [(3R,4R)-4-aminotetrahidro-2H-piran-3-il]carbamato de 1,1-dimetiletilo (38 gramos), 2-cloro-4-[(4-metilfenil)amino]-5-pirimidincarboxamida (46,2 gramos) y trietilamina (49,0 mililitros) en N,N-dimetilformamida (DMF) (250 mililitros) se calentó y se agitó a 90°C. La mezcla se agregó a agua (1 litro), y el precipitado sólido se recolectó mediante filtración. El precipitado se lavó con agua (200 mililitros, 2 veces) y se secó durante la noche a 40°C al vacío. El producto se suspendió en acetato de etilo (600 mililitros), y se calentó a reflujo durante 30 minutos, se enfrió en hielo a 5°C, y el producto se recolectó mediante filtración. Éste se lavó con acetato de etilo (100 mililitros, 2 veces) y se secó a 40°C al vacío, dando el [(3R,4R)-4-((5-(aminocarbonil)-4-[(4-metilfenil)amino]-2-pirimidinil]amino)tetrahidro-2H-piran-3-il]carbamato de 1,1-dimetiletilo (53,0 gramos).

LCEM (Procedimiento A): Rt 1,05 minutos, MH⁺ 443.

35 RMN de ¹H a temperatura variable (400MHz, D₆DMSO, 119°C): δH 1 1,21 (1H, sa), 8,55(1H, s), 7,53(2H, m), 7,14(4H, m), 6,57(1H, d), 6,01 (1H, d), 4,21 (1H, m), 3,91 3,78(3H, m), 3,513,42(2H, m), 2,30(3H, s), 2,001,88(1H, m), 1,741,62(1H, m), 1,37(9H, s).

Ejemplo 1 - 2-[[[(3R,4R)3aminotetrahidro2Hpiran4il]amino]4[(4metilfenil)amino]5pirimidincarboxamida

5 Se agregó [[(3R,4R)4[(5(aminocarbonil)4[(4metilfenil)amino]2pirimidinil)amino]tetrahidro2Hpiran3il]carbamato de 1,1dimetiletilo (52,2 gramos) a una mezcla de cloruro de hidrógeno en isopropanol (5M, 300 mililitros), y etanol (400 mililitros). La mezcla se calentó a reflujo mientras se agitaba, y se continuó el calentamiento durante 24 horas con agitación vigorosa. La mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente, se filtró, el sólido se lavó con etanol (100 mililitros), y se secó al vacío. El producto bruto se suspendió en agua (900 mililitros), y se calentó a reflujo, dando una solución transparente. La solución se basificó con una solución de hidróxido de sodio (2M, 300 mililitros) y se enfrió en hielo. El producto precipitado se recolectó mediante filtración, se lavó con agua (100 mililitros, 2 veces), y el sólido color beige se secó en estufa al vacío a 40°C durante 2 horas, dando la 2-[[[(3R,4R)3aminotetrahidro2Hpiran4il]amino]4[(4metilfenil)amino]5pirimidincarboxamida como un sólido color beige (37,8 gramos).

15 CLEM (Procedimiento A): Rt 0,85 minutos, MH⁺ 343.

RMN de ¹H a temperatura variable (400MHz, D₆DMSO, 119°C): δH 1 1,22(1H, sa), 8,55(1H, s), 7,54(2H, m), 7,14(4H, m), 6,52(1H, da), 4,06(1H, m), 3,83(1H, m), 3,70(1H, m), 3,53(1H, d), 3,41 (1H, t), 2,96(1H, s), 2,30(3H, s), 1,891,65(2H, m), 1,50(2H, s).

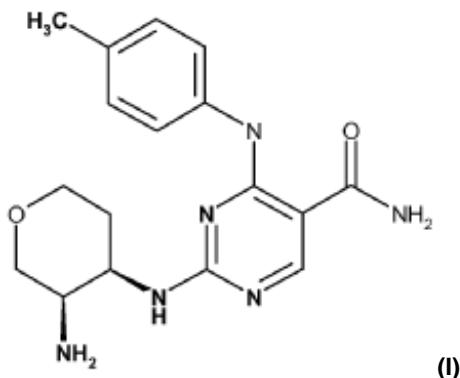
20 La 2-[[[(3R,4R)3aminotetrahidro2Hpiran4il]amino]4[(4metilfenil)amino]5pirimidincarboxamida (37,8 gramos) se calentó a reflujo en etanol (1,2 litros). La solución caliente se filtró a través de un embudo de vidrio sinterizado para eliminar el sedimento no disuelto, y el filtrado se dejó enfriar lentamente a temperatura ambiente, entonces se enfrió en hielo a 5°C, y el producto sólido cristalino se recolectó mediante filtración, dando la 2-[[[(3R,4R)3aminotetrahidro2Hpiran4il]amino]4[(4metilfenil)amino]5pirimidincarboxamida (36,6 gramos) como un sólido cristalino color beige pálido.

25 Los datos de difracción en polvo de rayos X se adquirieron en un difractómetro de polvo PANalytical X'Pert Pro, equipado con un detector X'Celerator. Las condiciones de la adquisición fueron: radiación: Cu Ka, tensión del generador: 40 kV, corriente del generador: 45 mA, ángulo de inicio: 2,0° 2θ, ángulo de terminación: 40,0° 2θ, tamaño de paso: 0,0167° 2θ. El tiempo por paso fue de 31,750 segundos. La muestra se preparó montando unos cuantos miligramos de muestra sobre una placa de oblea de Si (fondo cero), dando como resultado una capa delgada de polvo. El espectro obtenido de esta manera se muestra como la Figura 1.

30

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la fórmula (I):



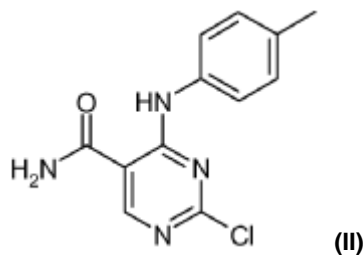
o una sal, del mismo.

5 2. Un compuesto de la fórmula (I) de acuerdo con la reivindicación 1, el cual es:

2{[(3R,4R)3aminotetrahidro2Hpiran4il]amino}4[(4metilfenil)amino]5pirimidincarboxamida; o una sal del mismo.

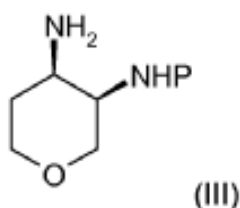
3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

4. Un procedimiento para la preparación de un compuesto de la fórmula (I), o de una sal del mismo, como se define en la reivindicación 1 o 2, procedimiento que comprende hacer reaccionar un compuesto de la fórmula (II):



10

con un compuesto de la fórmula (III):



en la que P es un grupo protector,

y posteriormente, eliminar el grupo protector.

15 5. Una composición farmacéutica, que comprende un compuesto de la fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como se define en la reivindicación 3, y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

6. Un compuesto de la fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como se define en la reivindicación 3, para uso en terapia.

20 7. Uso de un compuesto de la fórmula (I), o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como se define en la reivindicación 3, en la fabricación de un medicamento para inhibir la Syk cinasa.

8. Uso de un compuesto de la fórmula (I), o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como se define en la reivindicación 3, en la fabricación de un medicamento para uso en el tratamiento de cáncer

9. Un compuesto de la fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como se define en la

reivindicación 3, para uso en el tratamiento de cáncer

- 5
10. Compuesto de la fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso de acuerdo con la reivindicación 9 en el que el cáncer se selecciona de las neoplasias malignas hemáticas, particularmente linfomas no Hodgkin incluyendo linfoma folicular (FL), linfoma de células de manto, linfoma de Burkitt, y linfoma difuso de linfocitos B grandes (DLBCL).
11. Un compuesto de la fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como se define en la reivindicación 3, para uso en el tratamiento de una enfermedad asociada con una activación inapropiada de mastocitos.
- 10
12. Un compuesto de la fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como se define en la reivindicación 3, para uso en el tratamiento de un trastorno inflamatorio o alérgico.
13. Compuesto de la fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso de acuerdo con la reivindicación 12 en el que el trastorno inflamatorio o alérgico se selecciona de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), síndrome disneico agudo del adulto (SDAA), asma, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, bronquitis, conjuntivitis, soriasis, esclerodermia, urticaria, dermatitis, y rinitis alérgica.
- 15
14. Compuesto de la fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso como se define en la reivindicación 13 en el que el trastorno inflamatorio o alérgico es urticaria.
15. Un compuesto de la fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como se define en la reivindicación 3, en combinación con otra clase de agente terapéutico.

20

25

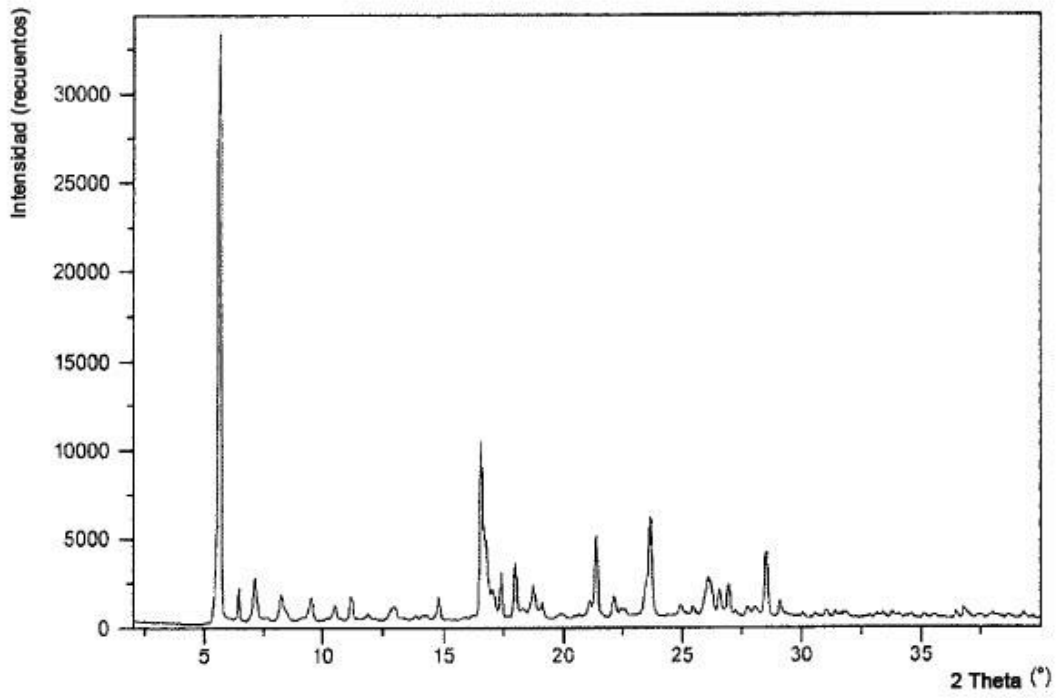


Figura 1 - Difracción en polvo de rayos-X para el compuesto del Ejemplo 1.